

東方果實蠅對甲基丁香油的觸覺電圖

李國全 林金盾 吳京一*

國立臺灣師範大學生物學系

摘要

記錄各種日齡未交配之東方果實蠅對甲基丁香油發生的觸覺電圖。羽化後 14~24 天的雄蟲皆有較高的反應，但在雌蟲其觸角電圖皆低於雄蟲；文中討論這些蟲之精巢及卵巢之發育與觸角電圖之關係。

關鍵詞：甲基丁香油，觸覺電圖，果實蠅

緒言

東方果實蠅(Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* Hendel)屬於雙翅目(Diptera)，果實蠅科(Trypetidae)。東方果實蠅原產在印度、馬來半島等地，在 1911 年台灣亦有發現牠的分布(李，1988)。在台灣，東方果實蠅全省皆有分布，是為本省重要的經濟害蟲。

東方果實蠅之雌蟲產卵在成熟鮮果果皮內，俟卵孵化成幼蟲後蛀食果肉，造成果實腐爛、落果。主要受害果樹種類有蕃石榴、柑橘、文旦、梨、批把、芒果、人心果、蕃茄、蓮霧、李、釋迦等共有 32 科 89 種(劉，1981；朱和陳 1985)。由於台灣氣候溫暖，一年四季均適合東方果實蠅之生殖、發育，於冬季亦沒有休眠現象，一年可發生 8~9 世代，有寄生果實的成熟期，就有東方果實蠅之存在(李，1978；劉，1981)。

防治東方果實蠅方法的研究甚多(李，1978)，除採用一般之噴灑農藥外，尚有使用誘引劑誘殺東方果實蠅成蟲，以降低其族群密度，除可減輕其為害外，尚可避免因噴灑農藥所造成的環境污染(朱和葉，1987；陳，1977)。在已發現的多種誘引劑中，甲基丁香油(methyl eugenol)對雄性東方果實蠅具有強力的誘引作用(Metcalf *et al.*, 1975; Steiner 1952; 趙等，1979；陳，1977)。因此果農已普遍使用含毒之甲基丁香油(即甲基丁香油加二氯松)誘殺雄蟲，以圖使田間雄蟲數量減少，如此雌蟲交尾機會降低，以致棲群逐漸減低(李，1988；陳，1977；劉，1981)。

在此有幾個有趣之問題產生：為何只能誘殺雄蟲，而不能雌、雄蟲兩者一起誘殺？羽化後之雌、雄昆蟲，對甲基丁香油之敏感度(sensitivity)有無不同？是否和東方果實蠅雌、雄蟲之生殖器官之成熟速度有關？解決以上問題是可以利用觸角電圖(electroantennogram, EAG)技術來判斷。

*通信作者(corresponding author)：吳京一(Chin-Yih Wu)；FAX: 886-2-29312904；E-mail: Chinyih@ms1.palmery.net.tw

材料與方法

動物與藥品

東方果實蠅的蛹為中央研究院動物所果實蠅研究室所供應，俟蛹羽化後即時將雌、雄分開，避免交尾行為發生，飼養在 25 °C，12 : 12 小時光暗週期的飼養箱內，飼以蔗糖液及乾燥酵母粉。

甲基丁香油購自市售(Merck[®])，密度(d)為 1.07g/ml，因為已知 100 % hexane 滴於 1 × 2 cm 濾紙上後，只要空氣中放置 30 秒，即可完全揮發，而未構成 EAG 上的變化(Avail et al., 1988; Contreras et al., 1989; Light et al., 1988; Mayer et al., 1984)，因此以 hexane 將甲基丁香油作一系列稀釋(V/V)，使每 100 μ l hexane 含有甲基丁香油 10⁻⁵至 10⁻² μ l。

實驗方法

將果實蠅施以低溫麻醉後，用蜂蠟固定其頭部、頸部、觸角、翅膀、腳於固定板上。在解剖顯微鏡觀察下將以先端極銳利的鎢絲電極，在 funiculus 上的 arista 基部開一小孔後取玻璃電極(內有昆蟲林格氏液：阻抗 5~10 M Ω)，以電極微動儀(microdriver)將此電極慢慢地插入觸角該開孔之內，作為記錄電極。再以另一先端尖銳的鎢絲插入果實蠅胸部血腔內，並以蜂蠟固定，當作無關電極。經甲基丁香油刺激所得之觸角電圖，藉著電極導引，經過微電極放大器，再輸入於電腦示波儀而再顯示於其螢幕上。實驗進行時，首先以空氣刺激，即可得到 blank 之活動電位。然後以含有甲基丁香油之空氣刺激觸角，即可得甲基丁香油的 EAG 反應，然後以記錄儀記錄其 EAG。

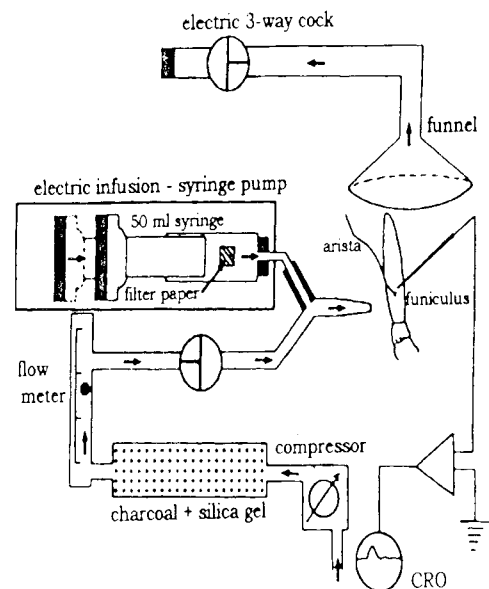
EAG 之波形以基線向上之波形視為正值電位(positive potential)，向下之波形視為負值電位(negative potential)，並以各觸角之振幅

(amplitude, mV)表示 EAG 大小(Honda et al. 1986; Light and Jang 1987)。

實驗步驟

實驗裝置如圖一。此實驗裝置乃參考 Kalinova and Sobotka(1987) 與 Honda and Ishikawa(1987)加以改良。分別吸取各種稀釋濃度之甲基丁香油 100 μ l，滴於 1 × 2 cm 濾紙上，再將各濾紙置於 50ml 之空針筒內 30 分鐘，使濾紙上的甲基丁香油充分揮發。

實驗進行中，以馬達推動內針筒(Harvard apparatus 2s)，每隔 6 秒鐘在 250ms 之內使有 50 μ l 含有甲基丁香油之氣體注入於經碳粒及矽膠過濾過來的清潔乾燥空氣(氣流 1L/min)中，並吹向固定於固定板上的果實蠅觸角上。吹氣管口距離觸角約 1 cm，共刺激十六次。觸角上方之吸氣漏斗除刺激時間 250msec 外，始終吸除刺激完後的甲基丁香油排之室外，以免留在觸角附近之甲基丁香油繼續刺激觸角。



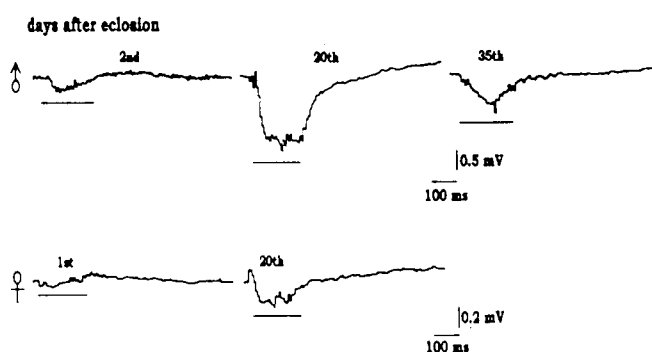
圖一、東方果實蠅觸角電位測定設置圖。

Figure 1. Diagram for electroantennogram technique of oriental fruit fly

結 果

不同日齡未交尾之雌、雄果實蠅對甲基丁香油的觸角電圖

取羽化 1 日至 43 日未曾交尾之雌、雄果實蠅作供試蟲。以微量吸管吸取未經稀釋之甲基丁香油 100 μ l，滴於 1 \times 2 cm 濾紙供作 EAG 實驗的刺激氣體來源。東方果實蠅對甲基丁香油刺激皆發生負極化的 EAG，隨著刺激的濃度其負性愈大(圖二)。



圖二、東方果實蠅的觸角電圖。上列：雄蟲對甲基丁香油之觸角電圖，下列：雌蟲對甲基丁香油之觸角電圖。數字表示羽化後的天數，畫線表示刺激時間。校正：100ms 0.5mV (雄蟲)；100ms 0.2mV (雌蟲)

Figure 2. Electroantennograms (EAGs) on male and female fly to methyl eugenol. Upper row: EAGs for neat methyl eugenol (male); Lower row: EAGs for neat methyl eugenol (female). Lines for stimulation. The days after emergence were shown. Calibrations: 100 ms 0.5 mV for male flies; 100 ms 0.2 mV for female flies.

雄蟲羽化後第 1 日觸角對未稀釋甲基丁香油氣體之刺激，產生負極化的 EAG，電位為 0.22 \pm 0.03 mV，隨著日齡之增加而增加 EAG 之振幅，至第 9 日反應增大約為第 1 日的 4 倍(0.85 \pm 0.1 mV)。反應高峰集中在羽化後第 14~24 日，

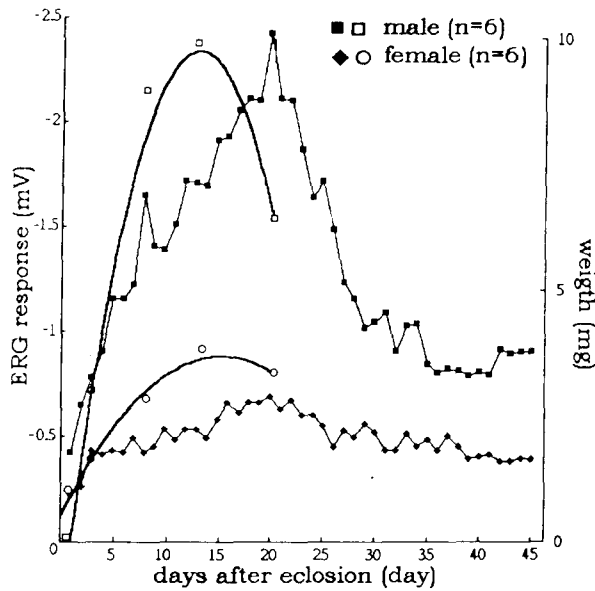
反應振幅為 2.0 \pm 0.8mV，以後反應逐漸降低，第 34 日至第 43 日，反應振幅維持在 0.84 \pm 0.08 mV。雌蟲羽化後第 1 日，EAG 反應為 0.13 \pm 0.02 mV，第 7 日起逐漸增加，至 22 日左右達最高 (0.68 \pm 0.03)，然後逐次減少其反應，至 37 日(圖三)。雄蟲對甲基丁香油之 EAG，其平均電位始終為同日齡雌蟲反應的 2~4 倍。故取羽化 15~21 天之雌雄果實蠅，作甲基丁香油與 EAG 之定量實驗。

EAG 閾值

雄蟲所得 EAG 之負電位，隨甲基丁香油濃度之增高增大(圖三)。若以濾紙上的濃度來表示昆蟲的 EAG 閾值(EAG threshold) (Baker and Roelofs 1976; Hansen, 1983; Honda *et al.*, 1986; Mayer *et al.*, 1984)，則雄性東方果實蠅對甲基丁香油的 EAG 閾值約在 10⁻⁵~10⁻⁴ μ l/dl，當甲基丁香油之濃度在 10¹~10² μ l/dl 時，其 EAG 不再增大呈平頂(plateau)，且與未稀釋之原液(neat)刺激所得 EAG 的大小相當。雌蟲的嗅覺閾值約在 10⁻⁴~10⁻³ μ l/dl，比雄蟲稍高，EAG 亦隨濃度的增高而增大，但其增大程度不及雄蠅高，且在 10¹~10² μ l/dl 時，EAG 反應亦達其最大反應值之高平原(平頂)區(圖四)。

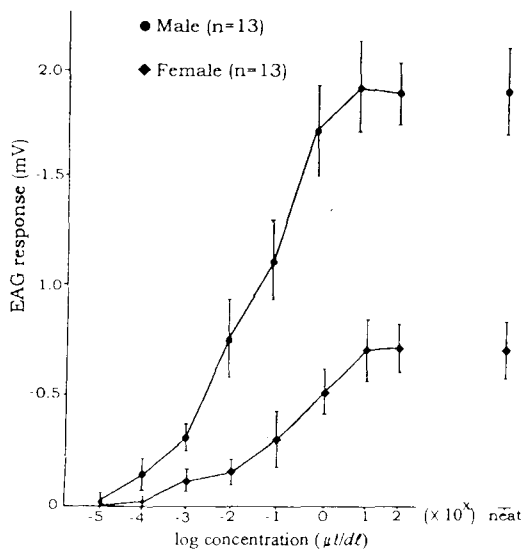
討 論

EAG 係嗅覺受納器電位變化之總和 (Schneider, 1962)，正極化與負極化的 EAG 在其他昆蟲的實驗中亦可發現(Contreras *et al.*, 1989; Light *et al.*, 1988; Patte *et al.*, 1989; Warnes and Finlayson, 1986; Yamada *et al.*, 1976)。Schneider (1969)將感覺毛內受器神經(receptor neuron)之胞外記錄所得之 EAG，其負極化電位(negative-polarity potential)，稱為去極化(depolarization)現



圖三、生殖器官之成長(陳, 1997)與甲基丁香油引起之觸角電圖的關係。左縱軸: EAG; 右縱軸: 精巢或卵巢的重量。■-■: 雄蟲觸角電圖(-mV); □-□: 精巢重量(mg); ◆-◆: 雌蟲觸角電圖(-mV); ○-○: 卵巢重量(mg)

Figure 3. The relationship between development of reproductive organs (Chen, 1997) of flies and EAGs to neat methyl eugenol. ■-■: EAGs for adult male flies(-mV); □-□: Testes weight(mg); ◆-◆: EAGs for adult female flies(-mV); ○-○: Ovary weight(mg)



圖四、雌、雄蟲對甲基丁香油的嗅覺閾值。

Figure 4. Olfactory threshold of neat methyl eugenol for male and female flies.

象。此與該受器神經之興奮性有關，因為它會增加動作電位的頻率，而將正極化電位(positive-polarity potential)稱為過極化(hyperpolarization)現象，此與該受器神經之抑制性有關，它減少了動作電位之頻率。

昆蟲的嗅覺常隨著日齡的增加而有改變(Avail et al., 1988; Fitt, 1981; Otter and Saini, 1985)，例如：蘋果實蠅(*Rhagoletis pomonella*)對其寄主果實氣味的反應，主要在羽化後 2~3 週(Avail et al., 1988)，而據吳及朱(1990)的研究，不同日齡未交尾之雄性東方果實蠅對甲基丁香油的誘引反應實驗中，確定雄蟲羽化後第 3 日即可被甲基丁香油所誘引。誘引高峰在第 15 日，即成熟雄蟲於性成熟前，已被甲基丁香油所誘引。而牠在性成熟之後，對該甲基丁香油之反應更明顯，其誘引率亦到達高峰之後，隨著日齡增加而下降。陳(1997)曾觀察到東方果實蠅性器官(精巢及卵巢)隨日齡之發育(圖三)，測知精巢之重量自羽化後至 20 日之間其發育隨日齡之增加而急速增加；精巢重量即第 13 日齡達到最高值，而卵巢之發育情形與精巢極相似。由圖三可以測知精巢之成長與 EAG 反應是非常一致，而至 13~15 日以後精巢發育已完成，還可繼續成長，這可能是嗅覺器官之感受性(sensibility)之繼續增加所致乎？在本實驗中未能證實，這將俟將來之研究。至於卵巢之發育與其 EAG 反應之間似沒有與雄蟲那麼明顯，惟在羽化後之初期，雖然 EAG 反應很小，但似有與雄性果實蠅反應相似之傾勢。

Fitt(1981)曾研究不同日齡、未交尾之雄性 *Dacus opilliae*，對甲基丁香油的誘引反應，發現雄蟲於羽化後第 4 日起，對甲基丁香油所誘引，且認為雄蟲對該甲基丁香油的反應與性器官的成熟及交尾行為的發生有相關。

本實驗從觸角電生理的研究結果發現，未交尾之雄性東方果實蠅羽化後第 1 日，觸角神經對甲基丁香油的刺激已可產生去極化反應，但反應

高峰維持在第 14~24 日。之後，隨著日齡的增加而反應下降，第 34 日至第 43 日 EAG 反應則維持在一定大小(圖三)。東方果實蠅成蟲的壽命，一般為一個月至三個月(劉，1981)，本實驗飼養之果實蠅平均壽命亦在 45~60 日，雄蟲於壽命結束前，對甲基丁香油之刺激，其 EAG 仍然維持在某一定的大小。因此，可知東方果實蠅之能夠被甲基丁香油所誘引，即可與精巢等發育之程度與觸角感覺毛(sensilla)之對甲基丁香油之敏感度增加(即 EAG 振幅之增加)，這三者之間有密切的關係。

雌、雄昆蟲間嗅覺上的差異，在蛾類已普遍的存在(Baker and Roelofs, 1976; Descoins *et al.*, 1990; Schneider, 1957; Yamada *et al.*, 1976)。Vogt and Riddiford(1981)利用電泳的方法，從雌性蠶蛾(silk moth)觸角感覺毛液(sensillum liquo)中，發現一些特殊的費洛蒙結合蛋白(binding protein)與費洛蒙分解蛋白(degrading protein)，這些蛋白質可能與性費洛蒙作用而引起感覺神經興奮的蛋白質，在雌蛾的感覺毛液中並無發現，此結果正是雌雄蠶對性費洛蒙嗅覺差異的原因。至於雌雄東方果實蠅對甲基丁香油嗅覺上的差異，其原因是否因為在雄蠅感覺毛液內存在著能與甲基丁香油結合的特殊蛋白，而雌蠅缺少該種蛋白，才導致對甲基丁香油嗅覺反應上的差異？俟將來利用電泳的方法探討。

參考文獻

- Avail, A. L., W. H. Reissig, and W. L. Roelofs. 1988. Specificity of olfactory responses in the Tephritid fruit fly, *Rhagoletis pomonella*. *Entomol. Exp. Appl.* 47:211-222.
- Baker, T. C. and W. L. Roelofs. 1976. Electroantennogram responses of the male moth, *Argyrotaenia velutinana* to mixtures of sex pheromone components of the female. *J. Insect Physiol.* 22:1357-1364.
- Contreras, M. L., D. Perez., and R. Rozas. 1989. Empirical correlation between electroantennograms and bioassays for *Periplaneta americana*. *J. Chem. Ecol.* 15: 2539-2548.
- Descoins, C., C. Malosse, M. Renou, B. Lalanne-Cassou, and J. Duchat d'Aubigny. 1990. Chemical analysis of the pheromone blends produced by males and female of the neotropical moth, *Mocis megas* (Lepidoptera, Noctuidae, Catocalinae). *Experientia* 46:536-539.
- Fitt, G. 1981. The influence of age, nutrition and time of day on the responsiveness of male *Dacus Opilliae* to the synthetic lure, methyl eugenol. *Entomol. Exp. Appl.* 30:83-90.
- Hansen, K. 1983. Reception of bark beetle pheromone in the predaceous clerid beetle, *Thanasimus formicarius* (Coleoptera : Cleridae). *J. Comp. Physiol. A* 150:371/378.
- Honda, H., Y. Maruyama, and Y. Matsumoto. 1986. Comparisons in EAG response to n-alkyl compounds between the fruit- and Pinaceae-feeding type of yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Ent. Zool.* 21(1): 126-133.
- Honda, I. and Y. Ishikawa. 1987. Electrophysiological studies on the dorsal and anterior of the onion fly larva, *Hylemya antiqua* Meigen (Diptera : Anthomyiidae). *Appl. Ent. Zool.* 22:410-416.
- Kalinova, B. and J. Sobotka. 1987. Insect olfactory stimulation apparatus. *Acta. Entomol. Bohemoslov.* 84:330-334.
- Light, D. M., and E. B. Jang. 1987. Electroantennogram responses of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis*, to a spectrum of alcohol and aldehyde plant volatiles. *Entomol. Exp. Appl.* 45: 55-64.
- Light, D. M., E.B. Jang, and J.C. Dickens. 1988. Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, to a spectrum of plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* 14: 159-180.
- Mayer, M. S., R. W. Mankin, and G. F. Lemire. 1984. Quantitation of insect electroantennogram: measurement of sensillar contributions, elimination of background potentials, and relationship to olfactory sensation. *J. Insect Physiol.* 30: 757-763.

- Metcalf, R.L., W.C. Mitchell, T.R. Fukuto, and E.R. Metcalf. 1975. Attraction of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis*, to methyl eugenol and related olfactory stimulants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72:2501-2505.
- Otter, C.J. and R.K. Saini. 1985. Pheromone perception in the tsetse fly *Glossina mprsitans*. *Entomol. Appl.* 39:155-161.
- Patte, F., M. etcheto, P. Marfaing, and P. Laffort. 1989. Electroantennogram stimulus-response curves for 59 odourants in the honey bee, *Apis Mellifica*. *J. Insect Physiol.* 35:667-675.
- Schneider D. 1957. Electrophysiological investigation on the antennalreceptors of the silk moth during chemical and mechanical stimulation. *Experientia.* 13:89-91.
- Schneider, D. 1962. Electrophysiological; investigation on the olfactory specificity of sexual attracting substances in different species of moths. *J. Insect Physiol.* 8:15-30.
- Schneider, D. 1969. Insect olfaction: deciphering system for chemical messages. *Science.* 163: 1031-1037.
- Steiner, L. F. 1952. Methyl eugenol as an attractant for oriental fruit fly. *J. Econ. Entomol.* 45: 241-248.
- Vogt, R. G. and L. M. Riddiford. 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature.* 293:161-163.
- Warnes, M. L., and L. H. Finlayson. 1986. Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to carbon dioxide and other odors. *Physiol. Entomol.* 11: 469-473.
- Yamada, M., S. Saito, K. Katagiri, S. Iwaki, and S. Marumo. 1976. Electroantennogram and behavioural responses of the gypsy moth to enantiomers of disparlur and its trans analogues. *J. Insect Physiol.* 22: 755-761.
- 李文蓉 1978. 東方果實蠅的生態與防治。 昆蟲生態與防治：中央研究院動物所專刊 3:19-26
- 李文蓉 1988. 東方果實蠅之防治。 中華昆蟲特刊：果樹害蟲綜合防治研討會論文 2:51-60
- 朱耀沂和陳建志 1985. 東方果實蠅之非栽培性寄生植物誌。 台灣大學植物病蟲害學刊 12:63-77
- 朱耀沂和葉萬音 1987. 甲基丁香油對本省產瓜實蠅之誘引性。 植保會刊 29:81-84
- 吳懷慧和朱耀沂 1990. 甲基丁香油對雄性東方果實蠅交尾能力之影響。 中華昆蟲 10:69-78
- 陳玉麟 1977. 東方果實蠅誘引劑之研究。 東方果實蠅研討會論文集 臺灣省政府農林廳編印 p.2-7
- 陳育仁(1997)：黃色黏皮對東方果實蠅誘補效果之評估。 國立台灣大學植物病蟲害研究所碩士論文
- 趙葳蒂、徐爾烈和徐世傑 1979. 柏果蠅(*Dacus dorsalis* Hendel)生物學之研究IV：柑果蠅之行爲及生殖之研究。 臺灣省立博物館科學年刊 22:65-95
- 劉玉章 1981. 臺灣東方果實蠅之研究。 興大昆蟲學報 16:9-26

(接受日期：1997.12.20)

Electroantennogram Responses of the Oriental Fruit Fly (*Bactrocera dorsalis* Hendel) to Methyl Eugenol

Kuo-Chun Lee, Jin-Tun Lin and Chin-Yih Wu
Department of Biology, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan

ABSTRACT

Electroantennogram(EAGs) were recorded from various aged and unmated males/females of oriental fruit flies (*Bactrocera dorsalis* Hendel) in response to methyl eugenol. The male flies of 14-24-day after emergence responded dramatically to the chemicals producing higher amplitudes in EAGs than those responses of other ages. In female flies, the amplitudes of EAGs were lower than males. We discussed the relationships of development of testes and ovaries.

Key words: Methyl eugenol, Electroantennogram, Fruit flies