

## 緒論

# 1 東方果實蠅

## 1.1 分類階層

東方果實蠅的分類階層為雙翅目 (Diptera)、短角類 (Brachycera)、Muscomorpha、裂額亞目 (Schizophora)、無瓣類 (Acalyptratae)、果實蠅總科 (Tephritoidea)、果實蠅科 (Tephritidae)、寡毛實蠅亞科 (Dacinae)、寡毛實蠅族 (Dacini)、背寡毛實蠅屬之背寡毛實蠅亞屬的東方果實蠅 - *Bactrocera (Bactrocera) dorsalis* (Hendel)。

## 1.2 棲地分佈

東方果實蠅廣佈於東南亞及太平洋地區，包括巴基斯坦 (Pakistan)、印度 (India)、斯里蘭卡 (Sri Lanka)、錫金 (Sikkim)、緬甸 (Burma)、印尼 (Indonesia) (西里伯島 (Celebes)、婆羅洲 (Borneo)、蘇門達臘 (Sumatra)、爪哇 (Java))、馬來半島 (Malaya)、泰國 (Thailand)、柬埔寨 (Cambodia)、印度支那 (Indochina) (寮國 (Laos)、越南 (Vietnam))、中國南部 (Southern China)、台灣 (Taiwan)、菲律賓群島 (Philippine Islands)、琉球群島 (Ryukyu Islands)、密克羅尼西亞群島 (Micronesia Islands)、馬里亞納群島 (Mariana Islands) (關島 (Guam)、羅塔島 (Rota)、賽班島 (Saipan))、

天寧島(Tinian))、小笠原群島(Bonin Islands)、夏威夷群島(Hawaiian Islands)；因雌蟲產卵於熟果而導致落果，故東方果實蠅為當地的農業害蟲(FDACS and UFIFAS 2004)。

### 1.3 在台危害情形與防治工作

台灣地處亞熱帶地區，溫暖潮濕的氣候十分適合東方果實蠅的生存與繁殖，故自 1911 年，日人春倉持首次在台北廳大加蚋內堡古亭庄發現東方果實蠅，台灣各地就陸續傳出災情，目前紀錄其危害 150 餘種的蔬果類，其中不乏具高度經濟價值的果樹，像是柑橘、番石榴、芒果、木瓜、酪梨、香蕉、枇杷、蕃茄、蒲桃、百香果、柿子、鳳梨、桃子、梨、杏、無花果，其中酪梨、芒果、木瓜最易受到東方果實蠅雌蟲的青睞(劉玉章 1981; FDACS and UFIFAS 2004)；防治方面，國內專家學者發展了果實蠅誘殺板、果實蠅誘殺器、套袋法、黃色黏紙、不孕性處理技術等方式，始有效控制東方果實蠅(劉玉章 1981)；然行政院農業委員會於九十一年農業施政重點中提到：加強東方果實蠅及瓜實蠅的防疫，以利拓展農產外銷(行政院農業委員會 2002)，可見目前東方果實蠅仍危害我國農民生計。

### 1.4 生活習性

成蟲自早晨 10 時左右開始飛行，中午以後至樹葉間陰涼處棲息，下午 3、4 時後再飛出活動，夜晚則棲息於植物叢中休息。成蟲

主要在果園中活動，如若園中果樹果季已過，成蟲便會飛行至他處；成蟲的遷移能力強，如夏威夷群島紀錄到成蟲在島與島之間做長距離遷移，飛行期間甚至有看不到陸地的機會（Christenson and Foote 1960），推測其成蟲具偏光感受能力（黃文琴 1994），具飛行導航之用。

成蟲對黃色最為敏感、紅色次之，藍色對牠的吸引力最小，故成蟲具有分辨不同色彩的能力（徐爾烈、徐世傑 1972）。

性成熟的成蟲於黃昏時交尾，當光線漸趨微弱，雄蟲聚集在同一棵果樹上振翅產生聲音並釋放費洛蒙吸引雌蟲前來與之交尾（Lek behavior），隨著環境光強度的減弱，交尾的次數也隨之增加（Shelly and Kaneshiro 1991）；交尾後，雌蟲從白天到太陽下山前會找尋熟果產卵，而在傍晚直到太陽下山前，雌蟲產卵的頻率會增加（Christenson and Foote 1960），因此推測光強度影響雌蟲產卵的意願；雌蟲選擇熟果產卵，除了依照果實散發出來的味道外，果實的顏色也影響了雌蟲的選擇，以木瓜為例，如果皮黃色的程度越高，雌蟲越容易選擇該木瓜產卵（Liquido 1991）。

卵孵化成幼蟲，幼蟲吃食果肉成長，當長成老熟幼蟲後，會跳出果實、鑽入土中、形成蛹、再羽化成成蟲（徐爾烈、徐世傑 1972）。

## 2 昆蟲視覺

## 2.1 昆蟲複眼

昆蟲複眼 (compound eye) 由為數眾多的小眼 (ommatidia) 組成，果蠅發生學的研究指出，小眼來自單層的上皮組織-複眼器官芽 (eye imaginal disc)，分化時，排列整齊的小眼是隨著形態發生溝 (morphogenetic furrow)，由複眼器官芽後方向前方移動時生成 (Wolpert *et al.* 2002)，昆蟲的每個小眼在接收光線後會傳送視覺訊號產生視覺，而複眼構造 (如其內小眼排列的方式) 會影響昆蟲接收光線的能力，故不同生活方式的昆蟲，其複眼構造也就有所不同。

## 2.2 東方果實蠅的複眼構造

Wu 等人 (1985) 發表了東方果實蠅的複眼微細構造研究：頭部的兩側各具一個球形複眼，每個複眼具有 4500-4600 個小眼，小眼的最外側為角膜晶體 (corneal lens)，角膜晶體上有角膜乳狀突起 (corneal nipples) 可增加進入小眼的光量，其下為折射率較低呈半液體狀的圓錐晶體 (crystalline lens)，圓錐晶體由其下方的 4 個晶體細胞 (semper cells) 分泌的明膠狀物質構成，因圓錐晶體成半液體狀，故東方果實蠅的小眼屬假晶體眼 (pseudocone eye)，角膜晶體及圓錐晶體可集中入射光線射入視網膜，因小眼的圓錐晶體和視網膜部分緊接相連，偏軸射入的光線會被散射到位於光感受器細胞 (photoreceptor cells) 外圍的色素細胞 (pigment cells) 由其內的色素

(screening pigment) 吸收，此可增加空間解析，不過其吸光能力在光波長大於 600nm 後會下降 (Stavenga 1995)。

圓錐晶體下有 8 個視細胞 (retinula cells) (即 8 個光感受器細胞)，第一至第六視細胞 (R1-R6 視細胞) 在外圍，第七、八視細胞 (R7-R8 視細胞) 排列在中央，R7 視細胞排在 R8 視細胞的上面，視細胞由色素細胞包圍，每個視細胞具桿小體 (rhabdomere)，每個小眼內視細胞的七個桿小體略呈梯形排列，此為分散型 (open type) 排列，每個桿小體由緊密結合的微絨毛 (microvilli) 交疊而成 (Wu *et al.* 1985)，微絨毛內有視覺色素 (visual pigment) 及其他與光訊息傳導路徑相關的分子 (Montell 1999)。

### 2.3 東方果實蠅 (*B. dorsalis*) 的感光偏好

Wu (1989) 首次紀錄東方果實蠅的視網膜電圖 (electroretinogram, ERG)，以彩色玻璃濾片 (coloured glass filter) 濾出不同波長的光線照射複眼時記錄網膜電位變化，結果顯示在 348-364nm 間 (紫外光) 有第一個感光高峰，在 431nm 和 494nm 記錄到第二及第三個感光高峰，故推測東方果實蠅複眼前方區域分別有 3 種視覺色素。

Wu (2003) 利用高速光譜感知量測系統發現東方果實蠅複眼內有五種光感受器，分別為對 370, 380, 490, 510nm 波長敏感的 4 個單峰光感受器及 1 個同時對 350, 490nm 敏感的雙峰光感受器，而此雙

峰光感受器被紀錄到的次數最多 (n=37)，其他單峰光感受器則僅在各波長被記錄到一次，由此可推知東方果實蠅複眼內數量最多的光感受器其感光偏好在 490nm。

然目前還不知道東方果實蠅具有哪些視覺色素對應於這些不同波長的感光偏好。

## 2.4 其他昆蟲-果蠅 (*Drosophila melanogaster*)、柑橘鳳蝶 (*Papilio xuthus*) 的感光偏好

Harris 等人 (1976) 藉由記錄與視覺相關的特定基因突變的果蠅之視網膜電圖來研究不同小眼的感光偏好，R1-R6 視細胞對 350, 470nm 光波長敏感，具有接收 470nm 光波的視紫質；R7 視細胞對紫外光敏感，具有接收 370nm 光波的視紫質；R8 視細胞則對藍光較敏感。

柑橘鳳蝶 (*P. xuthus*) 每個小眼有 9 個視細胞 (R1-R9 視細胞)，可分成遠端及近端兩個部分，遠端包含 R1-R4 視細胞，近端則由 R5-R9 視細胞組成，各有其感光偏好，R1、R2 視細胞可吸收紫外光、紫光、藍光，此三感光偏好出現的比例近似於 1:1:1；R3、R4 視細胞吸收綠光；R5-R8 視細胞約 25% 吸收綠光、約 75% 吸收紅光，而在 R9 視細胞一半吸收綠光、另一半吸收紅光 (Arikawa *et al.* 1987)。

## 2.5 視覺色素

視覺色素，也就是視紫質（rhodopsin），由視蛋白（opsin）和色基（chromophore）所組成，其中色基來自維生素 A，果蠅的色基為 11-cis-(3S)-3-hydroxyretinal (Seki and Vogt 1998)，其視蛋白為七環透膜結構（seven transmembrane domain），色基則和視蛋白第七透膜區以 lysine 相連結（Montell 1999），視覺色素有各自的感光偏好，這是因為視蛋白胺基酸序列不同所造成的（Carulli *et al.* 1994），故感光偏好（spectral sensitivity）相似的視蛋白，其胺基酸序列應有相當程度的保留。

果蠅和沙漠飛蝗（*Schistocerca gregaria*）的親緣關係較遠，轉殖沙漠飛蝗的視蛋白基因到果蠅 rh1 突變株後記錄其視網膜電圖，結果顯示沙漠飛蝗的視蛋白可在果蠅複眼內進行光訊息傳導的工作，故親緣關係較遠的物種，視蛋白之間仍保留功能性相關的重要區域（Engels *et al.* 2000）。

果蠅視覺色素有 6 種（Rh1-Rh6），不同的視覺色素有不同的吸收光譜，故視細胞如有不同的視覺色素，其偏好的感光光譜也就不同（Kitamoto *et al.* 1998），R1-R6 視細胞表現 Rh1；R7 視細胞表現 Rh3 或 Rh4；R8 視細胞表現 Rh5 或 Rh6，R7 和 R8 視細胞表現的視蛋白基因是相配合的，當 R7 視細胞表現 Rh3 時，R8 視細胞就表現 Rh5；R7 視細

胞表現Rh4時，R8視細胞就表現Rh6 (Cook and Desplan 2001)。但在複眼的背端邊緣區 (dorsal margin region)，R7、R8視細胞都表現吸收紫外光的Rh3 (Papatsenko *et al.* 1997)，可見果蠅的視紫質在複眼具有分區表現的情形。目前，果蠅視覺色素的感光偏好已分析完成，其數值為:Rh1 486nm、Rh2 418nm、Rh3 331nm、Rh4 355nm、Rh5 442nm、Rh6 515nm (Salcedo *et al.* 1999)。但表現Rh1的果蠅R1-R6視細胞被發現其對紫外光 (~355nm及370nm) 有很高的敏感度，甚至比Rh1的感光高峰 (~475nm) 還高，其原因推測為在R1-R6視細胞中擁有對紫外光敏感的色素 (UV-sensitizing pigment)，此色素吸收紫外光後，可將吸收光線得到的能量傳到Rh1進行光傳導路徑 (Kirschfeld *et al.* 1977)。

柑橘鳳蝶有 5 種視覺色素 (PxRh1, PxRh2, PxRh3, PxRh4, PxRh5) (GenBank database)，PxRh1 與 PxRh2 均對綠光敏感，PxRh1 只在複眼腹側 R3、R4 視細胞表現，而 PxRh2 表現在複眼很多地方：R3、R4 視細胞及 52% 的 R5-R8 視細胞；紅光敏感的 PxRh3 只在 66% 的 R5-R8 視細胞表現。PxRh2 及 PxRh3 有重複表現在同一視細胞的情形；PxRh2 皆有表現在遠端的 R3、R4 視細胞，排列成規律的六角形陣列，推測此有利於空間解析，但 PxRh2 另外也隨機地表現在近端的 R5-R8 視細胞，此被認為和色彩視覺 (color vision) 有關 (Kitamoto



*et al.* 1998)。

## 2.6 視蛋白

果蠅複眼發生可分兩個時期，第一個時期在幼蟲期，包含了 8 個視細胞的聚集及伸出突觸與視葉其他神經細胞作連結等的發生步驟，第二個時期在蛹期，Rh1-Rh6 視蛋白直到蛹期後期才開始大量的在視細胞表現 (Sheng *et al.* 1997; Mollereau *et al.* 2001)。

基因的表現需要啟動子被活化，在昆蟲，所有 RH 啟動子內存在一非常保留的區域 P3/RCS1，像果蠅 *ninaE* 的啟動子；Ey 是調控複眼發育的轉錄因子，其 homeodomain (DNA binding domain) 連結到 P3/RCS1 位置後可調控 *Rh1* 的表現，使 *ninaE* 只表現在果蠅的複眼中 (Mismer and Rubin 1987)；視蛋白表現也受到維生素 A (retinoid) 的影響，如果蠅飲食缺乏維生素 A，視蛋白的表現量就會下降 (de Court and Tanimura 1987)；又因視紫質可透過 Drac1 (*Drosophila* Rho guanosine triphosphatase) 影響視細胞的形態發生 (Chang and Ready 2000)，所以若 *ninaE* 突變後不表現的話，視細胞形態就沒辦法維持 (Kumar and Ready 1995)。

視蛋白屬於連結 G 蛋白受器家族 (G-protein coupled receptor superfamily) 的一員，結構為七環透膜，在第七透膜區以 Lysine 和色基相連結；將視蛋白依胺基酸序列畫出親緣關係樹狀圖即可看出其和

感光偏好的關係，依此視蛋白可分成：紫外光 (UV)、藍光 (Blue)、藍綠光 (Blue-green)、長波長 (Long-wavelength) 四大群 (Briscoe and Chittka 2000)。

## 2.7 昆蟲的視蛋白研究

以雙翅目昆蟲來說，果蠅屬 (*Drosophila*) 視蛋白是被研究較清楚的一群。

O'Tousa 等人 (1985) 分離出果蠅 Rh1 基因-*ninaE*，Cowman 等人 (1985) 發現 Rh2，其專一表現在果蠅單眼 (Pollock and Benzer 1988)，R7 視細胞則表現 Rh3 及 Rh4 (Fryxell and Meyerowitz 1987; Motell *et al.* 1987)，而 Rh5 及 Rh6 則陸續在 R8 視細胞被發現 (Papatsenko *et al.* 1997; Huber *et al.* 1997)。

Carulli 等人 (1994) 分析果蠅屬的視覺電生理及其 13 個視蛋白的核苷酸序列，將果蠅的視蛋白分成兩大分支群 (clade)：

1. 藍光視蛋白分支群 (blue opsin clade)：包含所有 *Rh1* 及 *Rh2* 基因，分支群內，*Rh1* 及 *Rh2* 基因可再分成兩個分支群。
2. 紫外光視蛋白分支群 (ultraviolet opsin clade)：包含所有的 *Rh3* 及 *Rh4* 基因，其內再分叉成 *Rh3* 及 *Rh4* 分支群。

這四個 *Rh1*、*Rh2*、*Rh3*、*Rh4* 分支群的胺基酸序列都各有非常保留的區域，透過相互比較，得知胺基酸序列影響其感光偏好 (Carulli

*et al.* 1994)。

雙翅目除了在果蠅有較完整的視蛋白研究外，麗蠅科 (Calliphoridae) 的紅頭麗蠅 (*Calliphora erythrocephala*) 在 R1~R6 視細胞也有視蛋白 Rh1 的報導，其和果蠅 Rh1 視蛋白在胺基酸序列有高達 86% 的一致性 (identities) (Huber *et al.* 1990)，但和果蠅屬 Rh1 分支群比較後發現紅頭麗蠅的 Rh1 在果蠅屬 Rh1 保留的帶電或極性胺基酸上有置換的情形 (Carulli *et al.* 1994)。

其他昆蟲也 clone 到不同感光偏好的視蛋白，像是蜜蜂 (*Apis mellifera*) (Chang *et al.* 1996; Bellingham *et al.* 1997; Townson *et al.* 1998)、煙草天蛾 (*Manduca Sexta*) (Chase *et al.* 1997)、沙漠飛蝗 (Towner *et al.* 1997; Engels *et al.* 2000) 及多種蝴蝶 (Briscoe, 1998; Briscoe, 2000; Kitamoto *et al.* 2000; Briscoe, 2001; Vanhoutte *et al.*, 2002; Briscoe *et al.*, 2003)。

### 3 實驗目的

clone 並分析東方果實蠅視蛋白 BdoRh1 基因，再測定 Rh1 在複眼視覺相關細胞與身體其他部分 RNA 表現量的差別，並定出 Rh1 在小眼的位置及不同發育時期 Rh1 的表現情形。