

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

台灣—捷克衛生害蟲生殖調控機制合作計劃：德國蜚蠊雄性
生殖副腺對雌成蟲繁殖及活動行為日週律動的影響(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-069-

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

報告附件：國際合作計畫研究心得報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫進度報告

台灣 - 捷克衛生害重生殖調控機制合作計畫：德國蜚蠊雄性生殖副腺對雌成蟲繁殖及活動行為日週律動的影響 (1/3)

Taiwan - Czech Republic Cooperation Project on the Regulation Mechanism of Reproduction for Medical Important Pest: The Role of Male Accessory Glands on the Reproduction and Locomotor Circadian rhythm in Female Adults of German Cockroach

計畫編號：NSC 92-2313-B-002-069

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

主持人：李後晶 國立台灣大學昆蟲系

一、中文摘要

德國蜚蠊 (*Blattella germanica*) 為世界性分布之衛生害蟲，目前仍困擾著世界各地人類的的生活。一般認為昆蟲之雄性生殖副腺分泌物與精包的合成有關，而雌性副腺則可能與卵鞘的形成及抗菌蛋白之分泌等有關。因此，如能對德國蜚蠊之副腺進行深入研究，則有利於對生殖系統之掌控，而有助於防治研究工作之進展。本計畫先針對雌雄副腺之外部形態做觀察及描述，並進行蛋白質分析。性成熟雄蟲副腺之外部形態可分為 Uricose glands (UG); Utricles (U) 及 Conglobate gland (C) 三部分，UG 為具有五個分支的管狀構造，末端匯集成同一開口與 Ejaculatory pouch (EP) 相連，內含有白色不透明分泌物。U 分為 12 種透明管狀構造，開口位於 EP，CG 則為一長管折疊成球狀構造，開口於 Ejaculatory duct。蛋白質分析發現雄成蟲除 Testis 外，UG; U; CG; EP 及 Seminal vesicles (SV) 內的分泌物隨日齡逐漸累積增多，約至第 5 日齡時達到最高量。雌蟲副腺的發育速度則與卵巢之發育一致。關於德國蜚蠊之副腺蛋白研究，目前發現雄成蟲的睪丸內含有與 Acp70A 相似之蛋白質。

關鍵字：德國蜚蠊、家蚊、副腺蛋白、活動行為、日週律動

Abstract

The German cockroach is a cosmopolitan household species, which is closely associated with our daily life. In this project, we investigate the function of accessory glands on reproductive performances and locomotor circadian rhythm of the German

cockroach. The basic function of the accessory glands of male insects is to provide materials for the production of the spermatophore. In females, the accessory glands are important in the formation of ootheca and secretion of antibacterial proteins. Therefore, it is of great importance to study the accessory glands for understanding the mating system of the pest and consequently making contribution to further development of pest control. Firstly, we will observe and describe the morphology of the accessory glands for both sexes of the German cockroach. The relationships between accessory gland secretion and ootheca formation, egg number, survivorship of offspring and endocrine secretion (e.g. JH, ecdysone) for females, and spermatophore formation, time of copulation and survivorship of offspring for males will be examined. The daily secretion rhythm of the accessory glands will be investigated to reveal its circadian rhythm. In addition, the effects of male accessory gland secretion on female reproductive performances (e.g. re-mating rate, egg number, survivorship of offspring) and competition with other males' sperms will be our focal point of research. In the last year of this project, we will conduct the bioassay for specific proteins of the accessory glands, including antibacterial analysis, reproductive performances and the effects on locomotor circadian rhythm of females. We will also purify the proteins and then, analyze and sequence the amino acids. Using the antibody of specific protein, we will be able to trace the localization of the specific protein during and after the process of copulation. We expect to understand more about the mating system of the German cockroach through the proposed studies. Furthermore, the effects of accessory glands from both male and female on reproductive performances and locomotor circadian rhythm will be elucidated.

Key-words: *Blattella germanica*, *Culex pipiens*, accessory gland protein, locomotion, circadian rhythm

二、緣由與目的

什麼要合作研究衛生害蟲的生殖生理

國際間的合作不但可加速共同開發防治的新技術,也可互相提昇研究水準。在 91 年 11 月間臺灣昆蟲學者訪問捷克科學院昆蟲所後,雙方對合作計劃的推動已有很高的共識。目前我們與捷克科學院昆蟲所的 Dr. Ivan Gelbic 協商一個合作計劃,將針為世界性分布的衛生害蟲家蚊及德國蜚蠊分別去探究其生殖生理的調控機轉。希望藉此合作共同開發出合適的防治措施。

雄蚊的生殖副腺分泌物經由交尾傳送到雌蟲體內後,對雌蟲的影響分為五大類:分別是抑制雌蟲的交尾行為 (Craig, 1967)、加速卵成熟 (Lounibous, 1994)、刺激雌蟲產卵 (Leahy and Craig, 1965)、前產卵行為的改變 (由尋找寄主或食物轉變成尋找產卵地點 (Klowden and Blackmer, 1987)、以及活動行為日週律動的改變。前四項與其他昆蟲相似,這種影響可降低該雄蟲的精子的競爭壓力,以提高其適應值;最後

活動行為日週律動的改變是一個較有趣的發現。

Anopheles gambiae 的飛行活動呈現出 bimodal 的情況，一個高峰在暗期剛開始 (交尾活動期)，另一個高峰則出現在暗期結束 (取食與產卵期)。Jones and Gubbins (1977) 指出交尾後雌蟲的第一活動高峰明顯下降；Jones (1981) 與 Rowland (1989) 也有類似的結果。Jones and Gubbins (1978) 進一步發現第一活動高峰活動量的變化與雄蚊的副腺分泌物傳送到雌蟲有關。另一方面，在家蚊的研究中也發現雄蚊的副腺的萃取物確實會造成 *Cules quinquefasciatus* 與 *Cx. pallens* 的活動改變 (Chiba *et al.*, 1990, 1992; Jones and Gubbins, 1979)。

由此可知雖然雄蚊並非疾病的載體，然而由於其副腺分泌物會改變雌蟲的行為活動，Fernandez and Klowden (1995) 指出添加青春激素可以提高雄蚊副腺蛋白質的量，有必要對雄蚊副腺蛋白質的內分泌調控做更深入的研究，其成果可以落實在實際的防治工作上。這個部份我們打算跟捷克科學院合作，借助他們在蚊子內分泌學多年的研究心得與成果必定可以將雄蚊副腺蛋白質與雌蟲活動行為日週律動的改變的關係釐清。

此外，本研究室常期針對德國蜚蠊的生殖行為與活動行為的日週律動進行一系列的實驗，初步結果發現德國蜚蠊雌蟲交尾後的行為活動的日週律動會消失，我們稱此現象為掩蓋效應 (masking effect)。從蚊子的例子中我們聯想到是否德國蜚蠊雄蟲副腺蛋白質會影響雌蟲活動行為日週律動的表現？因此在本次的計劃中我們打算探討副腺蛋白質對德國蜚蠊行為的影響，包括生殖、與活動行為的日週律動兩方面。

什麼是生殖副腺蛋白質？

副腺是昆蟲生殖系統的一部份。雌性副腺分泌物會進入輸卵總管 (oviduct)，這種分泌物在美洲蜚蠊 American cockroach *Periplaneta Americana* 與雌蟲卵鞘的形成有關 (Koepe *et al.*, 1985)；膜翅目針刺類 Aculeata 的副腺已特化成毒腺 (venom glands) (Adiyodi and Adiyodi, 1975)；胎生雙翅目副腺稱特化成乳腺 (milk gland)；Leopold and Degrugillier (1973) 將家蠅 *Musca domestica* 的雌性副腺移除後並不影響產卵與 fecundity，但 Fertility 卻下降至平常的百分之一不到，因為精子無法進入卵中受精。Degrugillier and Leopold (1976) 進一步指出 *Musca domestica* 雌蠅的副腺分泌物可能具有改變受精孔 (micropyle, 精子進入卵的通道) 結構與參與 acrosomal reaction 的功能。最近的研究在地中海果實蠅 *Ceratitis capitata* 的雌性副腺分泌物中含有抗菌的蛋白質 (ceratotoxins)，這種物質會在產卵時進入卵中。Lung *et al.* (2001) 指出黃果蠅的雄蟲在交尾時也會傳送抗菌蛋白進入雌蟲體內，推測其功能為保護精子。

雄蟲副腺分泌物的生化功能主要有二：第一是供給卵產生的營養來源並提供精子以便受精，藉此提高該雄蟲的適存值。第二則是保護儲精囊 (spermatheca) 中的精子。雄蟲副腺分泌物的生理功能是具有潤滑的功能以加速精包的運送與排出，例如 *M. sanguinipes* 雄蟲副腺分泌的一種醣蛋白 LHPI (Cheeseman and Gillott, 1988; 1989)。另一個生理功能是使精子去活化 (incapacitation)，Harshman and Prout, (1994) 指出果蠅的雄蟲副腺分泌物會使雌蟲生殖道中另一隻雄蟲的精子活性被抑制，藉此

提高該雄蟲的適應值。另外 Passen and Happ (1995) 研究發現 mealworm beetle *Tenebrio molitor* 雄蟲副腺分泌物中的一種 B-protein 在氨基酸序列比上跟果蠅及蛾類的費洛蒙鍵結蛋白質 (pheromone binding protein) 很相似,推測可能與費洛蒙的傳送有關。

雄蟲副腺分泌物與精子競爭的關係

研究顯示包括雙翅目 (Diptera) 鱗翅目、鞘翅目 (Coleoptera) 直翅目 (Orthoptera) 的昆蟲在交尾過程中傳遞的雄蟲副腺分泌物會明顯地改變雌蟲的行為, Gillott and Friedel (1977) 將其分為提高雌蟲生殖力 (fecundity enhancing substances, FES) 與抑制雌蟲交尾 (receptivity-inhibiting substances, RIS) 兩類, 提高雌蟲生殖力的物質會加快雌蟲排卵與產卵的速度, 而抑制雌蟲交尾物質則是降低雌蟲再交尾的意願, 兩者都是減少該雄蟲與另一雄蟲的精子競爭 (sperm competition) 壓力, 藉以確保雌蟲所產的卵都可以被自身的精子受精。在蚊子的研究中發現雌蚊交尾後行為會產生改變, 交尾前常出現在雄蚊出沒的地方, 交尾後則傾向尋找食物與產卵的地點。

Lefevre and Jonsson (1962) 發現黃果蠅的雄性副腺分泌物對雄蟲的精子取代 (sperm displacement) 能力的表現 (即與該雄蟲交尾的雌蟲之前曾與其它雄蟲交尾時, 該雄蟲之精子的競爭力) 是必需的。然而 Gilchrist and Partridge (2000) 比較無法產生精子之雄蟲 (即該雄蟲交尾時只傳遞副腺分泌物到雌蟲體內) 與正常雄蟲的精子取代 (sperm displacement) 的能力時 (即與該雄蟲交尾的雌蟲之前曾與其它雄蟲交尾時, 該雄蟲之精子的競爭力), 發現無法產生精子之雄蟲的精子取代力較差, 顯示精子的存在對雄蟲的精子取代力有一定的影響力。到目前為止雄性副腺分泌物對交尾時傳遞精包的昆蟲在精子傳遞上扮演何種角色仍不清楚, 而在果蠅的研究中顯示雄性副腺分泌物會提高雌蟲的產卵率及降低雌蟲的性接受度 (receptivity) (Herndon and Wolfner, 1995)。其它昆蟲的研究指出雄性副腺分泌物可能具有抑制雌蟲性慾 (antiaphrodisiac) 的功用 (Mann, 1984)。在鱗翅目的研究中則發現雌蟲的交尾囊 (bursa copulatrix) 上帶有張力受器 (stretch receptors), 該張力受器在雌蟲交尾時, 當精包通過會傳遞訊號抑制雌蟲費洛蒙 (pheromone) 的產生 (Giebultowicz *et al.*, 1991), 他們推測藉此可以避免雌蟲再產生費洛蒙去吸引其它雄蟲前來交尾; Kingan *et al* (1993) 指出 corn earworm *Helicoverpa zea* 交尾雌蟲停止合成費洛蒙, 可能與雄蛾的副腺分泌物有關。

副腺蛋白質合成的調控因子

Herndon *et al.* (1997) 指出交尾時只有當雄蟲副腺分泌物被傳送到雌蟲時, 該交尾雄蟲才會再合成副腺蛋白質, 而以青春激素或蛻皮激素處理也可刺激副腺蛋白質的合成。

Wigglesworth (1936) 指出雄蟲副腺活性的內分泌受咽喉側腺 (corpora allata, CA) 調控, 進而推測青春激素 (Juvenile hormone, JH) 會影響雄蟲副腺的發育。然而早期的研究有兩個問題, 一是將雄蟲的咽喉側腺切除後, 再加以青春激素處理, 這並不

能證明青春激素直接作用在雄蟲副腺。其次是蟲體的重量、不同蛋白質含量的變異、以及放射性標定的使用，青春激素到底作用在雄蟲副腺分泌物的那個成分上很難確定。利用體外 (in vitro) 培養雄蟲副腺的技術發現雄蟲副腺中特定蛋白質的產生受青春激素調控 (Gillott and Venkatesh, 1985; Gillot and Gaines, 1992; Ismail and Gillott, 1995)。

有些研究則指出蛻皮激素 (20-hydroxyecdysone) 也會影響雄蟲副腺的活性，Koolman *et al* (1979) 首先在 blowfly *Calliphora vicina* 雄蟲的精巢 (testes) 上測到蛻皮激素；Loeb *et al.* (1984) 也在 tobacco budworm 雄蟲的精巢中測到蛻皮激素。其它研究則發現雄蟲副腺可以合成蛻皮激素，例如蟋蟀 *Gryllus bimaculatus* (Bressel *et al.*, 1990; Hoffmann and Wagemann, 1994; Weidner *et al.*, 1992)。在蝗蟲 *M. sanguinipes* 的研究中發現雄蟲副腺中蛻皮激素的量以及合成速率在性成熟的不同時期有所不同，而且剛交尾後的雄蟲比尚未交尾的雄蟲來的高。Sridevi *et al* (1988) 與 Ismail and Dutta-Gupta (1990) 分別指出 *Spodoptera litura* 及 *Chilo partellus* 雄成蟲中的蛻皮激素會刺激雄蟲副腺中總蛋白質的合成，然而 Gillott (1996) 發現蛻皮激素會刺激或抑制 *M. sanguinipes* 雄蟲副腺中特定蛋白質的合成，高濃度有刺激作用而低濃度卻有相反的效果。此外 Gillott (1996) 也發現以青春激素處理時雄蟲副腺中特定蛋白質的合成表現剛好相反。

雌蟲生殖狀態 (reproductive status) 與荷爾蒙量 (titers) 的關係

Hodgetts *et al* (1977) 發現黃果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 全蟲體 (whole-body) 的蛻皮激素的量在羽化後有上升的趨勢，而此趨勢與卵成熟的過程相符合。在交尾的過程中雄果蠅的副腺分泌物傳遞到雌蟲體內 (Chen, 1984; 1991)，而分泌物中的一種 sex-peptides 會刺激產卵、降低雌蟲再交尾的意願、以及刺激青春激素的生合成 (Kubli, 1996; Moshitzky *et al.*, 1996)。Harshman *et al.* (1999) 研究指出雌蟲交尾過後 12-24 小時之全蟲體蛻皮激素的量比剛交尾後明顯上升，但是如果與不產生副腺蛋白質的雄蟲交尾時雌蟲之蛻皮激素的量則沒有上升。進一步調查發現雌蟲交尾過後血液中蛻皮激素的量下降，推測可能是雄蟲副腺蛋白質刺激卵成熟及卵黃蛋白的合成，而卵黃蛋白攝取血液中的蛻皮激素並釋入卵黃生成期 (vitellogenesis) 中的卵細胞 (oocytes) 中。

蜚蠊的生殖狀態 (reproductive status) 與荷爾蒙量 (titers) 的關係

研究指出蜚蠊雌蟲的卵巢對於青春激素的生成有顯著且動態的影響 (Schal *et al.*, 1997; Tobe and Stay, 1985)。例如 Rankin and Stay (1984) 發現一種胎生的蜚蠊 *Diploptera punctata* 成長中的卵巢會刺激咽喉側腺產生更多青春激素，但成熟的卵巢卻出現抑制咽喉側腺活性的效應 (Rankin and Stay, 1985; Stay *et al.*, 1980)。這種情況也出現在另一種卵胎生的蜚蠊 *Nauphoeta cinerea* (Lanzrein *et al.*, 1981)；當這兩種蜚蠊雌蟲的卵巢被切除時，無論該雌蟲交尾與否，其青春激素的量都顯著下降。然而 Holbrook *et al* (2000) 指出德國蜚蠊處女雌蟲的卵巢被切除時，其青春激素的

表現與未切除卵巢的處女雌蟲相似，而且切除卵巢的處女雌蟲的 colleterial glands (即雌蟲的副腺)中累積了豐富的蛋白質，因為這些蛋白質的產生是由青春激素調控，佐證了切除卵巢並不會使青春激素的量下降

蜚蠊雌蟲的卵巢會合成與累積大量的蛻皮激素 (Stay *et al.*, 1984; and Pascual *et al.* 1992)，而卵巢中的濾泡細胞是蛻皮激素合成的位置 (Zhu and Lanzrein, 1984)。德國蜚蠊為卵胎生，其 gonadotrophic cycle 主要由青春激素調控 (Gadot *et al.*, 1989)，其特殊處是雌蟲無論交尾與否其青春激素都表現出週期性的變化，也都有卵細胞成熟與產出卵鞘的現象。Pascual *et al.* (1992) 指出德國蜚蠊雌蟲在 gonadotrophic cycle 期間卵巢中的蛻皮激素的量會有變動。

德國蜚蠊雌蟲青春激素的產生受交尾、高品質飲食、社會互動 (social interaction)、與成長中的卵巢等因素而增加 (Schal *et al.*, 1997)。以青春激素類似物處理提高雌蟲體內青春激素的量，進而促使雌蟲加速取食，可使雌蟲吃進帶有殺蟲劑的毒餌。Piulachs *et al.* (1992) 認為青春激素在雄性副腺成熟的內分泌調控上扮演重要的角色。Lluís *et al.* (1996) 指出德國蜚蠊的青春激素會刺激副腺蛋白的分泌與累積，而這些物質與精包的形成有關。德國蟑螂之生殖副腺在形態上，則包含有射精囊 (ejaculatory pouch)、射精管 (ejaculatory duct)、uricose gland、蕈狀體之小囊 (utricles of the mushroom-shape body) 和球狀腺 (conglobate gland)。其中蕈狀體之小囊是由 12 種不同型態之小管所組成 (Feliubadaló *et al.*, 1996)。而這 12 種小管可藉由其外部型態、在浸泡 Ring's solution 後所呈現出之透明感、及其分泌物在被亞甲基藍 (methylene blue) 染色後之狀態，來加以區分。

德國蜚蠊活動行為的日週律動 (locomotor circadian rhythm) 的表現：

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)。

綜合來說，本計劃的目的是研究德國蜚蠊生殖副腺對雌蟲生殖表現與行為活動日週律動的關係。

三、結果討論

德國蜚蠊雄成蟲精巢與生殖副腺之形態：

德國蜚蠊雄成蟲的生殖系統包括 Testis (T)、 Seminal vesicles (SV)、 及副腺三大部分，副腺分為 Uricose glands (UG)； Utricles (U) 及 Conglobate gland (C) 三部分 (圖一)。在形態上，雄成蟲的 UG 為具有五個分支的管狀構造，末端匯集成同一開口與 Ejaculatory pouch (EP) 相連，內含有白色不透明分泌物 (圖二)。U 為透明管狀構造，開口位於 EP (圖一)，根據文獻指出根據其形狀、管徑大小及長度可分為 12 種 (Feliubadalo, *et al.*, 1996)。CG 則為一長管折疊成球狀構造 (圖三)，開口於 Ejaculatory duct。於形態觀察上發現，雄成蟲羽化後副腺 (UG、U、CG) 會隨日齡增加而增大，約至第 7 天其副腺組織達到最終大小。羽化第 0 天 SV 不易觀察且呈半透明狀，至第 2-3 天之後 SV 之大小已達原來之三倍，其顏色呈現銀白色不透明狀；羽化第 0 天 UG 呈透明管狀，內部沒有任何白色分泌物，第 1-3 天其分泌細胞開始製造白色分泌物填充於管內，至第 5 天其管內以充滿白色分泌物並於 7-10 天可達到最高量；U 及 CG 之大小則隨日齡逐漸增大，至第 7-10 天可達到最終大小。

德國蜚蠊雄成蟲精巢與生殖副腺之蛋白質分析：

蛋白質分析發現雄成蟲除 Testis 外，UG；U；CG；EP 及 Seminal vesicles (SV) 內的分泌物隨日齡逐漸累積增多，約至第 5 日齡時達到最高量。UG 有一條主要的 band，其大小約為 40KD，第 0 天含量極低，第 1 天-第 5 天逐漸累積到達最高量 (圖四 A)。U 有四條主要的 bands，其大小約為 60KD、21KD、20 KD 及 19 KD，第 0 天-第 2 天累積量極低，第 3 天後累積量明顯增加。第 5 天可累積到達最高量 (圖四 B)。EP 含有兩條主要的 bands，其大小均小於 15KD，第 0 天不含此分泌物，第 1 天-第 5 天逐漸累積到達最高量 (圖四 C)。CG 含有六條主要的 bands，60、40、19、15、13、6KD，第 0 天不含此分泌物，第 1 天-第 2 天逐漸累積，第 3 天後累積量明顯增加，到第 7 天達最高量 (圖四 D)。Testis 內所含有的蛋白質並無累積現象 (圖四 E)；SV 第 1 天沒有任何蛋白質存在，雖然第 2 天-第 10 天可見蛋白質累積，但因其含量過少而無法比較其與日齡之關係 (圖四 F)。

由德國蜚蠊雄成蟲精巢與生殖副腺之蛋白質分析可知，在第 5 天即可累積足夠的蛋白質分泌物於各腺體內，但就形態上而言，約至第 7 天-第 10 天可發育至最終大小。根據初步的交尾試驗可知，少數第 2 天-第 3 天的雄成蟲可與雌蟲成功交尾，但交尾率遠低於第 10 天以後的雄成蟲 (確定性成熟之雄成蟲)，關於其副腺內所含有的副腺蛋白量與成功交尾之關係仍待探討。

德國蜚蠊雌成蟲卵巢與生殖副腺之形態及蛋白質分析：

德國蜚蠊雌蟲有一對卵巢，左右對稱，於羽化後第 6 天發育成熟；其生殖副腺位於卵巢下方，其發育速度與卵巢之發育相同，羽化第 0 天時其為透明管狀不含白色蛋白分泌物，第 1 天-第 6 天管內逐漸累積白色蛋白質分泌物。當卵鞘形成後，卵巢因排除成熟卵而變小，副腺內的蛋白可能用於製造卵鞘而減少，所以此時副腺

再度呈透明管狀。以甲基藍染色後觀察其副腺形態，其呈樹枝狀，並以二岔分支的方式生長，共有 32 個分支（圖五）。

雌蟲副腺蛋白的分析並無見主要的蛋白質 bands，以 SDS-PAGE 無法觀察總蛋白質含量與日齡之關係。關於雌蟲副腺蛋白的研究可能必須改用光度計來計算蛋白質的含量，以便進一步研究雌蟲副腺蛋白與其生殖或生物時鐘之關係。

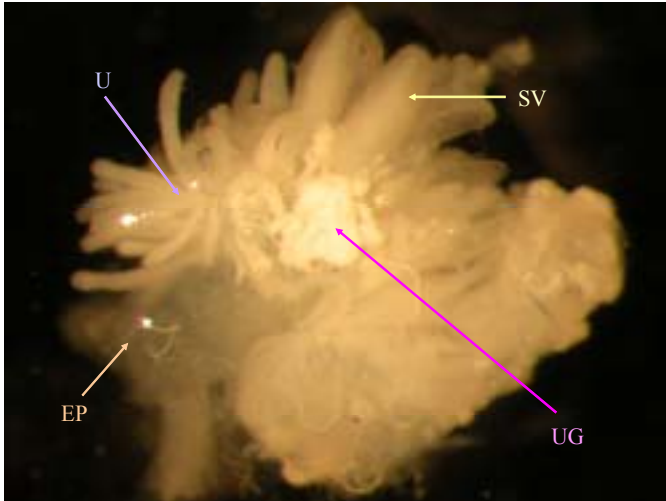
分析比較雄成蟲之 Testis、SV、ARG (UG + U + EP)、UG、U、CG 及雌蟲 Spermatheca 的蛋白質發現，雄蟲主要的副腺蛋白質會經由交尾傳送到雌蟲的 Spermatheca（圖六），也許這些副腺蛋白有影響雌蟲的活動、再交尾率、壽命以及抑制交尾的功能。

德國蜚蠊雄成蟲 Acp70A-like protein 之研究：

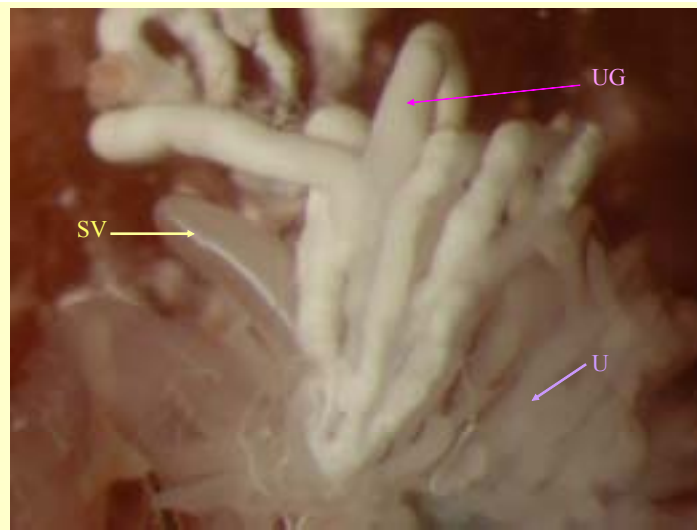
選取數種於 *Drosophila melanogaster* 已知的副腺蛋白來比對德國蜚蠊睪丸或生殖副腺中是否含有相似之物質。結果發現德國蜚蠊及雙紋姬蜚蠊的睪丸中可以偵測到類似 Acp70A 之蛋白質。由圖七可見德國蜚蠊、雙紋姬蜚蠊、熱帶家蚊、*D. melanogaster*、及 *D. viridis* 副腺蛋白質分析的比較，由 total protein 的可知德國蜚蠊及雙紋姬蜚蠊之睪丸和副腺可能含有相同的蛋白質分佈。與三種 *Drosophila* 屬的果蠅相比較相距勝遠。熱帶家蚊可能抽取量過低而無法看到蛋白質分佈。

利用 Western blotting 的方法分析 Acp70A-like protein 的結果顯示，德國蜚蠊、雙紋姬蜚蠊在約 50KD 處可偵測到類似 Acp70A 之蛋白質，故稱其為 Acp70A-like protein。*D. nasuta* 在約 45KD 處可偵測到兩種大小之 Acp70A-like protein，且其偵測訊號較德國蜚蠊、雙紋姬蜚蠊強，可能是因為蜚蠊與 *D. melanogaster* 親源較遠，所以蛋白質的相似度極低造成抗體辨識能力降低（圖八）。*D. melanogaster* 之 Acp70A 為 Sex-peptide，大小約 4KD，其功能在於抑制以交尾雌蟲的交尾接受度和促進以交尾雌蟲的產卵速率。結果中並無看到 *D. melanogaster* 之 Acp70A 是因為 4KD 太小已跑出膠體。其大小與本實驗發現之 Acp70A-like protein 之大小相差很多，須待序列鑑定後經比對使可知到期是否與 Acp70A 為相同之蛋白質。進而設計實驗分析其功能，以瞭解其對德國蜚蠊、雙紋姬蜚蠊雌蟲之影響。

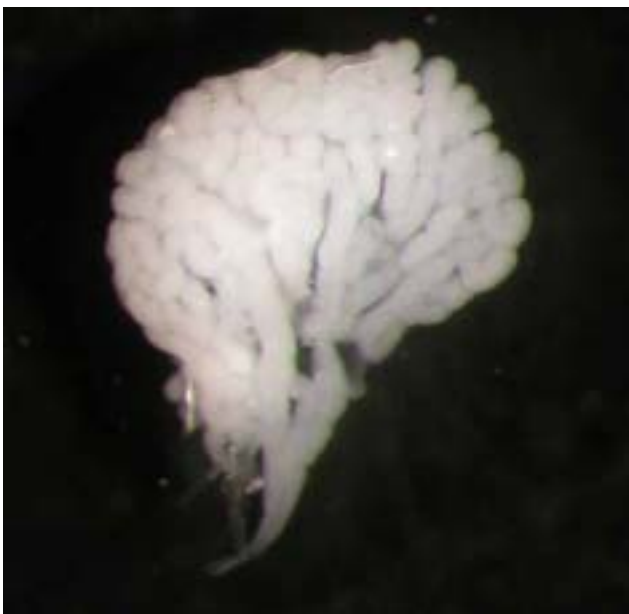
經由 Western blotting 的確定後，利用 Whole mount 偵測其分佈的位置，利用 *D. melanogaster* 作為對照，可以明顯得知 Acp70A 分佈於 *D. melanogaster* 副腺之分泌細胞內，而德國蜚蠊則分佈於睪丸中，圖九的實驗組組與對照組比較可知，其睪丸中可利用來自 *D. melanogaster* 之 Acp70A 抗體偵測到 Acp70A-like protein 之存在。



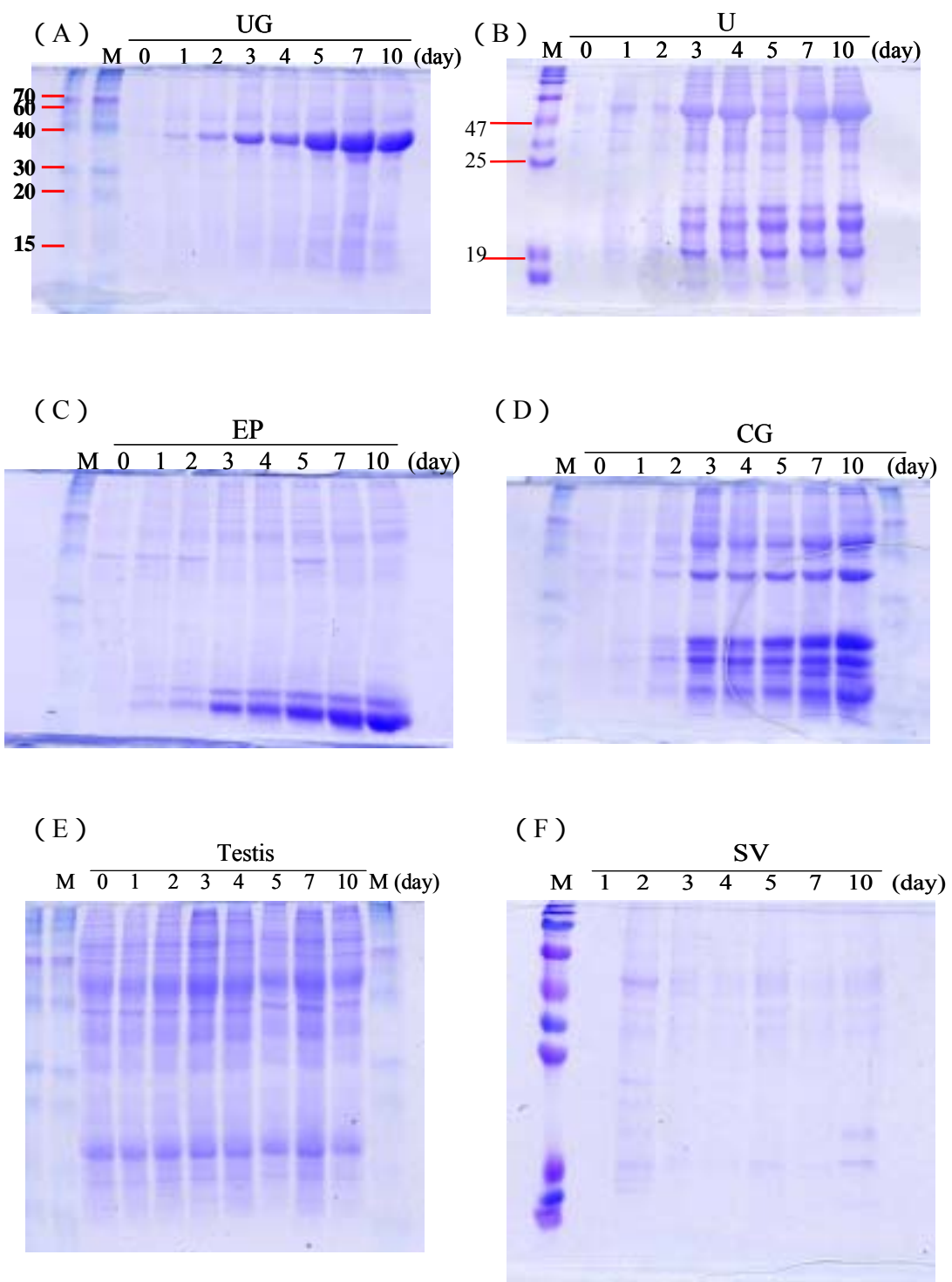
圖一、德國蜚蠊雄成蟲之 Seminal vesicles (SV)、及副腺，副腺分為 Uricose glands (UG) ; Utricles (U)及 Conglobate gland (C)。



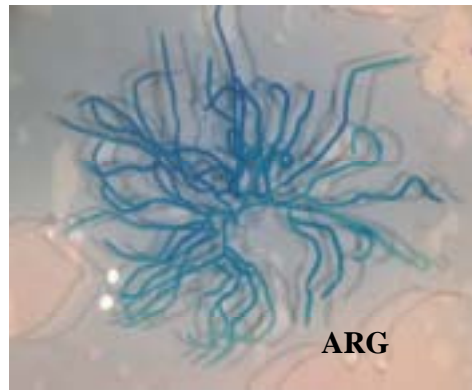
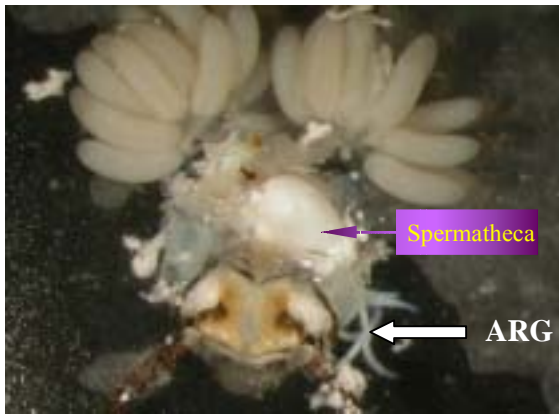
圖二、德國蜚蠊雄成蟲之 Seminal vesicles (SV)及已達性成熟之 Uricose glands (UG),其管內部已出滿白色不透明之分泌物。



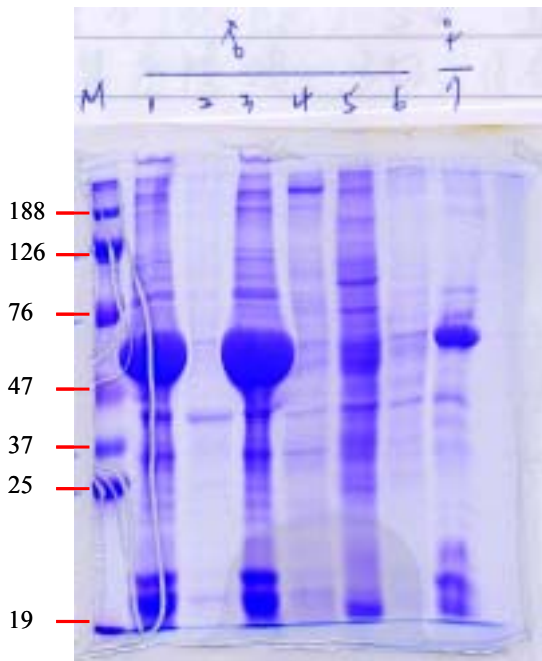
圖三、德國蜚蠊雄成蟲之已達性成熟之 Conglobate gland (C)。



圖四、德國蜚蠊雄成蟲 UG、U、EP、CG、Testis 與 SV 之蛋白質分析。

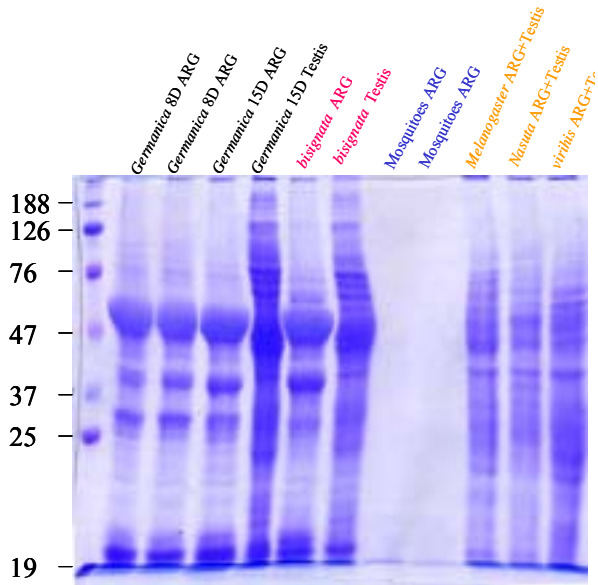


圖五、德國蜚蠊雄成蟲之卵巢、Spermatheca 及副腺。

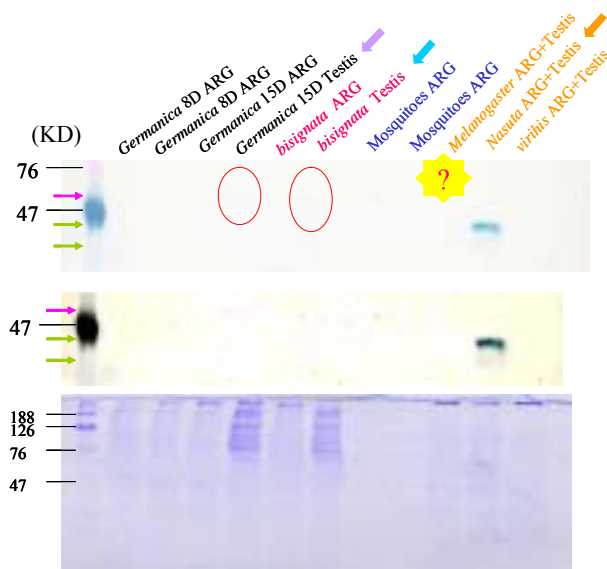


圖六、德國蜚蠊雄成蟲之 Testis、SV、副腺及雌蟲 Spermatheca 之比較，。

1. ARG (UG + U + EP)
2. UG
3. U
4. CG
5. 1♂ Testis
6. 2 SV
7. Spermatheca



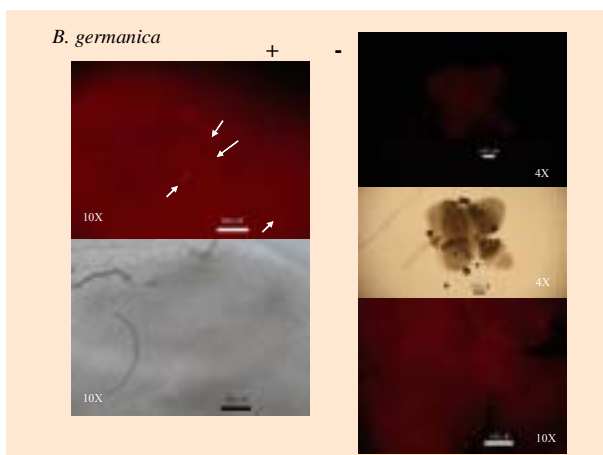
圖七、德國蜚蠊雄成蟲、熱帶家蚊腺及三種 *Drosophila* 屬果蠅之副腺比較。



圖八、德國蜚蠊、雙紋姬蜚蠊雄成蟲、熱帶家蚊腺及三種 *Drosophila* 屬果蠅之 Acp70A Western Blotting 結果。

* 1° antibody: Acp70A (1:800)
(From Swissland)

* Acp70A antibody was made from *Drosophila melanogaster*.



圖九、利用 whole mount 標定德國蜚蠊 Testis 之 Acp70A-like protein。

四、計畫成果自評

經過第一年對於德國蜚蠊副腺蛋白質的初步研究，已確定德國蜚蠊雄成蟲及雌成蟲的生殖副腺的位置及構造，並可細分雄成副腺的各部構造。花費一年的時間完成第一階段的實驗，以及收集累積足夠的基礎資料以作為進一步的實驗基礎。進而瞭解德國蜚蠊雄成蟲之副腺蛋白是否對交尾後之雌蟲活動、再交尾率、交尾意願等造成影響。

五、參考文獻

- Adlakha, V., S. Bhargava, and M. K. K. Pillai. 1976. Histological and histochemical studies on the male accessory glands of culicine mosquito, *Aedes aegypti*. Entomon. 1: 101-110.
- 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.
- Beck, S. D. 1980. Insect photoperiodism., 2nd ed. Academic, New York.
- Birkhead, T. R., and A. P. Moller. 1998. Sperm Competition and Sexual Selection, Academic Press, London.
- 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.
- Bressel, H. U., N. Shahab, and F. Romer. 1990. Ecdysteroids secretion by several tissues in adult males of *Gryllus bimaculatus*. Invert. Reprod. Develop. 18: 106.
- Cheeseman, M. T., and C. Gillott. 1988. Identification and partial characterization of the long hyaline gland in the male grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. Insect Biochem. 18: 135-144.
- Chen, P. S. 1984. The functional morphology and biochemistry of male accessory glands and their secretion. Annu. Rev. Entomol. 29: 233-255.
- Chen, P. S. 1991. Biochemistry and molecular regulation of male accessory gland secretions in *Drosophila* (Diptera). Annales de la Societe Entomologique de France 27: 231-244.
- Cheeseman, M. T., and C. Gillott. 1989. Long hyaline gland discharge and multiple spermatophore formation by the male grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. Physiol. Entomol. 14: 257-264.
- Chen, P. S. 1984. The functional morphology and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. Annu. Rev. Entomol. 29: 233-255.
- Chiba, Y., Y. Yamamoto, C. Shimizu, M. Zaitzu, M. Uki, M. Yoshii, and K. Tomioka.

1990. Insemination-dependent modification of circadian activity of the mosquito, *Culex pipiens pallens*. *Zool. Sci.* 7: 895-906.
- Chiba, Y., Y. Shinkawa, M. Yoshii, A. Matsumoto, K. Tomioka, and S. Y. Takahashi. 1992. A comparative study on insemination dependency of circadian activity pattern in mosquito. *Physiol. Entomol.* 17: 213-218.
- 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.
- Couche, G. A., and C. Gillott. 1990. Structure of the accessory reproductive glands of the male migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Morphol.* 203: 219-245.
- Craig, G. B. Jr. 1967. Mosquitoes: female monogamy induced by male accessory gland substance. *Science* 156: 1499-1501.
- Davey, K. G. 1985. The male reproductive tract. In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Vol. 1 (Embryogenesis and reproduction), G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (eds), Pergamon Press, Elmsford, New York, pp.1-14.
- Dernandez, N. M., and M. J. Klowden. 1995. Male accessory gland substances modify the host-seeking behavior of gravid *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 41: 965-970.
- Feliubadaló, E., L. Vilaplana and X. Belles. 1996. Morphology and protein pattern of reproductive glands of male *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Eur. J. Entomol.* 93: 211-221.
- Gadot, M., E. L. Burns, C. Schal. 1989. Juvenile hormone biosynthesis and oocyte development in adult female *Blattella germanica*: Effects of grouping and mating. *Arch. Insect Physiol.* 26: 665-670.
- 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^L. *Science* 270: 811-815.
- Giebultowicz, J. M., A. K. Raina, E. C. Uebel, R. L. Ridgway. 1991. Two-step regulation of sex-pheromone decline in mated gypsy moth females.- *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 16: 95-105.
- Giebultowicz, J. M. 2000. Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 769-793.
- Gilchrist, A. S., and L. Partridge. 2000. Why it is difficult to model sperm displacement in *Drosophila melanogaster*: The relation between sperm transfer and copulation duration *Evolution* 54: 534-542.

- Gillott, C, and T. Friedel. 1977. Fecundity-enhancing and receptivity-inhibiting substances produced by male insects: A review. *Adv. Invert. Reprod.* 1: 199-218.
- Gillett, J. D., A. J. Haddow, and P. S. Corbet. 1962. The sugar-feeding-cycle in a cage-population of mosquitoes. *Entomol. Exp. Appl.* 5: 223-232.
- Gillott, C, and K. Venkatesh. 1985. Accumulation of secretory proteins in the accessory reproductive glands of the male migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Invert. Reprod. Develop.* 27: 65-71.
- Gillott, C, and S. B. Gaines. 1992. Endocrine regulation of male accessory gland development and activity. *Can. Entomol.* 124: 871-886.
- Gillott, C. 1988. Arthropoda—Insecta, In: *Reproductive Biology of Invertebrate*, Vol. 3 (Accessory Sex Glands), K. G. Adiyodi and R. G. Adiyodi.(eds), Oxford and IBH, New Delhi, pp.319-471.
- Gillott, 1996. Male insect accessory glands: Functions and control of secretory activity. *Invert. Reprod. Develop.* 30: 199-205.
- Hardin, P. E. 2000. From biological clock to biological rhythms. *Genome Biol.* 1(4): 1023.1-1023.5.
- Harshman, L. G., and T. Prout. 1994. Sperm displacement without sperm transfer in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 48: 758-766.
- Harshman, L. G., A. M. Loeb, and B. A. Johnson. 1999. Ecdysteroid titers in mated and unmated *Drosophila melanogaster* females. *J. Insect Physiol.* 45: 571-577.
- Herndon, L. A., and M. F. Wolfner. 1995. A *Drosophila* seminal fluid protein, Acp26Aa, stimulates egg laying in females for 1 day after mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 10114-10118.
- Herndon, L. A., and T. Chapman, J. M. Kalb, S. Lewin, L. Partridge, M. F. Wolfner. 1997. Mating and hormonal triggers regulate accessory gland gene expression in male *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 43: 1117-1123.
- Hodapp, C. J., and J. C. Jones. 1961. The anatomy of the adult male reproductive system of *Aedes aegypti*. *Annu. Ent. Soc. Amer.* 54: 832-844.
- Hodgetts, R. B., B., Sage, and J. D. O'Connor. 1977. Ecdysone titers during postembryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology.* 60: 310-317.
- Hoffmann, K. H., M. Wagemann. 1994. Age dependency and tissue distribution of ecdysteroids in adult male crickets, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae) *Comp. Biochem. Physiol.* 109A: 293-302.
- Ismail, P. M., and A. Dutta-Gupta. 1990. Effect of 20-hydroxyecdysone and inhibitors on the protein synthesis in male accessory reproductive glands of *Chilo partellus*. *Biochem. Arch.* 6: 321-329.
- Ismail, P. M., and C. Gillott. 1995. 20-hydroxy-ecdysone and juvenile hormone

- regulation of specific protein synthesis in the male accessory reproductive gland of *Melanoplus sanguinipes*. J. Insect Physiol. 41: 9111-920.
- Jones, M. D. R., and S. J. Gubbins. 1977. Modification of circadian flight activity in the mosquito after insemination. Nature 268: 731-732.
- Jones, M. D. R., and S. J. Gubbins. 1978. Changes in the circadian flight activity in the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. Physiol. Entomol. 3: 213-220.
- Jones, M. D. R., and S. J. Gubbins. 1979. Modification of female circadian flight-activity by a male accessory gland pheromone in the mosquito *Cules pipiens quinquefasciatus*. Physiol Entomol. 4: 345-351.
- Jones, M. D. R. 1981. The programming of circadian flight-activity in relation to mating and the gonotrophic cycle in the mosquito, *Aedes aegypti*. Physiol. Entomol. 6: 307-313.
- Kingan, T. G., P. A. Thomas-Laemont, A. K. Raina. 1993. Male accessory gland factors elicit change from 'virgin' to 'mated' behaviour in the female corn earworm moth, *Helicoverpa zea*. J. Exp. Biol. 183: 61-76.
- Klowden, M. J., and J. L. Blackmer. 1987. Humoral control of pre-oviposition behaviour in the mosquito, *Aedes aegypti*. J. Insect Physiol. 33: 689-692.
- Koolman, J., K. Scheller, and D. Bodenstern. 1979. Ecdysteroids in the adult male blowfly *Callophora vicina*. Experimentia 35: 134-135.
- Kotrba, M. 1996. Sperm transfer by spermatophore in Diptera: new results from the Diopsidae. Zool. J. Linn. Soc. 117: 305-323.
- Kubli, E. 1996. The *Drosophila* sex peptides: pheromone involved in reproduction. Adv. Develop. Biochem. 4: 99-128.
- Lai, F. J. 1982. Structure of the accessory glands and duplex of the internal male reproductive system of *Calpododes ethlius* (Hesperiidae, Lepidoptera). Can. J. Zool. 60: 1202-1215.
- Lanzrein, B., R. Wilhelm, and J. Buschor. 1981. On the regulation of the corpora allata activity in adult females of the ovoviviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. Juvenile Hormone Biochemistry (ed. By G. E. Pratt and G. T. Brooks), pp. 147-160. Elsevier / North-Holland Biomedical Press, New York.
- Leahy, M. G., and G. B. J. Accessory gland substance as a stimulant for oviposition in *Aedes aegypti*. Mosq. News. 25: 448-452.
- Lefevre, G., and U. B. Jonsson. 1962. Sperm transfer, storage, displacement, and utilization in *Drosophila melanogaster*. Genetics 47: 1719-1736.
- Lluís, V., M.-D. Piulachs, and X. Bellés. 1996. The conglobate gland of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera. Blattellidae). Maturation, juvenile hormone dependency and changes during spermatophore formation. Invert. Reprod.

- Develop. 29: 167-172.
- Loeb, M. J., E. P. Brandt, and M. J. Birnbaum. 1984. Ecdysteroids production by testes of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*, from last larval instar to adult. *J. Insect Physiol.* 30: 375-381.
- Lounibos, L. P. 1994. Variable egg development among *Anopheles* (Nyssorrhynchus): control by mating? *Physiol. Entomol.* 19: 51-57.
- Lung, O., L. Kuo, and M. F. Wolfner. 2001. *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates. *J. Insect Physiol.* 47: 617-622.
- Mann, T. 1984. *Spermatophores*. Springer-Verlag, Berlin.
- Matsuda, R. 1976. *Morphology and evolution of the insect abdomen*, Pergamon Press Elmsford, New York.
- Moshitzky, P., I. Fleischmann, N. Chaimov., P. Saudan, S. Klauser, E. Kubli, and S. W. Applebaum. 1996. Sex-peptide activates juvenile hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster* corpus allata. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32: 363-374.
- Moore-Ede, M. C., F. M. Sulzman and C. A. Fuller. 1982. *The clocks that time us*. Harvard Univ. Press, Cambridge. 448pp.
- Paesen, G. C., M. B. Schwartz, M. Peferoen, F. Weyda, and G. M. Happ. 1992. Amino acid sequence of Sp, a structural protein to the spermatophore of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *J. Biol. Chem.* 267: 18852-18857.
- Paesen, G. C., and G. M. Happ. 1995. The B proteins secreted by the tubular accessory sex glands of the male mealworm beetle, *Tenebrio molitor*., have sequence similarity to moth pheromone-binding proteins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25: 401-408.
- Pascual, N., X. Creda, B. Benito, J. TomÁs, M. D. Piulachus, and X. Bellés. 1992. Ovarian ecdysteroid levels and basal oocyte development during maturation in the cockroach *Blattella germanica* (L.). *J. Insect Physiol.* 38: 339-348.
- Piulachs, M. D., J. L. Maestro, X. Bellés. 1992. Juvenile hormone production and accessory reproductive gland development during sexual maturation of male *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *Comp. Biochem. Physiol. (A)* 102: 477-480.
- Price, C. S. C. 1997. Conspecific sperm precedence in *Drosophila*. *Nature* 388: 663-666.
- Ramalingam, S., and G. B. Jr Craig. 1978. Fine structure of the male accessory glands in *Aedes triseriatus*. *J. Insect. Physiol.* 24: 251-259.
- Rankin, S. M., and B. Stay. 1984. The changing effect of the ovary on rates of juvenile hormone synthesis in *Diploptera punctata*. *General and Comparative*

- endocrinology. 54: 382-388.
- Rankin, S. M., and B. Stay. 1985. Ovarian inhibition of juvenile hormone synthesis in the viviparous, *Diploptera punctata*. General comparative and endocrinology. 59: 230-237.
- Riemann, J. G., and B. J. Thorson. 1979. Ultrastructure of the accessory glands of the Mediterranean flour moth. J. Morphol. 159: 355-392.
- Rowland, M. 1989. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* associated with insemination, blood-feeding, oviposition and nocturnal light intensity. Physiol. Entomol. 14: 77-84.
- Saunders, D. S. 1976. Insect Clocks. Pergamon Press, Oxford. 279 pp.
- Saunders, D. S. 1982. Insect clocks, 2nd ed, Pergamon, Oxford.
- Schal, C., G. L. Holbrook, J. A. S. Bachmann, and V. L. Sevala. 1997. Reproductive biology of the Germany cockroach, *Blattella germanica*: juvenile hormone as a pleiotropic master regulator. Arch. Biochem. Physiol. 35: 405-426.
- Sommer, S. H. 1975. Experimental investigation of the circadian locomotor activity of *Blattella germanica* L. (Dictyoptera: Blattellidae). Biol. Zentralbl. 94: 455-467.
- Sridevi, R., P. Bajaj, A. Dutta-Gupta. 1988. Ecdysteroid stimulated protein synthesis in the male accessory reproductive gland of *Spodoptera litura*. Invert. Reprod. Develop. 14: 177-186.
- Stay, B., T. Friedel, S. S. Tobe, and E. C. Mundall. 1980. Feedback control of juvenile hormone synthesis in cockroach: possible role for ecdysterone. Science 207: 898-900.
- Stay, B., L. S. Ostedgaard, S. S. Tobe, A. Strambi, and E. Spaziani. 1984. Ovarian and haemolymph titres of ecdysteroid during the gonadotrophic cycle in *Diploptera punctata*. I. Insect Physiol. 30: 643-651.
- Takahashi, J. S. 1995. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. Annu. Rev. Neurosci. 18: 531-553.
- Tobe, S. S., B. Stay. 1985. Structure and regulation of the corpus allatum. Adv. in Insect Physiol. 18: 305-432.
- Wedell, N. 1993. Spermatophore size in bushcrickets: Comparative evidence for nuptial gifts as a sperm protection device.
- Weidner, K., M. Clasz, H. Rieck, and K. H. Hoffmann. 1984. Development changes in ecdysteroids biosynthesis in vitro during adult life and embryogenesis in a cricket *Gryllus*. Invert. Reprod. Develop. 21: 129-139.
- Wigglesworth, V. B. 1936. The function of the corpus allatum in the growth and

reproduction of *Rhodnius prolixus*. *Quart. J. Microsc. Sci.* 79: 91-120.

Zhu, X. X., and B. Gfeller. 1984. Distribution of free and conjugated ecdysteroids between follicle cell sheath and ooplasm in oocytes of the cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Experientia* 40: 496-498.