



東方果實蠅對於甲基丁香油的嗅覺反應性研究現況

莊依奇、吳紀瑄、許如君*

國立臺灣大學昆蟲學系 106 臺北市大安區羅斯福路四段 1 號

* 通訊作者 email: juchun@ntu.edu.tw

收件日期：2020 年 7 月 6 日

接受日期：2021 年 4 月 24 日

線上刊登日期：2021 年 6 月 9 日

摘 要

東方果實蠅 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) 是臺灣重要果樹害蟲，也是國內鮮果外銷的主要限制因素。以含毒甲基丁香油 (methyl eugenol) 誘殺雄蠅降低雌蟲交配機會，是管理東方果實蠅族群的重要方法，且是確保維持非疫區的資材。但含使用毒甲基丁香油做為主要的防治手段已近 60 多年，以往亦有文獻提及田間存在對甲基丁香油不敏感之東方果實蠅雄蟲。田間到底是否存在對甲基丁香油不敏感雄蠅進而降低監測或防治效率，至今還無法取得結論。近年來，因為分子技術的發達，學者嘗試將東方果實蠅嗅覺基因的表現量差異關連出對甲基丁香油的吸引反應行為，以及透過雄果實蠅觸角對於嗅覺反應的蛋白基因表現量差異，深入瞭解東方果實蠅對甲基丁香油的嗅覺機制。基於東方果實蠅對甲基丁香油反應的嗅覺基因的表現，可以更快讓我們應用於國內的防治研究，以供未來瞭解國內東方果實蠅嗅覺基因對甲基丁香油的反應，開發田間對甲基丁香油不敏感蟲的偵測工具，早期偵測此現象以因應可能監測及防治的破口，所造成巨大的損失。

關鍵詞：東方果實蠅、甲基丁香油、甲基丁香油不敏感性、嗅覺蛋白。

前 言

東方果實蠅 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) 屬雙翅目 (Diptera) 果實蠅科 (Tephritidae) 昆蟲，主要分布於亞洲、南太平洋與大洋洲；在臺灣全島都有分布，主要集中於低海拔及平地 (Lin, 2008)。根據紀錄，東方果實蠅在臺灣危害的寄主植物共有 32 科 89 種，其中危害的常見經濟栽培果樹種類就高達 53 種 (Lin, 2008)，包括臺灣主要外銷的水果，例如：柑橘、芭樂、芒果、葡萄與木瓜等經濟作物。根據估計，東方果實蠅危害臺灣果樹面積達到 22 萬公頃，若缺乏適當的防治，將使水果受害率達到

10~30% (Zheng, 2005)；以目前 2020 年，臺灣水果產值 976 億元計算，果實蠅的損失危害將達 97.6~292.8 億元以上。造成臺灣果實蠅為害嚴重的原因主要有下列幾點：(1) 食物來源充足。台灣中低海拔地區寄主果樹種類很多，並且經過市場產期調節，延長了水果的生長供應期，使全年皆有寄主植物可供果實蠅生長。(2) 台灣氣候條件適宜，終年可繁殖生長。(3) 果園疏於管理。農產品在盛產期價格低迷，使被害及劣果未能適當處理，且農村農民老齡化，使廢棄果園面積增加等因素，成為果實蠅繁殖的溫床，造成東方果實蠅發生嚴重 (Zheng, 2005)。

以含毒甲基丁香油 (methyl eugenol) 誘殺東

方果實蠅雄蠅，降低雌蟲交配機會，是管理東方果實蠅種群的重要方法。國內亦是以甲基丁香油配合乃力松 (naled) 大量誘殺東方果實蠅作為區域共同防治。但以含毒甲基丁香油作為主要防治手段已近 60 多年，研究證實可以篩選出對甲基丁香油不敏感的雄蠅 (Shelly, 1997)，且有文獻提及田間存在對甲基丁香油不敏感之東方果實蠅雄蟲 (Chen *et al.*, 2019a)。田間到底是否存在對甲基丁香油不敏感雄蠅而降低監測或防治效率，至今還無法取得結論。行為反應的測量會有生物性的變異及要有相當大的反應才能被量測；好在，近幾年定序技術及生物資訊的發達，針對反應相關的一群基因的研究不再遙不可及。本文以國內東方果實蠅的防治現況開始，探討甲基丁香油對東方果實蠅的重要性，以及論述利用探討嗅覺相關基因對化學物的反應，進而瞭解哪些嗅覺基因與甲基丁香油具有相關性，藉以闡述東方果實蠅對於甲基丁香油的嗅覺反應性研究現況。

國內東方果實蠅的防治現況

目前在臺灣防治東方果實蠅主要的方法有三類，除了直接噴灑殺蟲藥劑之外，另有配合誘引物分的兩種誘殺方法：(1) 含毒蛋白水解物防治法。由於東方果實蠅在交配及卵發育期，有攝取蛋白質類物質的需求，而蛋白質中的胺基酸被認為是取食刺激物，因此以含毒蛋白質水解物多混以賜諾殺 (spinosad) 及芬殺松 (fenthion) 等藥劑，誘引雄雌蟲前來取食，再予以毒殺。但因其誘引有效範圍小、期限短及容易被雨水沖刷而失去誘效，因此有關食物誘引物質及方法改良也有許多研究 (Liu and Huang, 2000; Chien and Dong, 2001; Zheng, 2005; Huang, 2017)。另一較為普遍的方法為 (2) 含毒的甲基丁香油誘殺雄蟲。此為目前政府區域防治採用的方法，用以大量誘殺田間雄蟲以降低與雌蟲交配的機會，使雌蟲產下子代數量減少，減少對果實的危害 (Zheng, 2005)。但使用含毒甲基丁香油做為防治東方果實蠅的方法，卻有著潛在的問題，亦即除了還未性成熟之東方果實雄蠅外，即使是性成熟的東方果實雄蠅族群並不是全部都會被甲基丁香油所誘引。早在 1963 年，在日本即發現過去使用滅雄法防治果實蠅後，部分地區無法防治成功；造成果實蠅族群回升的原因之一，可能就是存在著對甲基丁香油不敏感的雄蠅個體 (Christenson, 1963; Koyama *et al.*, 1984)。因此，當此類東方果實雄蠅個體，於田間使用含毒甲基丁香油進行防治篩選而

存活下來的雄蠅，使甲基丁香油不敏感的比例提升，將造成後續東方果實蠅未來防治上的潛在問題。

甲基丁香油為什麼對東方果實雄蠅重要

甲基丁香油為一種類丙醇類 (phenylpropanoid)，從丁香酚 (eugenol) 衍生而來，在許多植物為常見物質，尤其是在香料與藥用植物中 (Koezuka *et al.*, 1986)。目前研究發現有多達 80 科 450 種植物成分中含有甲基丁香油或類似物質作為花香的成分 (Tan *et al.*, 2010; Tan and Nishida, 2012)。近年來，學者認為果實蠅雄蟲對於甲基丁香油的劑量反應與日齡有關，並呈現 S 型曲線，大部分雄蠅都是在性成熟之後，才會對甲基丁香油產生強烈反應，並且持續一段時間 (Wong *et al.*, 1989; Shelly *et al.*, 2008)。研究發現性成熟的果實蠅雄蠅，對於甲基丁香油有強烈反應，主要集中於早晨至正午之間，晚間誘引的效力則大幅降低 (Steiner, 1952; Shelly *et al.*, 2010)。

根據現有研究推測，甲基丁香油或許是東方果實蠅性費洛蒙的前驅物 (Shelly and Dewire, 1994)。由觀察東方果實蠅雄蠅體內的直腸腺 (rectal gland)，發現構造與昆士蘭果實蠅 (*Bactrocera tryoni*) 用以製造性費洛蒙的直腸腺非常類似，因此推測兩者是具有相同功能 (Fletcher, 1968, 1969)。果實蠅雄蠅的直腸腺萃取物，對於雌蠅有強烈吸引力，即使雄蟲並無取食過甲基丁香油依然如此，因此推斷果實蠅雄蠅直腸腺為生產或儲存性費洛蒙的部位 (Kobayashi *et al.*, 1978)。進一步分析取食過甲基丁香油的果實蠅雄蟲的直腸萃取物，發現甲基丁香油會被代謝成結構與甲基丁香油相似的類苯丙醇類物質，主要為 (E)-coniferyl alcohol (ECF) 與 2-allyl-4,5-dimethoxyphenol (DMP) 兩種代謝物 (Tan and Nishida R, 1996)。在果實蠅攝入甲基丁香油 5 至 15 分鐘後，會被轉換成可於體內血體腔與直腸腺中暫時累積的 ECF 與 DMP，而此兩種代謝物將在黃昏時，雄蠅進行求愛及交配行為期間被釋放出來 (Hee and Tan, 2006; Wee and Tan, 2007a; Hiap *et al.*, 2018)。攝取過甲基丁香油的果實蠅雄蟲比未攝食的雄蟲更容易吸引雌蠅 (Hong and Nishida, 1998; Wee *et al.*, 2007b)；不只是取食人工合成的甲基丁香油後發現此現象，雄蟲於自然界中攝取含有甲基丁香油成分的植物，例如：花粉與水果，也會提高對雌蟲的吸引力 (Shelly, 2000; Shelly and Edu, 2007)。

取食過甲基丁香油的雄蠅在交尾成功率上明顯高於未取食的雄蠅，而在大型網籠試驗中，也觀察到同樣的現象 (Shelly and Dewire, 1994; Tan and Nishida R, 1996)。雄蠅若吸食含有天然性甲基丁香油的木瓜或阿勃勒 (*Cassia fistula*) 的花朵後，同樣產生對雌蠅有較高的吸引力 (Shelly, 2000, 2001)。除了交尾成功率外，取食過甲基丁香油的雄蠅，其體內蛋白質含量也會增高，全身性蛋白質含量可能是雄蠅整體素質的重要指標。蛋白質含量高低，可能會影響求偶過程中雄性費洛蒙的產生和能量消耗，從而導致取食過甲基丁香油的雄蠅總體交配成功率更高 (Reyes-Hernández *et al.*, 2019)。取食甲基丁香油時間的長短會影響交尾的成功率，在 30 秒取食甲基丁香油的雄蠅即表現了交尾上的優勢 (Shelly and Dewire, 1994)。對於尚未性成熟的雄蠅及幼蟲取食甲基丁香油後，並沒有提高往後的交尾率，羽化成蟲後的直腸腺也沒有甲基丁香油的代謝物 (Shelly and Nishida, 2004)。由以上研究可知，東方果實蠅藉由受到甲基丁香油類似物誘引並取食，對於增加雄蠅的交尾競爭力或許有其顯著效果，因此東方果實蠅如何利用嗅覺機制作為偵測費洛蒙與其誘引反應行為的相關研究，將是解決目前使用含毒甲基丁香油無法有效防治東方果實蠅的方向。

東方果實雄蠅對於甲基丁香油誘引的不敏感反應

甲基丁香油等化學物質，雖然已被證實對於 *Bactrocrea* 屬的果實雄蠅具有強烈吸引力，以做為有效誘殺防治的策略；但以現行的方式來看效果並非永久，某些種類果實蠅在取食過誘引物後，再次攝取的頻率會降低 (Shelly *et al.*, 2010)，導致使用甲基丁香油做為防治東方果實蠅的手段一直有其瓶頸。東方果實蠅在取食過甲基丁香油任何長短時間後，再次取食甲基丁香油的頻率都較未取食過的低，更發現有些雄蠅在取食過後 35 天，仍然對甲基丁香油表現低度反應 (Shelly and Dewire, 1994)。此外，若在幼蟲時期接觸過甲基丁香油，可能會降低成蟲對甲基丁香油的反應 (Manoukis *et al.*, 2018)。除了因為曾經取食過甲基丁香油，而造成對誘引物反應低的現象以外，也有研究指出自然界存在天生對於甲基丁香油不敏感的雄蠅 (Shelly, 1997)。

為了驗證此類對於甲基丁香油不敏感族群是否有遺傳性，可能會影響後續東方果實蠅的防治問題，

有研究指出使用不含毒的甲基丁香油作為篩選工具，成功篩選出甲基丁香油不敏感性東方果實蠅品系，並進行繁殖後兩代，發現子代中不敏感雄蟲的比例與未篩選品系的不敏感性雄蟲比例有顯著的差異，以及篩選品系於田間試驗與室內網籠試驗中之回補率，都遠低於對照組 (Liu *et al.*, 2017; Shelly, 1997)。由上述研究中推論，對甲基丁香油不敏感性狀是可以遺傳的，若持續使用含毒甲基丁香油誘引做為東方果實蠅防治方法，對於甲基丁香油不敏感族群比例將持續擴大，因此了解甲基丁香油不敏感族群與敏感族群的行為及基因表現差異性，將是目前重要的課題。

觸角氣味蛋白對於昆蟲嗅覺的重要性

昆蟲對於嗅學的感知主要集中於觸角 (antenna) 及大顎鬚 (maxillary palps) 上 (Hansson and Stensmyr, 2011)；在大範圍的覓食與性費洛蒙的偵測方面，則以觸角為主要關鍵的器官 (Haverkamp *et al.*, 2018)。昆蟲嗅覺辨認機制則是利用嗅覺蛋白來辨認氣味分子，已知參與昆蟲氣味分子接收的嗅覺蛋白主要有下列幾項：氣味結合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs)、氣味降解酶 (odorant degrading enzymes, ODEs)、氣味受體 (odorant receptors, ORs)、離子型受體 (ionotropic receptors, IRs) 與感覺神經元膜蛋白 (sensory neuron membrane proteins, SNMPs) (Leal, 2013)。自 1980 年代以後，文獻探討顯示，氣味結合蛋白已被認定為第一個參與嗅覺感受的蛋白質 (Vogt and Riddiford, 1981)。昆蟲的氣味結合蛋白目前在美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 已有紀錄 2000 多個基因，包括了七個目 (Order) 的昆蟲嗅覺相關基因 (Ventur and Zhou, 2018; Zhou *et al.*, 2010a)。

氣味結合蛋白以蛋白質序列分類可分為四組，分別為 Classic OBPs、Plus-C OBPs、Minus-C OBPs 與 Atypical OBPs (Ventur *et al.*, 2014)。其中 Plus-C OBPs 在豌豆蚜蟲 (*Acyrtosiphon pisum*) 及雙翅目昆蟲中被發現 (Zhou *et al.*, 2010b)。因為，昆蟲行為因應目的不同，而需接收不同的氣味分子與適應不同的棲息環境，形成了昆蟲氣味結合蛋白的多樣性 (Hekmat-Safe *et al.*, 2002)。在不同目昆蟲間的氣味結合蛋白序列有非常大的差異，藉由分析不同模式昆蟲的氣味結合蛋白

系統發育關係樹，發現昆蟲的氣味結合蛋白序列保守性非常有限 (Zhou *et al.*, 2010b)。部分氣味結合蛋白序列高度保守，表示具有非常重要的生理功能，例如：豌豆蚜的幾個氣味結合蛋白序列和其它蚜蟲的相似度非常高，差異不超過 2~3 個胺基酸，這些蛋白質是用來辨認做為警戒費洛蒙的 (E)- β -Farnesene (E β f) 及做為性費洛蒙的荊芥內酯 (nepetalactone) 等物質 (Qiao *et al.*, 2009)。昆蟲的氣味結合蛋白通常對於特定物質有敏感性及選擇性，以影響其進行覓食或是交配等行為。

東方果實蠅的觸角嗅覺蛋白基因表現

在東方果實蠅嗅覺反應中，觸角佔有相當重要的地位，對於甲基丁香油誘導關係的行為研究或是基因表現差異分析，大多著重於觸角上基因的探討 (Zheng *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015; Brito *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016)。研究指出截去東方果實蠅觸角或大顎鬚進行誘引試驗顯示，截去大顎鬚後的雄蠅，仍有 80% 會被甲基丁香油所吸引；但截去觸角的雄蠅，則只剩 17.6% 會被甲基丁香油吸引 (Chieng *et al.*, 2018)，顯示觸角對雄蠅接收甲基丁香油的訊號至關重要。

東方果實蠅觸角上已被成功鑑定了 20 個氣味結合蛋白、5 個化學感應蛋白 (chemosensory proteins, CSPs)、35 個氣味受體、14 個離子型受體與 4 個感覺神經元膜蛋白 (Liu *et al.*, 2016)。進一步分析東方果實蠅雌雄成蟲各組織器官的嗅覺基因表現量差異，發現部分氣味結合蛋白僅在單一組織器官中高度表現 (Chen *et al.*, 2019b)。例如：僅在觸角表現的氣味結合蛋白共有 7 個，Bdorlush、BdorOBP19a-1、BdorOBP19a-2、BdorOBP59a、BdorOBP83b、BdorOBP84a-1 與 BdorOBP84a-2。在頭部表皮表現的氣味結合蛋白有 7 個，包括 BdorOBP19b、BdorOBP56h-1、BdorOBP44a、BdorOBP47a-1、BdorOBP99c-7、BdorOBP58 和 BdorOBP56h-2。在足部則有 4 個氣味結合蛋白表現量較高，BdorOBP56g、BdorOBP57e、BdorOBP28a-1 和 BdorOBP49a (Chen *et al.*, 2019b)。而有些氣味結合蛋白則會在多個組織高度表現，例如：在觸角與頭部表皮表現較高的氣味結合蛋白 BdorOBP83a、BdorOBP69a、BdorOBP28a-1 和 BdorOBP28a-2。在足部與頭部表皮 BdorOBP56g、BdorOBP57e 和 BdorOBP49a 同樣有較高的表現量 (Chen *et al.*, 2019b)。這些在不

同組織器官的氣味蛋白基因表現量差異，或許都值得進一步研究它們是否有助於化學感應的嗅覺功能。

東方果實蠅對甲基丁香油的相關性敏感性測試驗中，發現甲基丁香油不敏感蟲與敏感蟲的嗅覺基因表現量有很大的差異 (Wu *et al.*, 2016)；其中藉由比較兩者觸角的蛋白質表現量分析，總共鑑定出 4622 種蛋白質，其中有 277 種蛋白質表現具顯著差異，總共有 192 種上調表現 (up-regulated) 與 85 種下調表現 (down-regulated) (Liu *et al.*, 2017)。氣味嗅覺蛋白基因 BdorOBP83a-2 在性成熟的東方果實蠅中高度表現 (Wu *et al.*, 2015)，利用 RNAi (RNA interference) 技術抑制了蛋白基因 BdorOBP83a-2 基因在觸角的 50% 表現量後，分析觸角電位圖譜 (electroantennogram, EAG)，發現觸角對甲基丁香油的反應活性降低了 60~70%；而再次使用甲基丁香油作為引誘劑，發現東方果實蠅到達放置點的飛行時間增加了 30~50%，顯示蛋白基因 BdorOBP83a-2 對於辨認甲基丁香油有重要的化學感覺和行為功能反應 (Wu *et al.*, 2016)。除此之外，嗅覺蛋白基因 BdorOBP2 在甲基丁香油敏感蟲上也有高度的表現量，藉由比較性成熟與否之雄性成蟲觸角基因表現量，可以發現蛋白基因 BdorOBP2 在性成熟雄成蟲的觸角中的表現量遠高於未性成熟的雄蟲觸角表現量 (Liu *et al.*, 2017)。經由 RNAi 技術將 BdorOBP2 基因表現沉默後，對於甲基丁香油的反應會大幅下降，因此推測此基因為東方果實蠅偵測性費洛蒙或其他化學誘引劑的關鍵功能性基因 (Liu *et al.*, 2017)。

此外，雌雄果實蠅除了在氣味結合蛋白基因表現上有明顯差異外，在雄蟲嗅覺氣味受體上也有部分基因高度表現 (Nakagawa *et al.*, 2005)；這些嗅覺相關基因在雄蟲高度的表現，推測可能跟性費洛蒙的接收有關。將取食過甲基丁香油之雄蟲與未取食之雄蟲進行嗅覺基因表現量比較後，發現取食甲基丁香油之雄蟲的嗅覺基因 BdorOrco 在半小時內大量表現，可高達 11 倍的表現量差異，進一步利用 RNAi 技術將 BdorOrco 嗅覺基因沉默後，發現其對甲基丁香油的反應行為大幅下降，因此推測 BdorOrco 嗅覺基因為東方果實蠅重要性費洛蒙偵測的功能性基因 (Zheng *et al.*, 2012)。同樣利用 RNA-Seq 和 RT-qPCR 進行分析雄蠅觸角基因表現量，在甲基丁香油刺激後的差異，發現受刺激後大量表現了兩個嗅覺氣味受體基因 BdorOR63a-1 和 BdorOR88a。進一步，利用 RNAi 技術沉默兩個氣

味受體基因，發現沉默蛋白基因 **BdorOR63a-1**，後雄蟲對於甲基丁香油的吸引力沒有顯著影響。但沉默蛋白基因 **BdorOR88a** 後，發現對甲基丁香油有吸引反應的雄蟲數量顯著減少了。因此，推論蛋白基因 **BdorOR88a** 嗅覺氣味受體對於雄蟲對甲基丁香油的吸引反應可能相當重要 (Liu *et al.*, 2018)。

嗅覺機制相關基因的運用與討論

嗅覺對於昆蟲生活行為來說非常重要，研究影響嗅覺表現的相關基因也是了解昆蟲行為的關鍵，清楚的理解昆蟲的嗅覺機制與特異性基因表現，在未來更有助於理解農業害蟲或者病原媒介昆蟲的行為，利用於成為用於害蟲防治的工具。而利用昆蟲氣味結合蛋白做為防治應用是目前昆蟲防治努力的方向，例如：蚜蟲的氣味結合蛋白基因 **OBP3** 對於警界費洛蒙 **Eβf** 表現出良好的親和力，而利用轉基因阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 表現 **Eβf** 促使蚜蟲對其較野生型阿拉伯芥更有趨散反應 (Beale *et al.*, 2006; Qiao *et al.*, 2009)。大蒜素 (diallyl trisulfide, DATS) 常被用為麥蛾 (*Sitotroga cerealella*) 防治上，是藉由 DATS 影響嗅覺基因 **SerPBP** 對於麥蛾性費洛蒙 (**7Z**, **11E** - hexadecadien-1-ol acetate, HAD) 的結合親和力 (Ma *et al.*, 2016)；研究也指出當性成熟麥蛾暴露於充滿 HDA 和 DATS 的環境時，DATS 會顯著降低麥蛾對於 HDA 的反應。此藉由干擾雌蛾對於的性費洛蒙的識別，降低雌蛾和雄蛾的交配行為，提供防治麥蛾新的想法。

結 論

氣味結合蛋白是昆蟲嗅覺信號開始傳遞的關鍵功能蛋白質，尤其是昆蟲的氣味結合蛋白與其他的生物相比是非常獨特的。若是以昆蟲的氣味結合蛋白做為病蟲害防治的研究突破口，或做為蟲害偵測的標的基因，用以阻止或干擾昆蟲嗅覺氣味受體，或許可以改變昆蟲的繁殖或是攝食行為，而達到防治目的，並做為目前在防治上遇到難題的解決方向。利用昆蟲天生的習性行為來研發防治方法，與化學性的防治方法相比，對於環境而言更加友善。目前許多文獻與研究皆指出有多種相關性的嗅覺氣味結合蛋白或嗅覺氣味受體的表現，都會影響東方果實蠅對甲基丁香油吸引反應與傳遞路徑，藉由進一步分析這些差異性表現的嗅覺氣味結合蛋白及氣味結合受

體，或許可以找到與甲基丁香油吸引反應相關的關鍵性基因，更加清楚了解東方果實蠅對嗅覺反應的化學訊息傳遞路徑，藉以找出適合的方針，用以改善目前使用含毒甲基丁香油誘殺東方果實蠅遇到的防治困難與瓶頸。

引用文獻

- Beale MH, Birkett MA, Bruce T.J.A., Chamberlain K, Field LM, Huttly AK, Martin JL, Parker R, Phillips AL, Pickett JA, Prosser IM, Shewry PR, Smart LE, Wadhams LJ, Woodcock CM, Zhang YH.** 2006. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 10509-10513.
- Brito NF, Moreira MF, Melo AC.** 2016. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. *J Insect Physiol* 95: 51-65.
- Chen PH, Wu WJ, Hsu JC.** 2019a. Detection of male oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) susceptibility to naled- and fipronil-intoxicated methyl eugenol. *J Econ Entomol* 112: 316-323.
- Chen XF, Xu L, Zhang YX, Wei D, Wang JJ, Jiang HB.** 2019b. Genome-wide identification and expression profiling of odorant-binding proteins in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 31: 100605.
- Chien CC, Dong YJ.** 2001. Evaluation of trapping effectiveness of the improved McPhail trap for oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) (Diptera: Tephritidae). *Formosan Entomol* 21: 65-75. (in Chinese)
- Chiang AC, Hee AK, Wee SL.** 2018. Involvement of the antennal and maxillary palp structures in detection and response to methyl eugenol by male *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *J Insect Sci* 18: 1-5.
- Christenson LD.** 1963. The male annihilation technique in the control of fruit flies. pp 31-35. In: Hall SA ed. *New Approaches to Pest Control and Eradication, Advances in*

- Chemistry Vol 41. American Chemical Society.
- Fletcher B.** 1968. Storage and release of a sex pheromone by the Queensland fruit fly, *Dacus tryon*; (Diptera: Trypetidae). *Nature* 219: 631-632.
- Fletcher B.** 1969. The structure and function of the sex pheromone glands of the male Queensland fruit fly, *Dacus tryoni*. *J Insect Physiol* 15: 1309-1322.
- Hansson BS, Stensmyr MC.** 2011. Evolution of insect olfaction. *Neuron* 72: 698-711.
- Haverkamp A, Hansson BS, Knaden M.** 2018. Combinatorial codes and labeled lines: How insects use olfactory cues to find and judge food, mates, and oviposition sites in complex environments. *Front Physiol* 9: 49. doi: 10.3389/fphys.2018.00049
- Hee A, Tan KH.** 2006. Transport of methyl eugenol-derived sex pheromonal components in the male fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 143: 422-428.
- Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, McKinney AJ, Tanouye MA.** 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 12: 1357-1369.
- Hiap WW, Wee SL, Tan KH, Hee AKW.** 2018. Phenylpropanoid sex pheromone component in hemolymph of male Carambola fruit fly, *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). *Chemoecology* 29: 25-34.
- Hong TK, Nishida R.** 1998. Ecological significance of male attractant in the defence and mating strategies of the fruit fly, *Bactrocera papayae*. *Entomol Exp Appl* 89: 155-158.
- Huang YB, Wu CC, Chiang MY.** 2017. Food bait control of oriental fruit flies, the enemy of fruit trees. *Agriculture World* 409: 25-27. (in Chinese)
- Kobayashi RM, Ohinata K, Chambers DL, Fujimoto MS.** 1978. Sex pheromones of the oriental fruit fly and the melon fly: mating behavior, bioassay method, and attraction of females by live males and by suspected pheromone glands of males. *Environ Entomol* 7: 107-112.
- Koezuka Y, Honda G, Tabata M.** 1986. Genetic-control of phenylpropanoids in *Perilla-frutescens*. *Phytochemistry* 25: 2085-2087.
- Koyama J, Teruya T, Tanaka K.** 1984. Eradication of the oriental fruit fly (Diptera, Tephritidae) from the Okinawa islands by a male annihilation method. *J Econ Entomol* 77: 468-472.
- Leal WS.** 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu Rev Entomol* 58: 373-391.
- Lin M.** 2008. The ecology and control technology of oriental fruit fly. *Tainan Agricultural News* 65: 1-6. (in Chinese)
- Liu H, Chen ZS, Zhang DJ, Lu YY.** 2018. BdorOR88a modulates the responsiveness to methyl eugenol in mature males of *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Front Physiol* 9: 987. doi: 10.3389/fphys.2018.00987
- Liu H, Zhao XF, Fu L, Han YY, Chen J, Lu YY.** 2017. BdorOBP2 plays an indispensable role in the perception of methyl eugenol by mature males of *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Sci Rep* 7: 15893-15896.
- Liu YC, Huang RH.** 2000. The attractiveness of improved molasses attractant to *Bactrocera dorsalis*. *Plant Prot Bull* 42: 223-233. (in Chinese)
- Liu Z, Smagghe G, Lei Z, Wang JJ.** 2016. Identification of male- and female-specific olfaction genes in antennae of the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). *PLoS One* 11: e0147783.
- Ma M, Chang MM, Lei CL, Yang FL.** 2016. A garlic substance disrupts odorant-binding protein recognition of insect pheromones released from adults of the angoumois grain moth, *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Mol Biol* 25: 530-540.
- Manoukis NC, Cha DH, Collignon RM, Shelly**

- TE.** 2018. *Terminalia* larval host fruit reduces the response of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) adults to the male lure methyl eugenol. *J Econ Entomol* 111: 1644-1649.
- Nakagawa T, Sakurai T, Nishioka T, Touhara K.** 2005. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science* 307: 1638-1642.
- Qiao H, Tuccori E, He X, Gazzano A, Field L, Zhou JJ, Pelosi P.** 2009. Discrimination of alarm pheromone (E)-beta-farnesene by aphid odorant-binding proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 39: 414-419.
- Reyes-Hernández M, Thimmappa R, Abraham S, Pagadala Damodaram KJ, Pérez-Staples D.** 2019. Methyl eugenol effects on *Bactrocera dorsalis* male total body protein, reproductive organs and ejaculate. *J Appl Entomol* 143: 177-186.
- Shelly TE.** 1997. Selection for non-responsiveness to methyl eugenol in male oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Fla Entomol* 80: 248-253.
- Shelly TE.** 2000. Flower-feeding affects mating performance in male oriental fruit flies *Bactrocera dorsalis*. *Ecol Entomol* 25: 109-114.
- Shelly TE.** 2001. Feeding on papaya flowers enhances mating competitiveness of male oriental fruit flies, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Proc Hawaii Entomol Soc* 35: 41-47.
- Shelly TE, Dewire A.L.M.** 1994. Chemically mediated mating success in male oriental fruit-flies (Diptera, Tephritidae). *Ann Entomol Soc Am* 87: 375-382.
- Shelly TE, Edu J.** 2007. Exposure to the ripe fruit of tropical almond enhances the mating success of male *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Fla Entomol* 90: 757-758.
- Shelly TE, Nishida R.** 2004. Larval and adult feeding on methyl eugenol and the mating success of male oriental fruit flies, *Bactrocera dorsalis*. *Entomol Exp Appl* 112: 155-158.
- Shelly TE, Edu J, McInnis D.** 2010. Pre-release consumption of methyl eugenol increases the mating competitiveness of sterile males of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in large field enclosures. *J Insect Sci* 10: 8.
- Steiner LF.** 1952. Methyl eugenol as an attractant for oriental fruit fly. *J. Econ. Entomol.* 45: 241-248.
- Tan KH, Nishida R.** 1996. Sex pheromone and mating competition after methyl eugenol consumption in the *Bactrocera dorsalis* complex. pp 147-154. In: McPheron BA and Steck GJ. (eds). *Fruit Fly Pests - A World Assessment of Their Biology and Management*. CRC Press, London.
- Tan KH, Nishida R.** 2012. Methyl eugenol: Its occurrence, distribution, and role in nature, especially in relation to insect behavior and pollination. *J Insect Sci* 12: 1-74.
- Tan KH, Tokushima I, Ono H, Nishida R.** 2010. Comparison of phenylpropanoid volatiles in male rectal pheromone gland after methyl eugenol consumption, and molecular phylogenetic relationship of four global pest fruit fly species: *Bactrocera invadens*, *B. dorsalis*, *B. correcta* and *B. zonata*. *Chemoecology* 21: 25-33.
- Venthur H, Mutis A, Zhou JJ, Quiroz A.** 2014. Ligand binding and homology modelling of insect odorant-binding proteins. *Physiol Entomol* 39: 183-198.
- Venthur H, Zhou JJ.** 2018. Odorant receptors and odorant-binding proteins as insect pest control targets: A comparative analysis. *Front Physiol* 9: 1163. doi: 10.3389/fphys.2018.01163
- Vogt RG, Riddiford LM.** 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293: 161-163.
- Wee SL, Tan KH.** 2007a. Temporal accumulation of phenylpropanoids in male fruit flies, *Bactrocera dorsalis* and *B. carambolae* (Diptera: Tephritidae) following methyl

- eugenol consumption. *Chemoecology* 17: 81-85.
- Wee SL, Tan KH, Nishida R.** 2007b. Pharmacophagy of methyl eugenol by males enhances sexual selection of *Bactrocera carambolae*. *J Chem Ecol* 33: 1272-1282.
- Wong TT, McInnis DO, Nishimoto JI.** 1989. Relationship of sexual maturation rate to response of oriental fruit fly strains (Diptera: Tephritidae) to methyl eugenol. *J Chem Ecol* 15: 1399-1405.
- Wu Z, Lin J, Zhang H, Zeng X.** 2016. BdorOBP83a-2 mediates responses of the oriental fruit fly to semiochemicals. *Front Physiol* 7: 452.
- Wu Z, Zhang H, Wang Z, Bin S, He H, Lin J.** 2015. Discovery of chemosensory genes in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *PLoS One* 10: e0129794.
- Zheng M.** 2005. The control and strategy of oriental fruit fly. *The Development of Taiwan Citrus Industry*: pp 197-205. (in Chinese)
- Zheng W, Zhu C, Peng T, Zhang H.** 2012. Odorant receptor co-receptor Orco is upregulated by methyl eugenol in male *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *J Insect Physiol* 58: 1122-1127.
- Zheng W, Peng W, Zhu C, Zhang Q, Saccone G, Zhang H.** 2013. Identification and expression profile analysis of odorant binding proteins in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*. *Int J Mol Sci* 14: 14936-14949.
- Zhou JJ, Field LM, He XL.** 2010a. Insect odorant-binding proteins: Do they offer an alternative pest control strategy? *Outlooks Pest Manag* 21: 31-34.
- Zhou JJ, Vieira FG, He XL, Smadja C, Liu R, Rozas J, Field LM.** 2010b. Genome annotation and comparative analyses of the odorant-binding proteins and chemosensory proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 2: 113-122.
- 2015.** Survey and identification of bean pod borers, *Etiella* spp., in Taiwan. *Formosan Entomol* 35: 35-47. (in Chinese)
- Yen YP, Hwang JS, Hung CC, Chen HC, Lai JS.** 1988. Synthesis and field evaluation of sex pheromone of beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hübner). *Plant Prot Bull* 30: 303-309. (in Chinese)

The Research Atatus of Olfactory Reactivity to Methyl Eugenol in *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

Yi-Chi Chuang, Chi-Hsuan Wu, Ju-Chun Hsu*

Department of Entomology, National Taiwan University, No. 27, Lane 113, Sec. 4, Roosevelt Rd., Da'an Dist., Taipei City 106, Taiwan (ROC.)

* Corresponding email: juchun@ntu.edu.tw

Received: 6 July 2020 Accepted: 24 April 2021 Available online: 9 June 2021

ABSTRACT

The oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) is an important agricultural pest in Taiwan and is also the main limiting factor for fruit export. Using toxic methyl eugenol (ME) to trap male flies reduce their chances of mating with females is an important method for managing population numbers of oriental fruit flies and is a material to ensure the maintenance of epidemic-free areas. However, ME has been the main control method for more than 60 years. In the past, there are also documents mentioning the existence of oriental fruit fly males that are not sensitive to ME in the field. The male flies further reduce the efficiency of monitoring or control; so far, no conclusion can be reached. In recent years, due to the development of molecular technology, scholars have tried to link the differences in the expression levels of olfactory genes in oriental fruit flies with the behaviors related to the attraction response to ME and the differences in the expression levels of protein genes in the olfactory response through the antennae of males. In-depth understanding of the olfactory mechanism of oriental fruit flies on ME. Based on the performance of the olfactory genes of oriental fruit flies that respond to ME, it can be applied to domestic prevention and control research more quickly for future understanding of the response of oriental fruit flies to ME. A detection tool for ME insensitive insects, early detection of this phenomenon in response to possible monitoring and control breaches, prevent causing huge losses.

Key words: *Bactrocera dorsalis*, methyl eugenol, olfactory genes, odorant-binding protein