

探討—黃樟素、九層塔對果蠅的影響

國小教師組生物科第二名

台北市桃源國民小學

作者：廖進德、黃瑞達

一、研究動機

- (一)去年沙土中含有黃樟素，引起國內各界的注目和廣泛的討論，台大醫學院教授林仁混先生在73年10月12日民生報中指出黃樟素是弱致癌物質。
- (二)目前對於黃樟素的研究，大部分著重於對高等哺乳類動物——可致肝癌、胃癌、腫瘤……等。小部分研究細菌，發現可致突變。
- (三)用昆蟲來做此研究者甚少。黃樟素是否也能影響果蠅的生長、生殖或出現突變種呢？
- (四)國人飲食中常用的九層塔含有黃樟素，用來培養果蠅會怎樣？
- (五)用紫外線燈來處理在不同環境中長大的果蠅，結果如何？

二、研究目的

- (一)知道九層塔和黃樟素對果蠅生長、生殖的影響。
- (二)果蠅的子代是否對黃樟素具有忍受性。若有，忍受程度怎樣？
- (三)紫外線是否對在不同環境的子代具有不同程度的突變性。

三、研究設備器材

(一)設備：

- 1 自製恆溫培養箱一個——長90公分、寬42公分、高42公分，內有二個燈座和一個溫度調節控制器。
- 2 高溫高壓滅菌器一部。

(二)器材：

- 1 玉米培養基：酵母粉、蔗糖、洋菜、玉米粉、丙酸。

- 2 黃樟素、酒精、九層塔、乙醚、麻醉器具一套。
- 3 20 倍放大鏡和顯微鏡，牛奶瓶 300 個，棉花塞 300 個。
- 4 果蠅用 *Drosophila melanogaster*。（來自師大）

四、研究過程

(一)配製玉米培養基：

1 對照組：

- (1)蔗糖 66 克+玉米粉 66 克+酵母粉 20 克先混合—加水 200 ml 攪拌備用。
- (2) 800 ml 的水+ 18 克洋菜 \triangle 煮至洋菜溶解。
- (3)把(1)倒入(2)中，繼續煮到適當的粘度（5~15 分）然後加入 3 毫升的丙酸—高溫高壓滅菌。
- (4)瓶子，棉花塞先行滅菌完全後，把經滅菌的培養基趁熱倒入瓶內（約 2 公分高），共約可倒 20 瓶。
- (5)倒瓶後須置 2 天，待瓶內水汽消失，便可使用。

2 50 % 九層塔汁液玉米培養基：

九層塔汁液 500 毫升，取代 1—(2)的水，其餘方法同 1。

3 不同濃度的黃樟素玉米培養基：

做法同 1 但在滅菌前加入適量的黃樟素製成 10000 PPm，1000PPm，100 PPm，10 PPm，1 PPm，0.1 PPm，0.01 PPm 等九種不同濃度的培養基。（黃樟素可用 99 % 的酒精來稀釋）

(二)實驗過程：

1 定量九層塔中所含的黃樟素：

- (1)用 SP-20 光電比色計做波長掃描，找出黃樟素溶液最大吸光波長。
- (2)配用 1000 PPm，100 PPm，10 PPm，1 PPm，0.1 PPm，0.01 PPm 黃樟素的標準濃度溶液，測其吸光度，劃出標準曲線圖。
- (3)九層塔汁液離心後，取上層液用乙醚去掉葉黃素後測吸光度

- ，內插入標準曲線圖，得知含量爲 5 PPm。
2. 把野生型果蠅各10對，養在下列不同的培養基中，置於 26°C ± 0.5，共分10組。對照組，10000PPm，1000 PPm，100 PPm，50PPm，10 PPm，1 PPm，0.1 PPm，0.01 PPm 和九層塔，養至第五代。
 3. 觀察重點：
 - (1) 幼蟲—化蛹時間、羽化時間。
 - (2) 成蟲—體色，翅膀、剛毛、眼色、♀♂比例、數量。
 4. 對黃樟素的耐受性：
 - (1) 各組中的 F₁ 在 1000 PPm 中生長生殖情形。
 - (2) 各組中的 F₁ 在 100 PPm 中生長生殖情形。
 5. 將各組子代的 F₂ 和 F₃ 做 uv 照射處理（10 w，距離 3 公分）
 - (1) 照射 3 分鐘。
 - (2) 照射 5 分鐘。觀察生活情形和子代的遺傳性狀。
 6. 若有突變產生，則用遺傳交配方法，和已知 stock 交配，確定是爲何突變。體突變或遺傳性突變？是顯性或隱性遺傳。

五、實驗結果

(一) 野生型果蠅各 10 對分別養在 10 組培養基中，養至第五代結果數據和表略去。

1. 化蛹時間：

不同培養基中並無顯著的差別。僅 50 PPm 中的約晚半天。

2. 生活史長短（以羽化來定）：

(1) 50 PPm 生活史 12 ~ 13 天。

(2) 10 PPm，1 PPm 生活史 11 ~ 12 天。

(3) 九層塔組、對照組，0.1 PPm，0.01 PPm 其生活史 10 ~ 11 天。

3. 個體的差異：

(1) 九層塔組的個體大的數目比較多。

(2) 50 PPm，10 PPm 組的，大的數目少，個體小的較多。

(1)高濃度的黃樟素組♀個體多於♂個體(但1:1仍符合 χ^2 -test)。

(2)九層塔組近似1:1。

5. 羽化不良或其他：

(1)高濃度黃樟素組的較多羽化不良或體突變。

(2)九層塔組的和對照組、0.01 PPm 組的結果相當。

(三)對黃樟素的耐受性：

表甲：在1000 PPm中

組別 $F_1 \times F_1$	結 果	F_1	F_2	F_3
對 照 組	一天以內全死	無	無	無
九 層 塔	一天以內全死	無	無	無
0.01 PPm	一天以內全死	無	無	無
0.1 PPm	第一天死去約4/5，另1/5仍不能爬行。 第二天全死	無	無	無
1 PPm	第一天死去約1/2，另1/2不能爬行。 第二天相繼死亡。	無	無	無
10 PPm	第一天死去約1/2，僅有8隻能爬動，但不能飛。 第二天剩3隻能爬動。	3♂ 5♀	無	無
100 PPm	第一天死去約1/3，僅17隻能爬行，2隻能飛，但飛翔力弱。 第二天僅有1隻能飛，5隻能爬行，約3/4死亡。 第五天僅1隻能飛(♂)餘死亡。	8♀ 6♂	無	無

※子代都是野生型，無突變種發生。

1. 由實驗得知黃樟素對果蠅的半致死量是70~80 PPm。

2. 把各組的 F_1 200 隻，分別養在 1000 PPm 瓶中，觀察其生長、生殖情形。若能產生子代，仍用 1000 PPm 再培養。結果如上表甲：
3. 把各組的 F_1 100 隻分別養在 100 PPm 瓶中，觀察其生長、生殖情形。若有子代仍用 100 PPm 再培養。結果如表乙。

表乙：在 100 PPm 中

組別 $F_1 \times F_1$	結 果	F_1	F_2	F_3
對 照 組	第二天 16 隻死亡，2 隻較正常，其餘不能正常飛行，在培養基上爬動。 第四天全部死亡。	無	無	無
九 層 塔	第二天 20 隻死亡，15 隻僅能爬動。 第四天 13 隻能動，其餘皆死亡。	2♀	無	無
0.1 PPm	第二天 22 隻死亡，20 隻飛行不正常。 第四天 15 隻尚能動，但不能飛行。 第五天全部死亡。	8♀ 3♂	無	無
1 PPm	第二天無死亡，15 隻僅能爬動。 第四天 10 隻能動，餘死亡。	5♀ 14♂	無	無
10 PPm	第二天 15 隻死亡（麻醉死）餘均能飛翔。 第四天 25 隻僅能爬動，16 隻稍能動。 第六天 20 隻僅能爬動。	36♀ 19♂	18♀ 10♂	無
50 PPm	第二天無死亡，皆能靈活飛行。 第四天 $\frac{1}{2}$ 僅能爬動，其餘尚能飛。 第六天僅剩 $\frac{1}{2}$ 僅能爬動而已。	24♀ 18♂	24♀ 30♂	98♀ 46♂

※子代都是野生型，無突變種發生。

(四)將各組的第二子代和第三子代分別以紫外燈 10 w、距離 3 公分密閉照光 3 分鐘和 5 分鐘的處理。在甲瓶培養四天，然後移到乙瓶續養一週，觀察親代及子代的遺傳情形。結果如下：

- 1 0.1 PPm—5 分→F₂ 的子代有 1 隻胸部畸型，僅有一邊翅膀。
- 2 10 PPm—5 分→F₂ 的子代有 4 隻皆為較亮的朱紅眼 2 ♂ 2 ♀。

(五)鑑別產生的突變是體突變還是遺傳性突變？顯性或隱性？

- 1 實驗五—(一)產生的紅眼中有白點 ♂。(50 PPm)

P 突變種 × 野生型 ♀ → F₁ 皆野生型。F₁ × F₁ → F₂ 仍是野生型，由此可見是體突變，而非可遺傳的突變。

- 2 實驗五—(一)似殘翅 ♀、張翅約 45°，分別和野生型交配。

P 突變種 × 野生型 → F₁ 皆野生型。F₁ × F₁ → F₂ 皆野生型，可見也非遺傳性突變，可能是一種羽化不良。

- 3 實驗五—(四) F₂ 10 PPm 照紫外光 5 分鐘產生的朱紅眼果蠅，且眼中間無暗色。懷疑是 Vermilion，第一對性染色體的突變。

(1) mutant × wild → F₁ 突變型和野生型的比是 1 : 1

P. mutant × P. mutant → F₁' 有 $\frac{3}{4}$ 是 mutant， $\frac{1}{4}$ 是 wild。

(2) 取 F₁ 的 mutant 做自交 → F₂ 也是 $\frac{3}{4}$ 突變型， $\frac{1}{4}$ 是野生型。

(3) F₁ ♂ mutant × C1B ♀ → 由棒眼子代 mutant 和 wild 1 比 1。

(4) 由以上實驗知道此突變種是顯性遺傳，基因型是異基因組合 (+ f f mut.)，且不在第一對染色體上，因此不是 Vermilion。

(5) 若想再確知是那一對染色體上的突變，可用 Cy/pm, D/sb stock 來做遺傳交配證實。

六、討 論

(一)實驗五—(一)和五—(二)

- 1 黃樟素和果蠅的生長、生殖有關：

(1) 對成蟲具有毒害作用，喪失飛行能力，減少活動力：在 100 PPm 以上，成蟲便無法生存而相繼死亡。

- (2)使生活史加長一天或二天。使蛹羽化不良的機會增多。
- (3)產生體突變的機會增多。且 50 PPm 的子代較對照組爲小。
2. 會有上述的結果，原因不詳，有待進一步的探討。推測可能是黃樟素經代謝後產生較活潑的分子，進而與細胞中之大分子如酵素、蛋白質、核酸、去氧核糖核酸等產生共價結合，使得 DNA 不能正確轉錄，RNA 轉譯有錯，或酵素、蛋白的功能喪失，因此影響細胞的功能。
3. 可能還影響到幼蟲時期的脫皮或存活等。
4. 九層塔對果蠅的影響：
 - (1)含黃樟素的量不多，對果蠅的生長影響不明顯。
 - (2)汁液中有大量的營養成分，使果蠅的個體比一般的大。

(二)實驗五一(三)

1. 由實驗結果得知，果蠅對黃樟素具有耐受性。親代只能忍受到 50 PPm，而高濃度組的子代卻可達到 1000 PPm。
2. 濃度高達生存極限時，能順利羽化的子代便非常少，（並非幼蟲少）如 50 PPm F_1 在 1000 PPm 中的僅能產生少數的成蟲子代。
3. 對照組在 100 PPm 中不能產生子代，而 1PPm 以上的子代便能在 100 PPm 中繁殖。可見忍受度約可提高 100 倍。
4. 在 1000 PPm 中僅能繁殖一代，表示果蠅並未能在短期內產生對付黃樟素的辦法，造成適應上的突變。

(二)實驗五一(四)

1. uv 燈可使果蠅突變，但在未達到相當光量時仍難產生突變。本實驗 10 PPm F_2 照光 5 分鐘，便能產生突變種，推想可能黃樟素提高了突變機會。
2. 由於紫外線會使 DNA 產生胸嘧啶雙生體（Thymine dimer）妨礙 DNA 的複製，但在有藍光的情況下會產生 photoreactivation 自動修補。是否因爲黃樟素的代謝物影響 exonuclease 外核苷酸酶的修補作用，而造成突變呢？這得進一步的研究證實。

3. 爲何♀果蠅比♂果蠅對紫外線的耐受性大呢？這可能是♀個體比♂個體大，相對的忍受度增加的原故。

(四)實驗五一(五)

1 鑑定突變種時先和野生型交配：

(1) F_1 有突變性狀出現時。

 ↘ F_1 皆是突變型，或有 $\frac{1}{2}$ 是突變型則是顯性的遺傳。

 ↘ 只有♂有突變，則是性染色體隱性遺傳。

(2) F_1 沒有突變型出現，得繼續做交配。

 ↘ F_1 自交，若 F_2 野生型和突變型比例近似 1 : 1，則是隱性的遺傳。

 ↘ F_1 自交若 F_2 沒有突變型，則是體突變。

(3) 用 Muller 的 CIB stock 交配，看有無隱性突變或致死作用。

(4) 尚可用 Cy/pm, D/sb stock 來交配確是那一對染色體的突變。

七、結 論

- (一) 黃樟素對果蠅具有毒害作用、降低活動力、影響蛹的羽化，使子代個體發育較不好，並使生活史延長一或二天。突變率增加。
- (二) 九層塔含黃樟素的量不多，短期內對果蠅的生長生殖影響不大。
- (三) 黃樟素對果蠅的半致死劑量是 70~80 PPm，100PPm 濃度以上，果蠅便不能存活。第一子代比親代對黃樟素的忍受度大一百倍。
- (四) 黃樟素會抑制果蠅的生長，1000 PPm 黃樟素使果蠅不易產生第二子代。
- (五) 黃樟素可使果蠅對紫外線的誘變率提高，九層塔汁液培養的並未如此。
- (六) ♀果蠅對黃樟素、紫外線或乙醚的忍受性都比♂強。
- (七) 黃樟素在果蠅的體內代謝中，若有致突變因子存在時（如物理的射線）會進而促成更高的突變率，那麼這黃樟素的禍害就很可怕了，人們豈能再食黃樟素呢？九層塔還有吃的價值嗎？

(八)做果蠅的遺傳實驗須要有耐心的長時期觀察研究，才會有理想的實驗結果。

八、參考資料（略）

評 語

本作品以致癌物質黃樟素處理果蠅，觀察該物質對果蠅生長、生殖及後代的影響，並兼用紫外線處理其後代而獲突變體，然後進一步探討該突變性狀之顯隱性，以及其基因位於那一對染色體等。作者利用簡單設備進行冗長之研究，精神可嘉。實驗設計及數據記載均稱週詳，果蠅眼色顯性突變之產生，尤足珍貴，若條件許可宜對該突變作進一步嚴謹之探討。