

中華民國第四十六屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科
佳作

040723

被遺忘的隱憂—下午茶（探討咖啡因對果蠅生長發育的影響）

學校名稱： 高雄市立左營高級中學

作者：	指導老師：
高二 鄭乃綺	許惠紋
高二 倪千益	許靖松

關 鍵 詞：咖啡因、果蠅發育

被遺忘的隱憂—下午茶（探討咖啡因對果蠅的影響）

摘要

本實驗利用果蠅為研究材料，將幼蟲及成蟲飼食於不同咖啡因濃度的食物下，觀察咖啡因對其成長、生育及反應能力的影響。實驗結果顯示，隨著服用的咖啡因劑量愈高，果蠅產卵的總數也愈少。且發現咖啡因會使果蠅幼蟲反應遲緩，若親代於生殖期服用咖啡因亦會對子代幼蟲反應造成影響。另外若幼蟲期服用咖啡因，會使得幼蟲的生活史拉長、發育遲緩，但若親代於生殖時服用咖啡因，並不會對子代幼蟲型態發育造成影響。此說明了咖啡因對於果蠅幼蟲均會造成影響，且影響的層面不盡相同。

關鍵字：咖啡因、果蠅發育

壹、前言

由於近年來人們在日常生活中，對咖啡因的攝取量日漸增加，從大家所熟悉的提神飲料，到某些藥物，甚至部分食物中都含有咖啡因的成分，在這眾多攝取到咖啡因的管道之下，不盡讓人思索到咖啡因攝取量的多寡，對不同成長時期的人類會有哪些影響，從部分文獻了解，咖啡因是一種中樞神經系統的刺激物 (1)，它會經由血液，透過胎盤送至胎兒 (2)。在 2004 年 9 月歐洲臨床營養學雜誌研究 2521 未懷孕婦女，評估生產體重不足新生兒的危險性，如果懷孕前每天喝四杯以上咖啡者為 1.3 倍，懷孕第一期及第二期如果每天喝三杯以上者為 1.2 倍。而且美國 FDA 則建議孕婦最好不要喝咖啡，長期大量喝咖啡，婦女可能會有鈣流失的問題 (3)。另外根據調查發現，兒童雖然沒有喝咖啡，但是他們所經常攝食的食物，卻有千種以上含有咖啡因，這些食物主要是清涼飲料類、茶類、烘焙食物、奶類、糖果和甜點，後四類食物的咖啡因，主要是來自巧克力 (2)。由這些文獻發現咖啡因對人體會有部分的缺點，但又好奇咖啡因是如何影響動物，在高二下學期生命科學第七章中，我們學到，許多生物學家會以「果蠅」為研究材料，來探討遺傳與疾病，於是我們決定以果蠅為材料，探討咖啡因對動物體的影響。

之所以用果蠅當作實驗對象是由於它具有以下的優點 (1) 生活使短。(2) 培養容易。(3) 能產生數目很多的子代。(4) 體積小，容易操作。(5) 染色體數目少，只有四對。(6) 突變性多且易觀察。果蠅的生活始可分為下列敘述的幾個時期 (1) 靜止停滯於基質表面的卵，其顏色為白色圓形狀，約 0.5 mm 長，以兩根柄附著於物體的表面，存在時期為 1 天。(2) 幼蟲為白色蠕蟲狀，身體分節，體前端有一對黑色的勾，沒有眼。幼蟲共有三齡，受精卵孵化後便成為，在基質表面取食的一齡幼蟲，存在時期為 1 天。(3) 長大蛻皮後便成為二齡幼蟲，再長大脫皮後成為三齡幼蟲，存在時期各為 1 天及 3 天。(4) 三齡幼蟲成熟時會鑽至培養瓶壁上靜止不動，最後表面角質層硬化，便成為蛹，存在時期為 5 天。(5) 羽化後，剛鑽出蛹之果蠅成蟲的體色很淺，腹部較細長，待其外骨骼與翅膀乾燥硬化歷經時間約為 1 至 3 小時。(6) 直到能夠飛翔活動的成蟲，體色會轉變為較深的黃褐色，翅完全展開，腹部也變的較圓胖，存在時期為 30 至 50 天(4)。

本實驗以含有不同咖啡因濃度的培養基飼食果蠅，探討咖啡因對果蠅之產卵數、卵的孵化率、幼蟲反應、幼蟲發育及成蟲反應等影響，希望能藉此釐清我們對咖啡因的迷思。

貳、材料方法

一、實驗動物：本實驗使用黃身、白眼之純品系果蠅，果蠅由國立台灣師範大學，生命科學系，蘇銘燦老師所提供。

二、培養基配製

(一) 本實驗使用玉米粉配方之培養基來飼養果蠅，配方成分為：

黃玉米粉	60g
黃砂糖	70g
酵母	18g
洋菜粉	16g
丙酸	4ml
水	1000ml

(二) 控制組培養基配置方法：

1. 先以適當大小之棉塞塞住玻璃飼養瓶，再以鋁箔紙包住瓶口。
2. 將配置培養基所需之器材(燒杯、量筒、藥杓、飼養瓶)，放置烘箱中以乾熱滅菌法(160℃、2 小時)滅菌。
3. 將培養基之粉狀成分秤好放入鍋中，加入適量的水以加熱板加熱。
4. 加熱時，隨時以玻棒攪拌，沸騰後關小火再加熱至培養基黏稠(約十分鐘)即可關火。
5. 加入丙酸並攪拌均勻後，即可分裝至消毒乾淨的培養瓶中(約 1~1.5 cm，太厚易發霉)。
6. 置備好之培養基，可暫保存於 4℃ 冰箱中。

(三) 實驗組培養基(含咖啡因 100ppm~2400ppm)配置方法：

1. 先將咖啡因粉末溶解於水中。
2. 其餘配置步驟均與控制組培養基的配置方法相同。

三、果凍產卵盤配置方法

(一) 本實驗使用葡萄果汁來製作果凍

配方成分為：

葡萄汁	300 ml
洋菜粉	9g
糖	3g

(二) 控制組果凍產卵盤配置方法

1. 將秤好之糖及洋菜粉置入燒杯中，並加入葡萄汁，稍微攪拌均勻。
2. 將燒杯放入微波爐中加熱(約 1.5 分鐘)。

3. 中途將燒杯取出，搖晃、攪拌約兩次。
 4. 待粉狀成分均溶解時，以 20 cc 針筒將果汁分裝至直徑 4 cm 之培養皿中(約八分滿)待涼。
 5. 置備好之果凍產卵盤可先以夾鏈袋裝妥，放入 4℃ 冰箱中暫存。
- (三) 實驗組果凍產卵盤配置方法(含咖啡因 100ppm~2400ppm)。
1. 先將咖啡因粉末溶解於葡萄果汁中。
 2. 其餘步驟與上述均同。

四、果蠅之飼育與繁殖

(一) 果蠅飼育方法

1. 將果蠅麻醉，並選取 10 隻處女雌果蠅及 10 隻雄果蠅，置入培養基中繁殖。5 天後，移除親代果蠅至一新培養基中繁殖。待子代果蠅卵孵出時，再由子代中選取 10 對果蠅繼續繁殖，此為「繼代繁殖」。
2. 本實驗的果蠅均飼育於 25℃ 恆溫、12 小時日光週期之培養箱中(HIPOINT FH-130)。

(二) 果蠅之麻醉方法

1. 本實驗使用乙醚為麻醉劑。
2. 選擇一個可套入玻璃培養瓶之橡皮塞，於橡皮塞中塞入一玻璃管，玻璃管一端綁上棉線，此為實驗所使用之麻醉器(圖一)。
3. 欲麻醉果蠅前
 - (1) 將裝有果蠅之培養瓶棉塞移開，並迅速蓋上一空玻璃瓶。
 - (2) 將裝置倒置，並輕敲培養瓶，使培養瓶內的果蠅掉入空玻璃瓶中。
 - (3) 快速的將沾有乙醚之橡皮塞，套入玻璃瓶中。
 - (4) 待瓶中果蠅安詳地倒臥時，即已麻醉成功。

(三) 辨別果蠅性別

1. 雌雄果蠅於腹面尾端具有極明顯的差異，雄果蠅可見明顯的外生殖器，而雌果蠅則無(圖二)，因此本實驗以外生殖器來辨別雌雄。
2. 麻醉後之果蠅，置於白色紙片上，在解剖顯微鏡(OLYMPUS SZ-ST)下觀察，即可分辨雌雄，並可利用毛筆將雌雄果蠅分開。

五、果蠅產卵數計算(裝置如圖三)

- (一) 於每個產卵瓶中各置入 5 對果蠅(♀為處女果蠅)。
- (二) 調配酵母膏(含咖啡因 0ppm、100ppm、200ppm、300ppm、600ppm、1200ppm、2400ppm)。
- (三) 將酵母膏塗抹於果凍產卵盤上，並將果凍產卵盤蓋在產卵瓶上。
- (四) 將產卵瓶倒置(果凍產卵盤在下)。
- (五) 每日更換新的果凍產卵盤，並於顯微鏡下計算每日產卵的數量。
- (六) 每日總產卵量÷每日存活之雌果蠅個數=單隻雌果蠅每日產卵數。
- (七) 單隻雌果蠅每日產卵數×每日孵化率=單隻雌果蠅每日有效產卵數。

六、果蠅卵之孵化率計算

- (一) 將每日所更換之果凍產卵盤上的卵，隨機選取 100 顆，排列於新的果凍盤上(圖四)。
- (二) 於保鮮盒底部放置濕紙巾，並將排有果蠅卵之果凍盤，置於保鮮盒內。

- (三) 將保鮮盒置於 25℃ 恆溫 12 小時日光週期之培養箱中。
- (四) 24 小時後，以解剖顯微鏡檢查每個果凍盤內孵化的卵個數。
- (五) $\text{孵化個數} \div \text{卵總數} = \text{孵化率}$ 。

七、果蠅幼蟲反應測試

- (一) 親代與子代均服用咖啡因(0ppm~2400ppm)之果蠅幼蟲反應。
 - 1. 將服用咖啡因之親代所產下的卵，排列於含咖啡因之果凍盤中(0ppm~2400ppm，子代服用濃度與親代相同)。
 - 2. 待幼蟲孵出後，每日餵以含咖啡因(0ppm~2400ppm)之酵母膏。
 - 3. 每日以解剖針輕觸幼蟲身體前端，根據幼蟲的反應給予分數(0 ~ 4分)，分數評斷標準如下：
 - (1) 0 分：幼蟲無反應。
 - (2) 1 分：幼蟲身體前端稍向後縮，並有遲疑的現象。
 - (3) 2 分：幼蟲轉向移動。
 - (4) 3 分：幼蟲身體向後縮一次；或幼蟲身體向後縮一次，並有轉向移動的現象，均屬 3 分。
 - (5) 4 分：幼蟲身體向後縮達 2 次以上。
 - 4. 每日測試幼蟲反應，直至化蛹為止。
- (二) 親代服用咖啡因(0ppm ~ 2400ppm)而子代不服用咖啡因實驗組之果蠅幼蟲反應。
 - 1. 將服用咖啡因之親代所產下來的卵，排列於不含咖啡因之果凍盤中。
 - 2. 待幼蟲孵出後，每日餵以不含咖啡因之酵母膏。
 - 3. 每日以解剖針輕觸幼蟲身體前端並評分，評斷標準如上述。
 - 4. 測試幼蟲反應直至化蛹為止。
- (三) 親代未服用咖啡因，而子代服用咖啡因(0ppm~ 2400ppm)實驗組之果蠅幼蟲反應。
 - 1. 將未服用咖啡因之親代果蠅所產下的卵，排列於含咖啡因(0ppm ~2400ppm)之果凍盤中。
 - 2. 待幼蟲孵出後，每日餵以含咖啡因(0ppm~2400ppm)之酵母膏。
 - 3. 每日以解剖針輕觸幼蟲身體前端，並評分，評斷標準如上述。
 - 4. 測試幼蟲反應直至化蛹為止。

八、果蠅幼蟲發育形態觀察

- (一) 每日以顯微鏡 (Motic DM0156—05121—00—10661) 觀察三種實驗處理組別之果蠅幼蟲，三種組別分別為：
 - 1. 親代、子代均服用咖啡因(0ppm~ 2400ppm)。
 - 2. 僅親代服用咖啡因(0ppm~ 2400ppm)，而子代不服用。
 - 3. 親代未服用咖啡因，而子代服用(0ppm ~ 2400ppm)。
- (二) 以電腦軟體(Motic 1-3)擷取顯微畫面，每日紀錄果蠅幼蟲發育形態。

九、成蟲爬行反應測試

- (一) 服用咖啡因(0ppm ~ 2400ppm)之果蠅成蟲爬行反應測試。
 - 1. 選取5對剛孵出之果蠅成蟲(雌果蠅為處女蠅)。
 - 2. 將10隻果蠅置入「成蟲爬行測試管」(圖五)中。

3.輕振測試管，使果蠅移至測試管底部，而後開始測試，計時10秒。

4.記錄果蠅爬行分數(1~5分)，共重複10次，之後每隔5天測試一回。

5.評分標準如下：

由測試管底部開始，每隔2公分即做一記號，並用橡皮筋捆住標示，共做5個記號(圖六)。每個記號間代表一個分數，由下而上分別為 1. 2. 3. 4. 5.分，爬行超過最後一個記號仍以5分計算。

(二) 親代、子代均服用咖啡因(0ppm~ 2400ppm)之子代果蠅成蟲爬行測試。

1.服用咖啡因(0ppm~ 2400ppm)之親代所產下之子代，繼續餵以咖啡因 (濃度與親代相同)，子代羽化後，由子代中選出 5 對成蟲(剛孵出，雌果蠅為處女蠅)。

2.將10隻果蠅成蟲置入「成蟲爬行測試管」中。

3.測試及評分，方法均與上述相同。

(三) 親代服用咖啡因(0ppm~ 2400ppm)，而子代未服用咖啡因之子代果蠅成蟲爬行測試。

1.服咖啡因(0ppm~ 2400ppm)之親代所產下之子代，成長過程中餵以不含咖啡因之食物，待子代羽化後，於子代中選出5對果蠅成蟲 (剛孵出，雌果蠅為處女蠅)。

2.將10隻果蠅成蟲置入「成蟲爬行測試管」中。

3.測試及評分，方法均與上述相同。

(四) 親代未服用咖啡因，而子代服用咖啡因(0ppm~2400ppm)之子代果蠅成蟲爬行測試。

1.未服用咖啡因之親代所產下之子代，成長過程中餵以不同濃度的咖啡因(0ppm~ 2400ppm)，待子代羽化後，於子代中選出5對果蠅成蟲(剛孵出，雌果蠅為處女蠅)。

2.將10隻果蠅成蟲置入「成蟲爬行測試管」中。

3.測試及評分，方法均與上述相同。

參、結果

一、咖啡因對果蠅產卵數的影響

(一) 咖啡因對果蠅產卵的影響

1.咖啡因對雌性果蠅每日產卵數的影響(圖七)

(1) 控制組果蠅在開始產卵後第 5 天，可達產卵期的單日最大產卵量，但服用咖啡因之果蠅，於第 3 天即已達到最大產卵量。

(2) 控制組果蠅於開始產卵後，隨著天數增加，每日產卵數有隨之減少的現象，服用咖啡因之實驗組果蠅亦有此現象，且隨著服用的咖啡因劑量愈高，逐日減少產卵數的現象愈明顯。服用 2400ppm 咖啡因的果蠅甚至在第 10 天便已停止產卵。

(3) 服用低劑量咖啡因(100ppm、200ppm)之果蠅每日產卵量不穩定，常有大幅度的變化。

2.咖啡因對果蠅產卵之孵化率的影響(圖八)

(1) 控制組果蠅所產卵的孵化率，隨著產卵天數的增加，會有下滑的趨勢。

(2) 服用 1200ppm 及 2400ppm 咖啡因的果蠅，其卵之孵化率與控制組相較，有明顯的差異，即服用咖啡因 1200ppm~2400ppm 會使果蠅卵的孵化率降低。

(3) 服用 100ppm~600ppm 咖啡因的果蠅，其卵之孵化率在實驗初期與控制組相差

不大，但於開始產卵 15 日後，其孵化率便開始出現變化。

3. 咖啡因對果蠅每日有效產卵數的影響(圖九)

- (1) 隨著果蠅所服用之咖啡因濃度愈高，果蠅每日之有效產卵數就愈少，其中以 600ppm~2400ppm 最為明顯。
- (2) 服用 100ppm~300ppm 咖啡因之果蠅，每日有效產卵數呈現明顯之波動現象。

4. 咖啡因對果蠅產卵期之產卵總數的影響(圖十)

- (1) 隨著果蠅所服用的咖啡因濃度愈高，產卵的總數愈少。
- (2) 其中 200ppm 實驗組的產卵總數，與控制組經 T 檢定測試，P 值 <0.05 ，而 300ppm，600ppm，1200ppm 及 2400ppm 實驗組，經過 T 檢定，P 值均 <0.005 。

二、咖啡因對果蠅幼蟲反應的影響

(一) 親代果蠅服用咖啡因(0ppm~2400ppm)。

1. 子代幼蟲繼續服用咖啡因(0ppm~2400ppm)。(圖十一)

- (1) 控制組之果蠅幼蟲反應分數於孵化第1天為最高，且第5天便已化蛹。
- (2) 服用100ppm~300ppm咖啡因實驗組之果蠅幼蟲，發育期前3天與控制組的表現分數相似，雖第4天反應分數卻降低，但仍在第5天化蛹。
- (3) 服用600ppm及1200ppm咖啡因實驗組之果蠅幼蟲，其每日反應分數均較控制組低，且其化蛹時間，有隨咖啡因濃度增加而延後的趨勢。
- (4) 服用2400ppm咖啡因實驗組之果蠅，於發育初期反應分數極低，卻於5~6天時，反應分數提升。但其壽命僅7天，未能發育為蛹。
- (5) 若將果蠅幼蟲每日反應分數平均(圖十四)，可見幼蟲反應分數，隨著親代與子代所服用的咖啡因劑量愈高，分數愈低且1200ppm實驗組($P < 0.05$)與2400ppm實驗組($P < 0.005$)均出現顯著差異。

2. 子代幼蟲未服用咖啡因。(圖十二)

- (1) 服用咖啡因的親代所產下之子代，在未服用咖啡因之情況下，幼蟲反應分數較控制組之幼蟲差。
- (2) 子代未服用咖啡因之情況下，各實驗組幼蟲化蛹的時間均相同。
- (3) 但服用2400ppm咖啡因的親代所產下之子代，發育期前3天的反應分數較服用100ppm~1200ppm咖啡因的實驗組分數高。
- (4) 若將果蠅幼蟲每日反應分數平均(圖十五)，可見咖啡因影響幼蟲反應，而其中，以服用300ppm及600ppm的組別最明顯，在統計上出現顯著差異。

(二) 親代果蠅未服用咖啡因，而子代幼蟲服用咖啡因(0ppm~2400ppm)。(圖十三)

1. 服用咖啡因之幼蟲的反應分數，均較控制組幼蟲之反應分數差。
2. 服用咖啡因之幼蟲化蛹時間也較控制組延遲，其中以2400ppm之實驗組最明顯，第19天才化蛹。
3. 若將果蠅幼蟲每日反應分數平均(圖十六)，可見子代所服用之咖啡因會直接影響子代幼蟲反應，其中以200ppm及2400ppm實驗組具顯著差異。

三、咖啡因對果蠅幼蟲生長形態及發育時間的影響

(一) 親代服用咖啡因(0ppm~2400ppm)。

1. 子代幼蟲繼續服用咖啡因(0ppm~2400ppm)。(圖十七、二十)

- (1) 服用200ppm~2400ppm咖啡因的果蠅幼蟲，其生長形態在第2天明顯小於服用0ppm~100ppm咖啡因的果蠅幼蟲。
- (2) 服用低劑量(0ppm~300ppm)咖啡因對果蠅幼蟲的發育期並不會造成影響，幼蟲期均為4天，且蛹期亦均為8天。
- (3) 服用600ppm咖啡因之果蠅幼蟲，其幼蟲期為6天，蛹期為5天。而服用1200ppm咖啡因之果蠅幼蟲，其幼蟲期為8天，蛹期為3天，均異於控制組。
- (4) 服用2400ppm咖啡因之果蠅幼蟲，於發育第7天便已全數死亡。
- (5) 服用1200ppm咖啡因之果蠅幼蟲，於第5天開始，身體腸道部位，出現深色物質，明顯有別於其他組別。
- (6) 隨著咖啡因濃度增加，其發育遲緩的情形愈嚴重。

2.子代幼蟲未服用咖啡因。(圖十八、二十一)

- (1) 服用100ppm~2400ppm咖啡因之果蠅幼蟲，其體態在第2天稍小於控制組，第3~4天則達到相同，但其幼蟲生長期均為4天。
- (2) 未服用咖啡因之子代其發育時間大致相同，均在第5天化蛹。
- (3) 0ppm~1200ppm實驗組的幼蟲，蛹期均為4天，但2400ppm實驗組的蛹期為5天，較其他組別時間長。
- (4) 親代服用咖啡因而子代未服用咖啡因，對果蠅幼蟲生長期較無太大影響。

(二) 親代未服用咖啡因，而子代服用咖啡因(0ppm~2400ppm)。(圖十九、二十二)

1. 服用 600ppm~2400ppm 咖啡因時驗組之果蠅幼蟲，其發育較 0ppm~300ppm 之實驗組慢，個體也比較小，其中以 2400ppm 實驗組差異最大。
2. 服用 100ppm~300ppm 咖啡因之果蠅幼蟲，其化蛹時間與控制組相同，幼蟲期均為 4 天，羽化時間也大致相同，蛹期為 4 天。
3. 服用 600ppm 咖啡因之果蠅幼蟲，其幼蟲期為 6 天，蛹期為 5 天。
4. 服用 1200ppm 咖啡因之果蠅幼蟲，其幼蟲期為 9 天，蛹期為 4 天。
5. 服用 2400ppm 咖啡因之果蠅幼蟲，其幼蟲期為 18 天，蛹期為 5 天。
6. 服用 600ppm~2400ppm 咖啡因之果蠅幼蟲，於發育過程中，身體腸道出現明顯的深色物質。
7. 隨著子代所服用的咖啡因濃度愈高，果蠅幼蟲的發育愈遲緩。

四、咖啡因對果蠅成蟲爬行反應的影響

(一) 果蠅於成蟲期始服用咖啡因(0~2400ppm)。(圖二十三)

1. 服用咖啡因200ppm~600ppm的果蠅成蟲爬行能力與控制組相較，並無太大的差異。
2. 服用咖啡因100ppm、1200ppm與2400ppm的果蠅成蟲爬行能力明顯的較控制組差，其中100ppm的組別於第20天之後，反應分數明顯的下降。
3. 服用2400ppm咖啡因的果蠅成蟲壽命僅維持10天，第15天時10之果蠅全數死亡。

(二) 親代於成蟲期服用咖啡因(0~1200ppm)

1. 子代於幼蟲期始服用咖啡因(0~1200ppm)。(圖二十四)
相較於控制組，服用咖啡因之子代果蠅的爬行能力均明顯的下降，尤其在羽化10天後。
2. 子代未服用咖啡因。(圖二十五)

- (1) 服用咖啡因之親代所產下之子代，雖未服用咖啡因，但其爬行反應分數稍略低於控制組，但無明顯的差距。
- (2) 服用300ppm咖啡因之親代所產下之子代，壽命僅維持30天，於第35天時，10隻果蠅全數死亡。

(三) 親代未服用咖啡因，而子代於幼蟲期始服用咖啡因（0~600ppm）

隨著子代所服用的咖啡因濃度愈高，其爬行反應分數也愈高，但整體均較控制組差。

肆、討論

以本實驗數據看來，咖啡因對於成蟲產卵的數量的確有明顯的影響，除了導致總產卵量降低之外，亦改變了果蠅產卵的時間性。控制組的雌果蠅於羽化之後馬上接受產卵測試，每一天均可產出相當數量的卵，但最大值出現在第五天，一般而言，果蠅於孵化後三~五天的產卵量最多，因此控制組果蠅產卵的狀況是符合常理的，但服用咖啡因的實驗組果蠅，雖每日均產卵，但每日產卵數量並無出現明顯的最大值，雖然第三天的產卵數比第一、二天多，但從其每日產卵數中看來(圖七)，沒有出現「產卵最多的時期」。另外，服用 100ppm 及 200ppm 的組別，每日產卵數出現了大幅的波動，表示咖啡因除了影響果蠅之總產卵數之外，還會使果蠅的排卵情況紊亂，甚至減少了果蠅的產卵天數，如 2400ppm 實驗組僅產卵十天，即完全停止。

果蠅所產下的卵，平均約 24 小時後即可孵化，若於 36 小時內仍不孵化，則可判斷為死胎，參照圖八，控制組的蟲卵經過 36 小時後的孵化率隨著成蟲生長天數增加，每日所產之卵的孵化率則隨之降低，但服用咖啡因的實驗組，每日的孵化率隨著所服用的咖啡因濃度愈高，降低的情況愈明顯，再將單隻果蠅每日產卵數與每日孵化率相乘，得單隻雌果蠅每日有效產卵數（圖九），可見咖啡因對於果蠅繁殖子代的能力有明顯的影響。推測之可能原因有二：1. 咖啡因影響雄性果蠅精子數量及品質，2. 咖啡因影響雌果蠅卵的數量與品質。

幼蟲頭部接觸固體時，會產生反射性的行為，所以測試幼蟲行為可以直接反應幼蟲神經活性。因咖啡因是一種中樞神經刺激物，為了直接觀察咖啡因對神經的影響，因此選擇以果蠅幼蟲為對象，觀察其反射反應。結果顯示，若親代於生殖時服用咖啡因，所產下之子代在反應上會有不同程度的影響，如親代服用咖啡因，但產下的子代不服用咖啡因(圖十二、十五)的實驗組別中，雖子代所食用的食物不含咖啡因，但 300ppm 及 600ppm 實驗組的幼蟲反應明顯的比控制組遲緩，推究其原因，可能是咖啡因影響了親代果蠅的生殖細胞，間而影響子代的神經發育。而若親代與子代均服用咖啡因，則影響幼蟲反應的效果更明顯(圖十一、圖十四)，且幼蟲反應會隨著咖啡因劑量愈高，而分數愈低，即說明了除了親代的影響之外，幼蟲攝食咖啡因亦會影響本身神經的發育。圖十三、十六又更深入探究，若僅有子代服用咖啡因時的狀況，結果發現，控制組成蟲所產之幼蟲，若於發育階段服用咖啡因，則幼蟲的反應也會較控制組差，其中以 200ppm 及 2400ppm 實驗組具顯著差異。幼蟲反應測試的實驗印證了，咖啡因為一種神經刺激物，若親代過量服用咖啡因，則易導致

子代反應遲緩，且子代若於發育期中服用咖啡因，亦會影響神經的分化及活性。

一般而言，果蠅幼蟲自孵化後，在 25°C 環境中，約 4 天即可化蛹，幼蟲可分為三齡，而蛹期約為 4 天，由卵至成蟲，時間將近 11 天左右。控制組的果蠅完全符合果蠅的正常生活史，但服用咖啡因的實驗組，生活史則出現了異樣。以圖十八、二十一的結果看來(雖然親代於生殖過程中服用咖啡因，但產下之子代並無服用咖啡因)，子代於幼蟲期的發育形態並無太大的差異，且所有幼蟲均在第 5 天化蛹，大部分實驗組的蛹期均是 4 天，唯有 2400ppm 實驗組的蛹期為 5 天。結果說明了，親代服用適量的咖啡因，並不會直接影響幼蟲的發育型態，但若服用高劑量的咖啡因(2400ppm)則會造成幼蟲的蛹期延長。再參考圖十七、二十，親代與子代均服用咖啡因，結果導致幼蟲發育遲緩。服用低劑量咖啡因(100ppm~300ppm)的組別，幼蟲期均為 4 天，蛹期亦為 4 天；服用 600ppm 咖啡因的組別，幼蟲期為 5 天，蛹期為 5 天；服用 1200ppm 咖啡因的組別，幼蟲期與蛹期也分別為 8 天及 3 天，但服用 2400ppm 咖啡因組別的幼蟲僅維持 7 天的壽命，未化蛹即死亡。此說明了，子代服用咖啡因會導致生長遲緩。

為了更確切證明，親代服用咖啡因與否，與子代生長形態之間的關連，本實驗亦設計了一實驗，親代不服用咖啡因，而果蠅幼蟲服用咖啡因(圖十九、二十二)，結果七個實驗組：控制組、100ppm、200ppm、300ppm、600ppm、1200ppm 及 2400ppm 的幼蟲期分別為：4 天，4 天，4 天，4 天，6 天，8 天及 18 天；而蛹期分別為：4 天，4 天，4 天，4 天，4 天，3 天及 5 天，結果清楚的表示，僅子代服用咖啡因，即已造成幼蟲發育的遲緩，且依結果看來，親代服用咖啡因並不會影響子代的生長形態。究其原因，雖然幼蟲反應的實驗說明親代所服用的咖啡因會影響子代的神經活性，但子代形態的變化主要是由子代體內激素(青春激素)變化而引起，與神經並無絕對關連。因此親代服用咖啡因與否，不會反應在子代形態上，但子代服用咖啡因，則有可能會影響體內青春激素的分泌，進而影響形態發育。除此之外，在幼蟲發育過程中，可發現，服用咖啡因(600ppm~2400ppm)之幼蟲，腸道上均出現明顯的黑色物質，且蛹中成蟲的胎便亦較多，或許是高劑量咖啡因使得幼蟲腸道蠕動變慢而堆積。

果蠅成蟲具有一特殊習性—沿著容器管壁往上攀爬，此一行為亦是由神經所操控，因此測試果蠅的爬行行為可代表其神經的活性。圖二十三與圖二十六均為果蠅服用咖啡因的實驗組，但其間的差別在於，圖二十三的果蠅於羽化後開始服用咖啡因，而圖二十六的果蠅於幼蟲期便開始服用咖啡因，結果顯示若果蠅於幼蟲期即開始服用咖啡因，則不僅會造成其幼蟲期的發育遲緩，還會改變其成蟲期的活動能力，以圖二十六的結果看來，成長過程中所服用的咖啡因濃度愈高，對果蠅成蟲的爬行行為愈會造成興奮性的影響，推測於果蠅發育過程中，咖啡因影響了神經的分化結果，也影響了神經的閾值，因此導致服用咖啡因的果蠅，反應分數較控制組低。但若成蟲後才開始服用咖啡因，則咖啡因對成蟲爬行反應的結果影響不大，僅低劑量與高劑量的咖啡因對成蟲爬行稍有影響，其中高劑量咖啡因(2400ppm)還造成了果蠅壽命減短，原因可能是 2400ppm 的劑量以超過果蠅所能負荷的最大劑量，對果蠅造成了毒性反應，而服用低劑量咖啡因(100ppm)的果蠅，在第 20 天後爬行行為開始遲緩，推測可能是因為「咖啡因成癮」所導致的現象，果蠅對咖啡因成癮，但食物中的咖啡因含量又不足，因此果蠅行為開始出現遲緩的現象。

究竟親代服用咖啡因與否，對子代果蠅的爬行行為會不會造成影響？針對此疑點，我們亦設計了兩個實驗組：圖二十四代表親代與子代均服用相同劑量的咖啡因，圖二十五代表親代服用咖啡因而子代並未服用，由圖二十五看來在子代未服用咖啡因的情況下，子代果蠅的爬行行為反應叫控制組稍微差一些，說明了親代於生育期間所服用的咖啡因，仍有可能影響子代的神經反應，但影響的層面比「子代服用咖啡因」來的輕微。若親代與子代均服用咖啡，則可見到子代果蠅的爬行行為明顯的受到影響（圖二十四）服用咖啡因的子代果蠅，其爬行行為反應均較控制組果蠅遲緩，此說明了，親代服用咖啡因雖會對子代果蠅產生行為遲緩的影響，但若子代於發育其服用咖啡因，則導致行為遲緩的現象會更為嚴重。

伍、結論

1. 咖啡因會減少雌蠅產卵數。
2. 咖啡因會使幼蟲反應遲緩，且親代服用咖啡因亦會對子代幼蟲反應造成影響。
3. 幼蟲期服用咖啡因會使得幼蟲的生活史拉長，發育遲緩，但親代服用咖啡因，並不會對子代幼蟲形態發育造成影響。

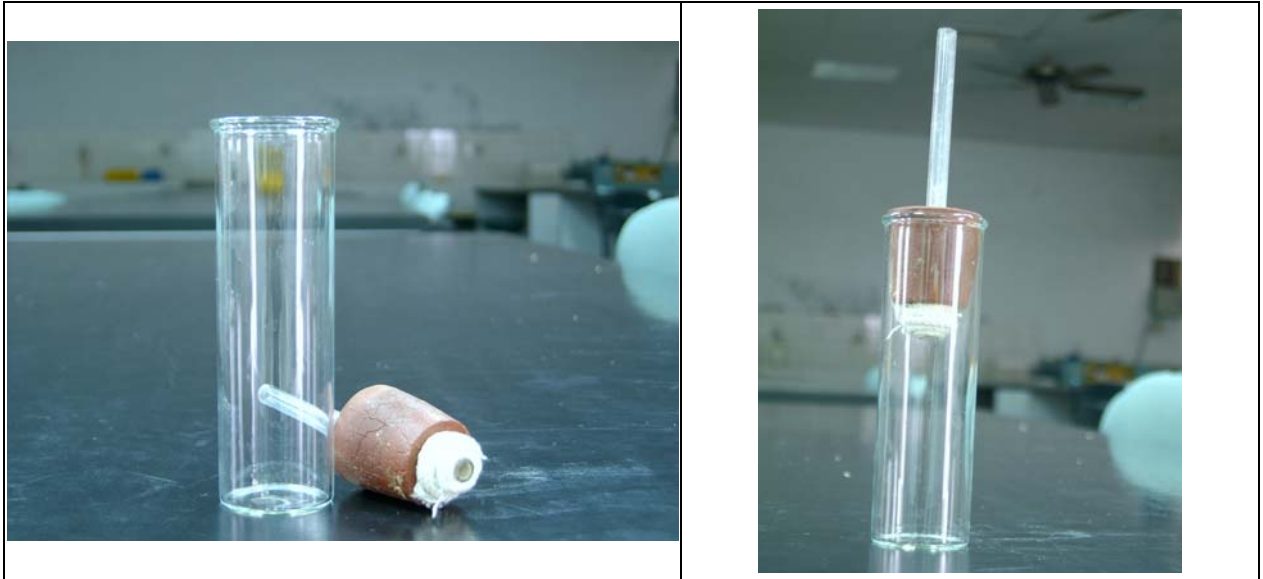
陸、未來展望

1. 檢測咖啡因是否會影響子代的性別比例。
2. 期望能將本實驗中果蠅所服用的咖啡因濃度，轉換為人類所可能服用的劑量。
3. 更進一步的探討咖啡因與酒精混合食用時，對生物體所產生的影響。

柒、參考資料

1. 咖啡因 (無日期)。民國 95 年 5 月 2 日，取自：
http://www.dle.ym.edu.tw/neuroscience/caff_c.html。
2. 食物知多少？談咖啡因 (無日期)。民國 95 年 5 月 2 日，取自：
http://www.enutrition.com.tw/AT_food_coffee.html。
3. 林杰樑 (無日期)。咖啡因喝了多少會中毒？民國 95 年 5 月 2 日，取自：
<http://www.greencross.org.tw/food&disease/coffee-3.htm>。
4. 丁照棣、張慧羽、林飛棧(民國 85 年)動物模式和品系特性-果蠅篇。民國 95 年 5 月 2 日，取自：<http://las.nhrri.org.tw/introduce-amms13.htm>。
5. D.B.Roberts(1986)。Drosophila:apactical.approach.MA:IRL press。
6. Cooper,Ann Simone,and Robin L. Cooper(2004).Technique Notes.DIS.87,85~108。
7. Richard J. Elzinga(1997) Fundamentals of Entomology.MA:Prentice hall。

附圖



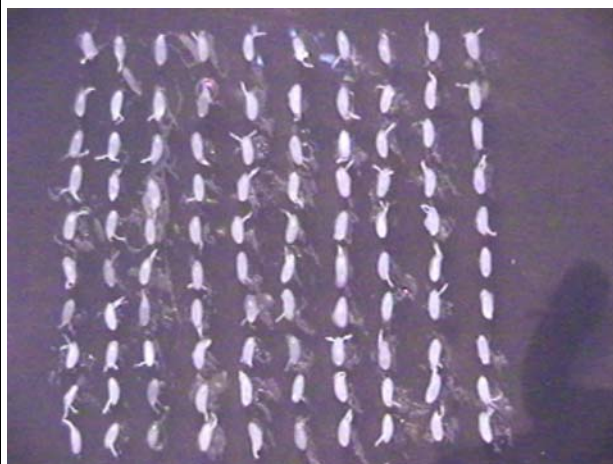
【圖一】麻醉器

	♀	♂
背面		
腹面		

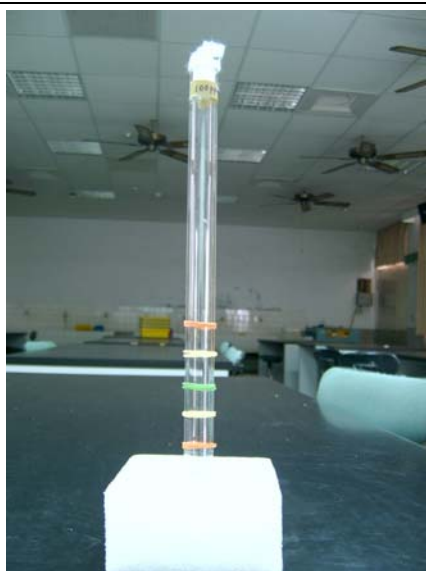
【圖二】雌雄果蠅成蟲之區別



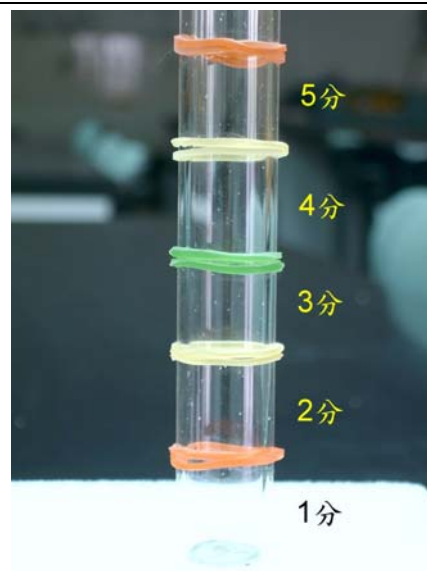
【圖三】果蠅產卵瓶裝置圖



【圖四】果凍產卵盤

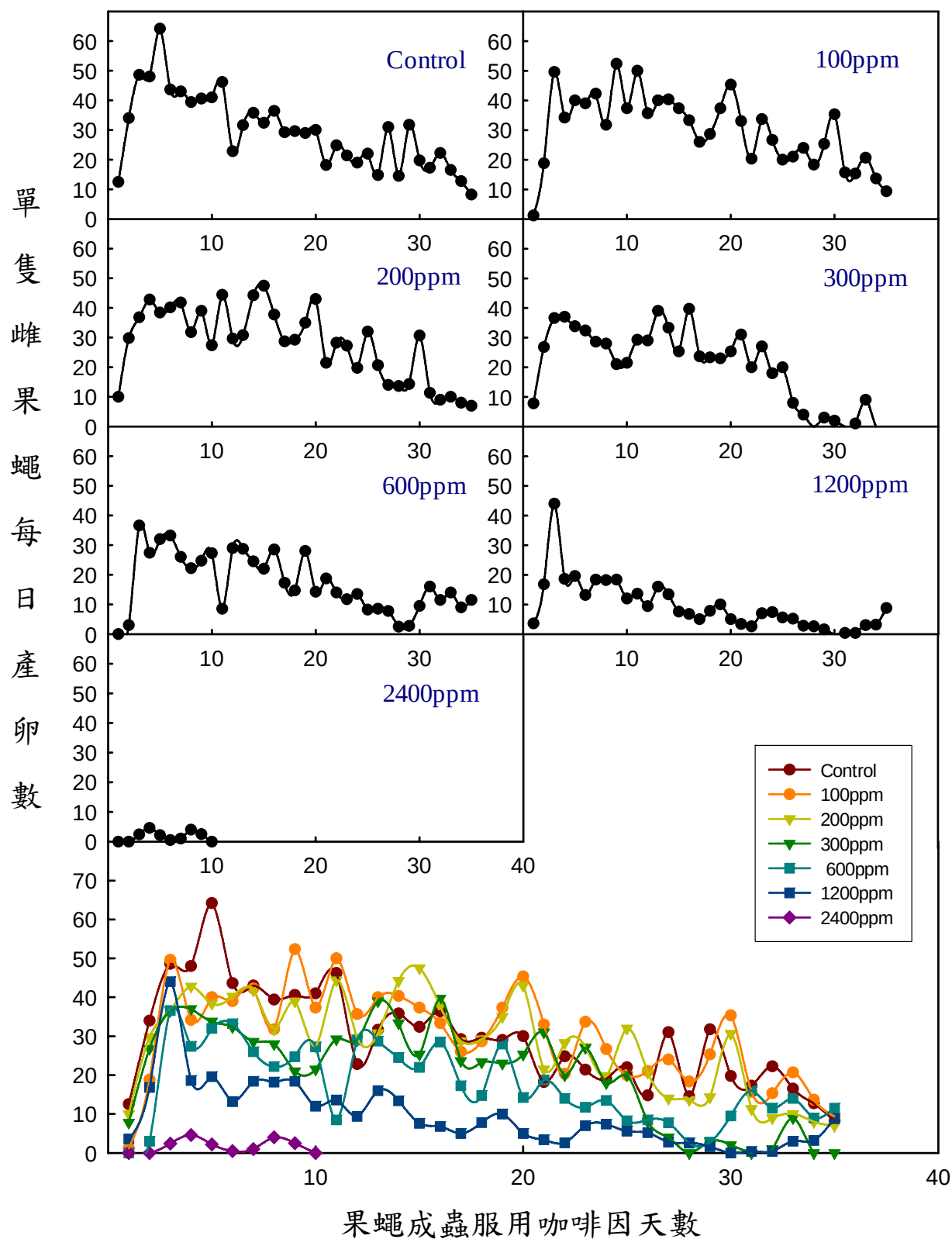


【圖五】成蟲爬行測試管



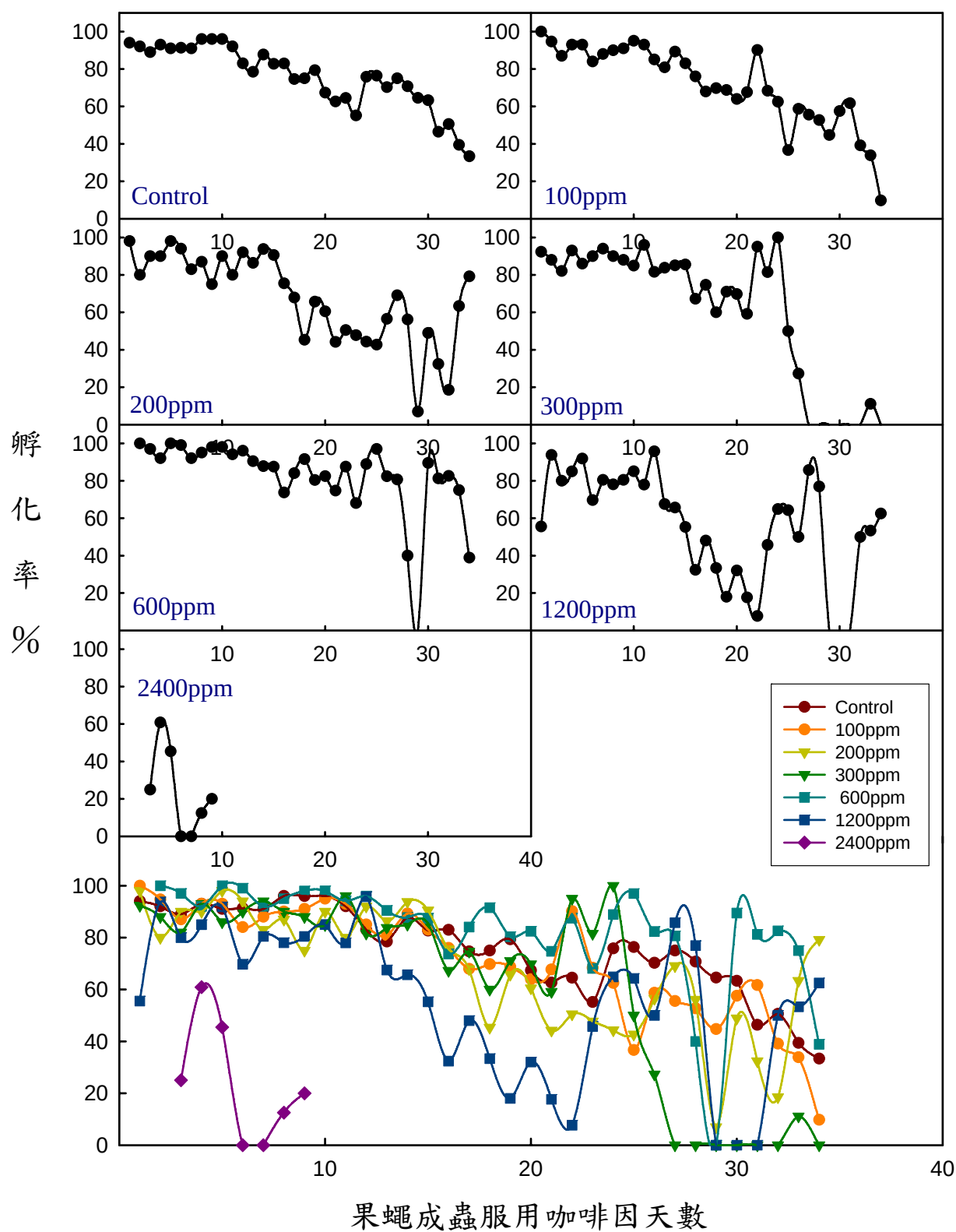
【圖六】成蟲爬行評分標準

咖啡因對果蠅成蟲每日產卵數的影響



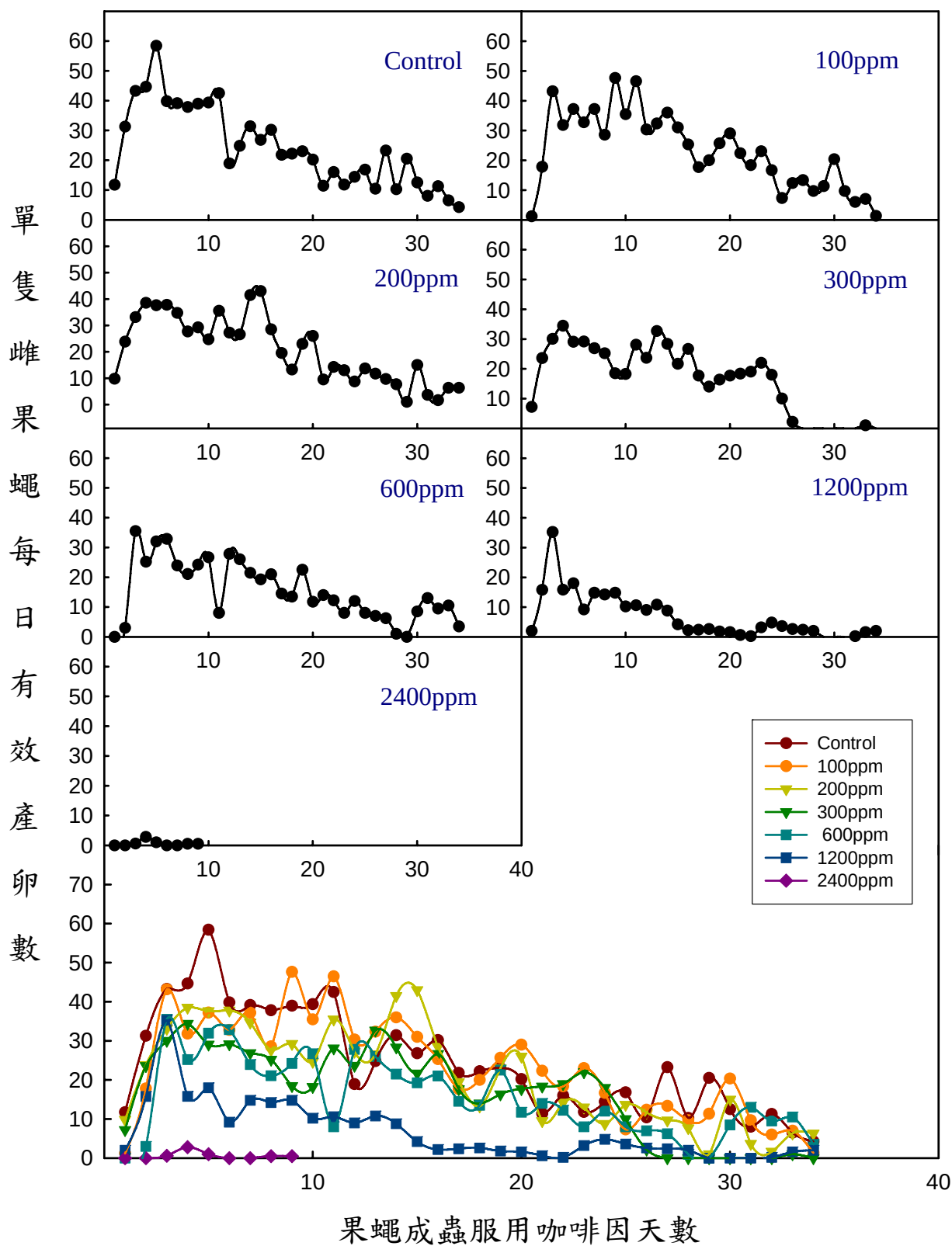
【圖七】 咖啡因對果蠅成蟲每日產卵數的影響

咖啡因對果蠅卵孵化率的影響



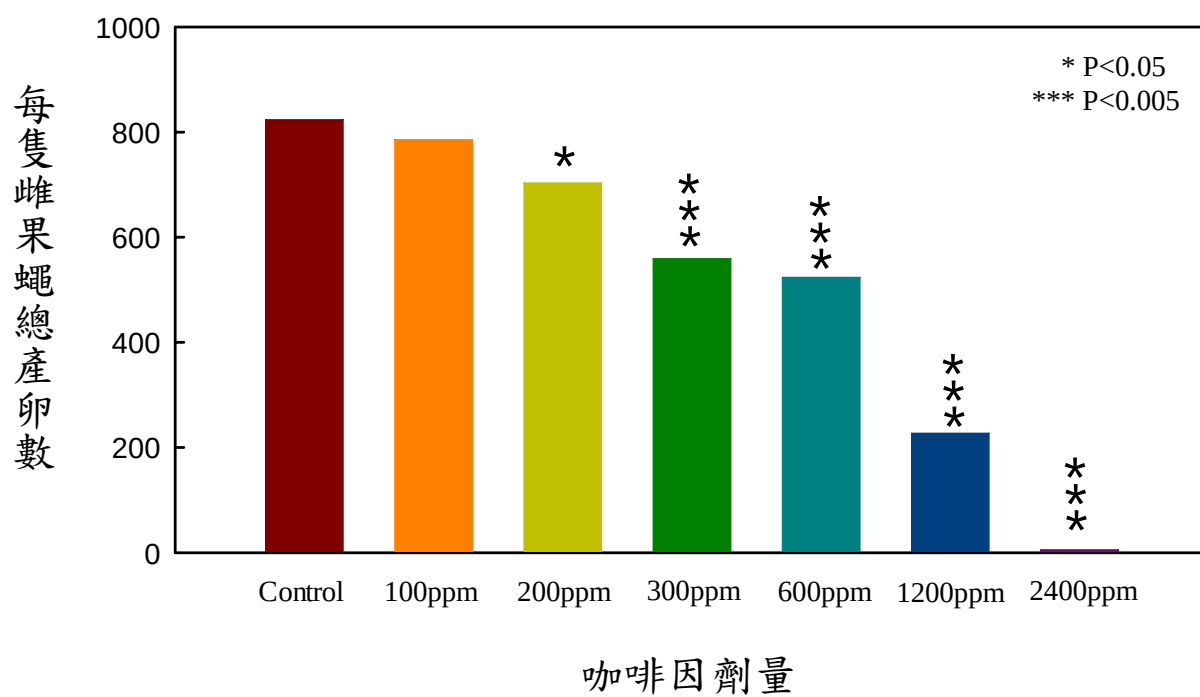
【圖八】 咖啡因對果蠅孵化率的影響

咖啡因對果蠅成蟲每日有效產卵數的影響



【圖九】 咖啡因對果蠅成蟲每日有效產卵數的影響

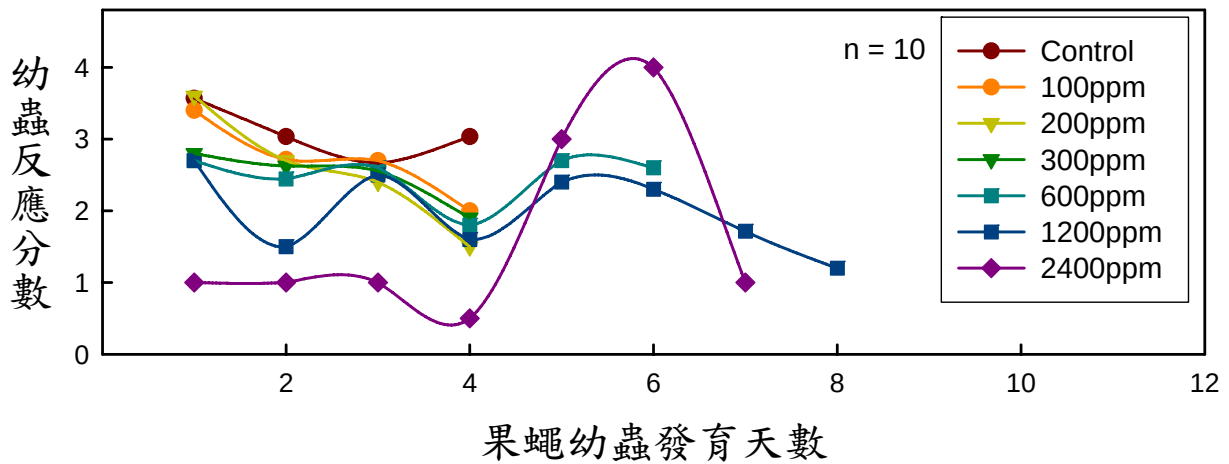
咖啡因對成蟲產卵總數的影響



【圖十】 咖啡因對果蠅成蟲產卵總數的影響

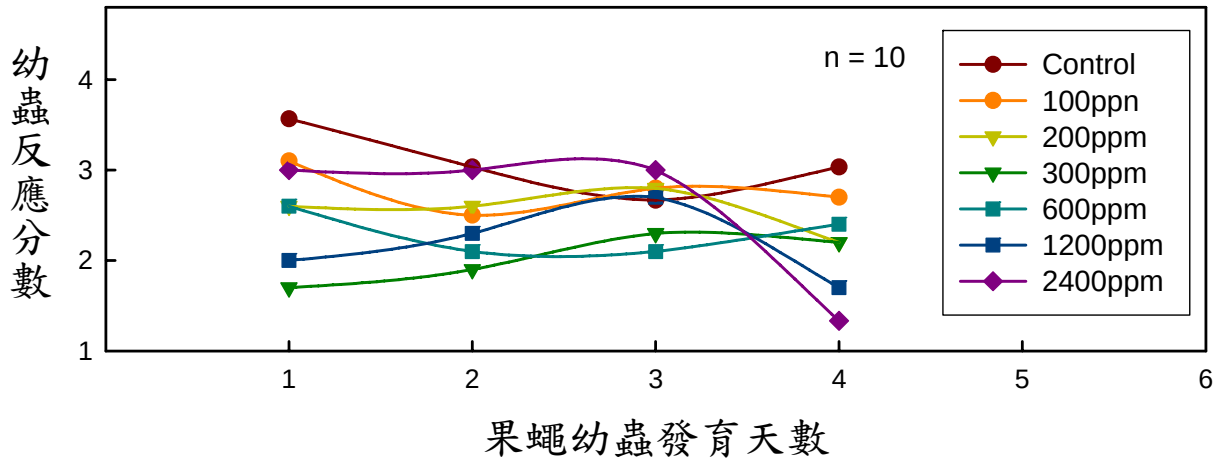
咖啡因對果蠅幼蟲反應的影響

(親代子代均服用咖啡因)



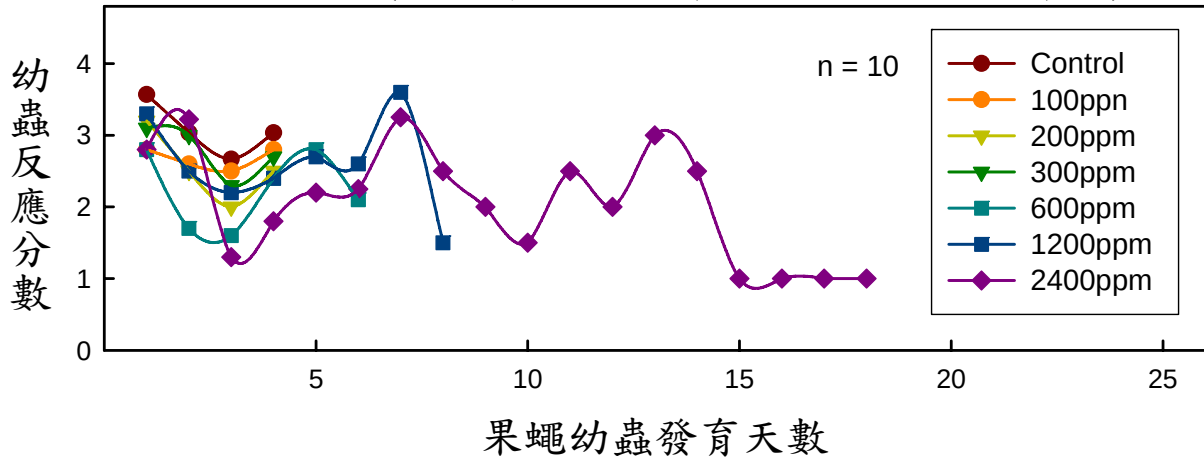
【圖十一】 咖啡因對果蠅幼蟲反應的影響（親代、子代均服用咖啡因）

(親代服用咖啡因、子代未服用咖啡因)

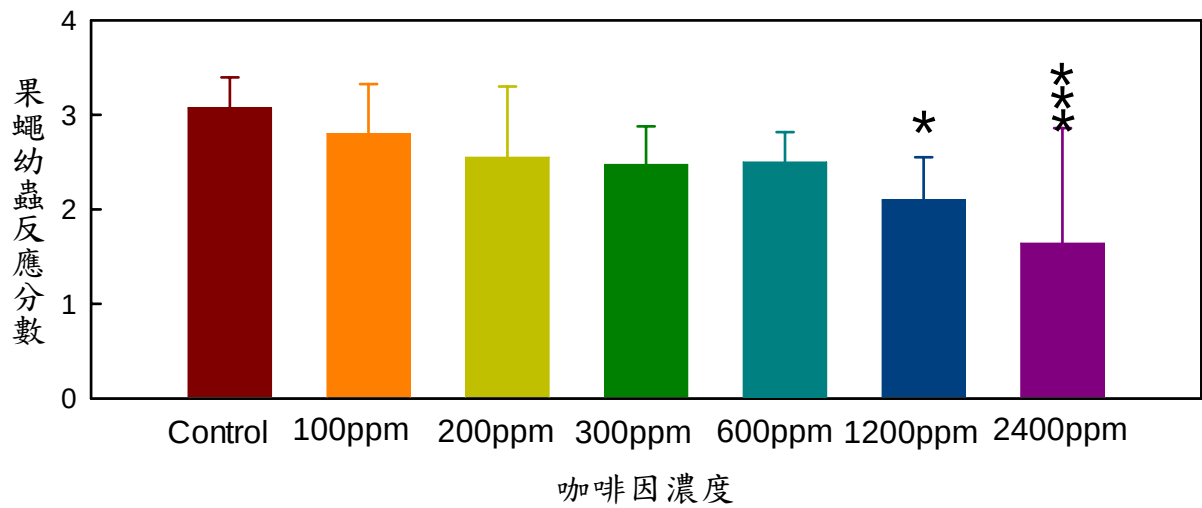


【圖十二】 咖啡因對果蠅幼蟲反應的影響（親代服用咖啡因、子代未服用咖啡因）

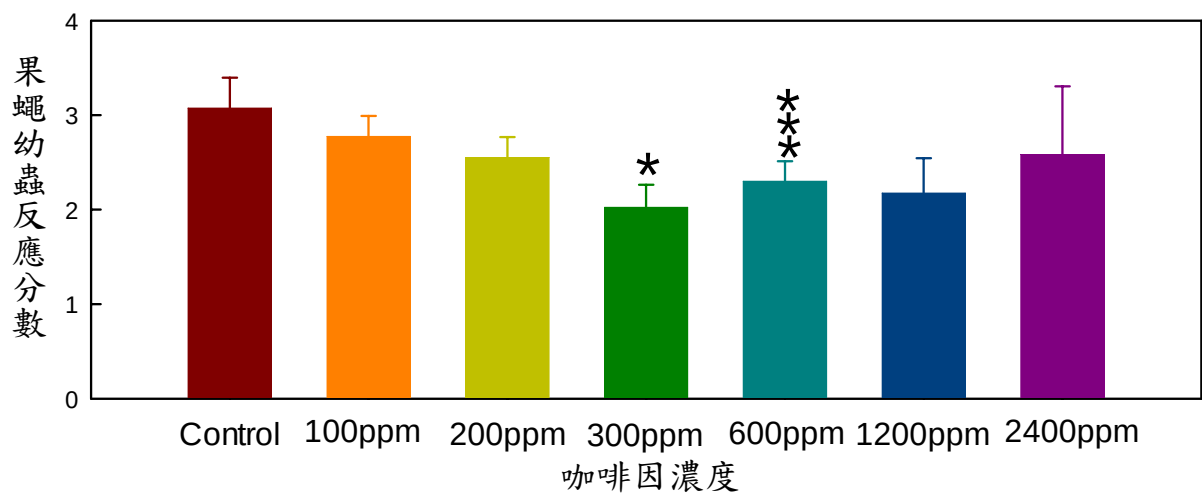
(親代未服用咖啡因、子代服用咖啡因)



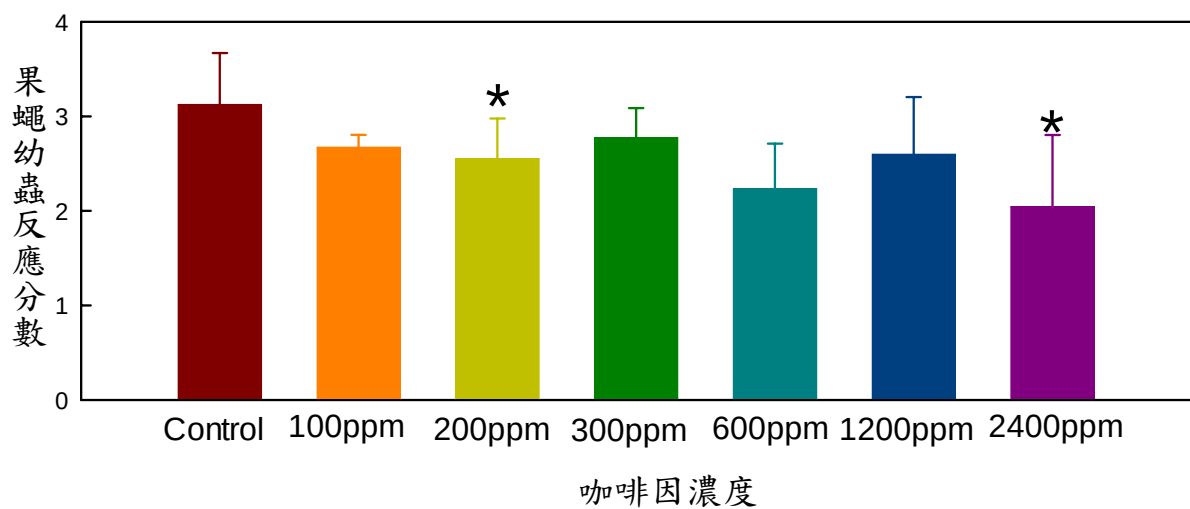
【圖十三】 咖啡因對果蠅幼蟲反應的影響（親代未服用咖啡因、子代服用咖啡因）



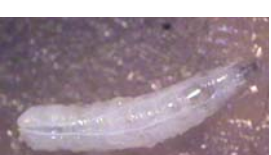
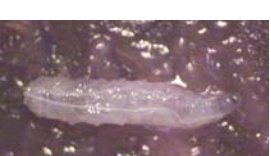
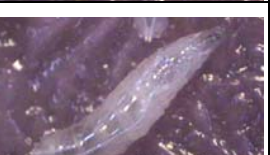
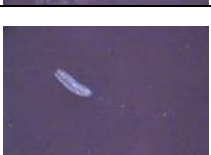
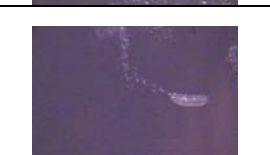
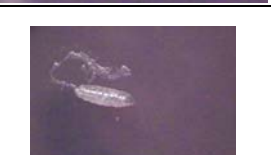
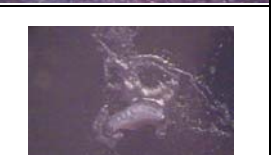
【圖十四】 咖啡因對果蠅幼蟲期平均反應的影響（親代、子代均服用咖啡因）



【圖十五】 咖啡因對果蠅幼蟲期平均反應的影響（親代服用咖啡因、子代未服用咖啡因）



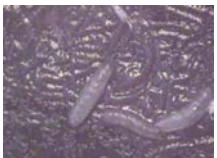
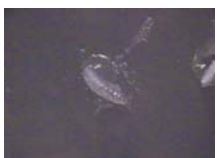
【圖十六】 咖啡因對果蠅幼蟲期平均反應的影響（親代未服用咖啡因、子代服用咖啡因）

	DAY1	DAY2	DAY3	DAY4	DAY5	DAY6	DAY7
Control							
100 ppm 咖啡因							
200 ppm 咖啡因							
300 ppm 咖啡因							
600 ppm 咖啡因							
1200 ppm 咖啡因							
2400 ppm 咖啡因							

【圖十七之一】咖啡因對果蠅幼蟲發育形態的影響（親代、子代均服用咖啡因）

	DAY8	DAY9	DAY10	DAY11	DAY12	DAY13	DAY14
Control		羽化					
100 ppm 咖啡因		羽化					
200 ppm 咖啡因		羽化					
300 ppm 咖啡因		羽化					
600 ppm 咖啡因				羽化			
1200 ppm 咖啡因					羽化		
2400 ppm 咖啡因	死亡						

【圖十七之二】咖啡因對果蠅幼蟲發育形態的影響（親代、子代均服用咖啡因）

	DAY1	DAY2	DAY3	DAY4	DAY5	DAY6	DAY7
P : Control F ₁ : Control							
P : 100ppm 咖啡因 F ₁ : Control							
P : 200ppm 咖啡因 F ₁ : Control							
P : 300ppm 咖啡因 F ₁ : Control							
P : 600ppm 咖啡因 F ₁ : Control							
P : 1200ppm 咖啡因 F ₁ : Control							
P : 2400ppm 咖啡因 F ₁ : Control							

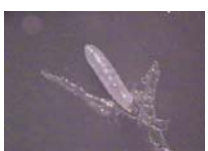
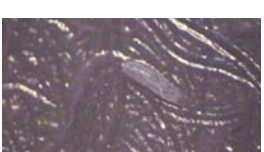
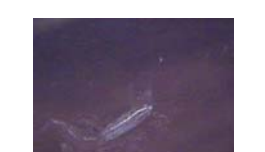
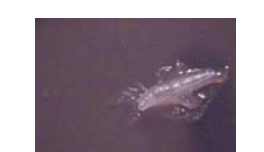
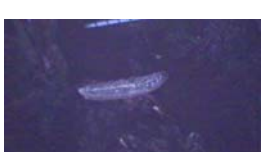
【圖十八之一】咖啡因對果蠅幼蟲發育形態的影響（親代服用咖啡因、子代未服用咖啡因）

— 1 mm

	DAY8	DAY9	DAY10
P : Control F ₁ : Control		羽化	
P : 100ppm 咖啡因 F ₁ : Control		羽化	
P : 200ppm 咖啡因 F ₁ : Control		羽化	
P : 300ppm 咖啡因 F ₁ : Control		羽化	
P : 600ppm 咖啡因 F ₁ : Control		羽化	
P : 1200ppm 咖啡因 F ₁ : Control		羽化	
P : 2400ppm 咖啡因 F ₁ : Control			羽化

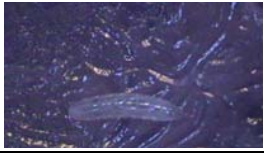
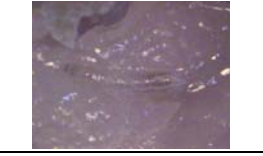
【圖十八之二】咖啡因對果蠅幼蟲發育形態的影響（親代服用咖啡因、子代未服用咖啡因）

 1 mm

	DAY1	DAY2	DAY3	DAY4	DAY5	DAY6	DAY7
P : Control F ₁ : Control							
P : Control F ₁ : 100ppm 咖啡因							
P : Control F ₁ : 200ppm 咖啡因							
P : Control F ₁ : 300ppm 咖啡因							
P : Control F ₁ : 600ppm 咖啡因							
P : Control F ₁ : 1200ppm 咖啡因							
P : Control F ₁ : 2400ppm 咖啡因							

【圖十九之一】咖啡因對果蠅幼蟲發育形態的影響（親代未服用咖啡因、子代服用咖啡因）

— 1 mm

	DAY8	DAY9	DAY10	DAY11	DAY12	DAY13	DAY14
P : Control F ₁ : Control		羽化					
P : Control F ₁ : 100ppm 咖啡因		羽化					
P : Control F ₁ : 200ppm 咖啡因		羽化					
P : Control F ₁ : 300ppm 咖啡因		羽化					
P : Control F ₁ : 600ppm 咖啡因				羽化			
P : Control F ₁ : 1200ppm 咖啡因					羽化		
P : Control F ₁ : 2400ppm 咖啡因							

【圖十九之二】咖啡因對果蠅幼蟲發育形態的影響（親代未服用咖啡因、子代服用咖啡因）

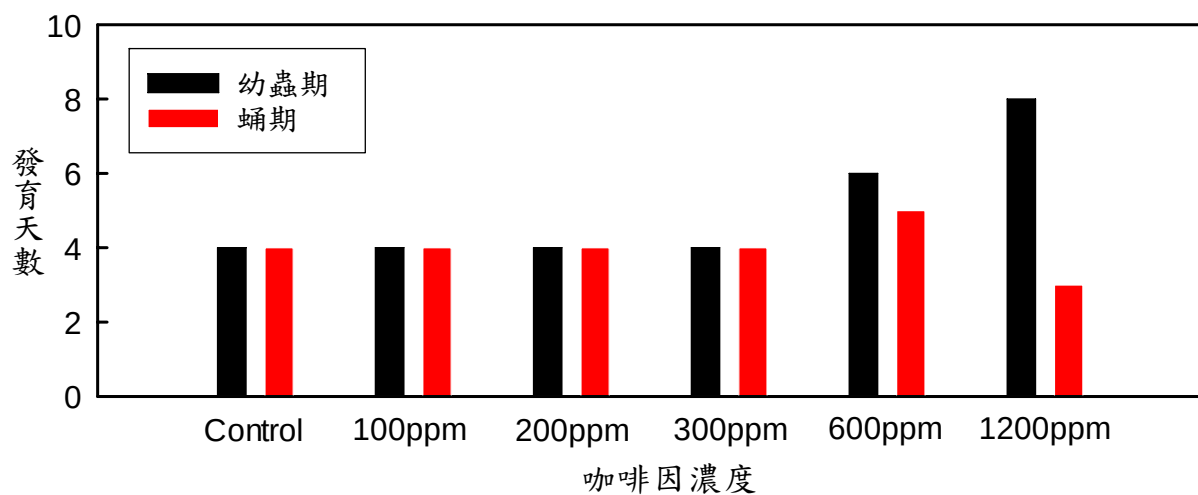
— 1 mm

	DAY15	DAY16	DAY17	DAY18	DAY19	DAY20	DAY21
P : Control F ₁ :2400ppm 咖啡因							
	DAY22	DAY23					
P : Control F ₁ :2400ppm 咖啡因			羽化				

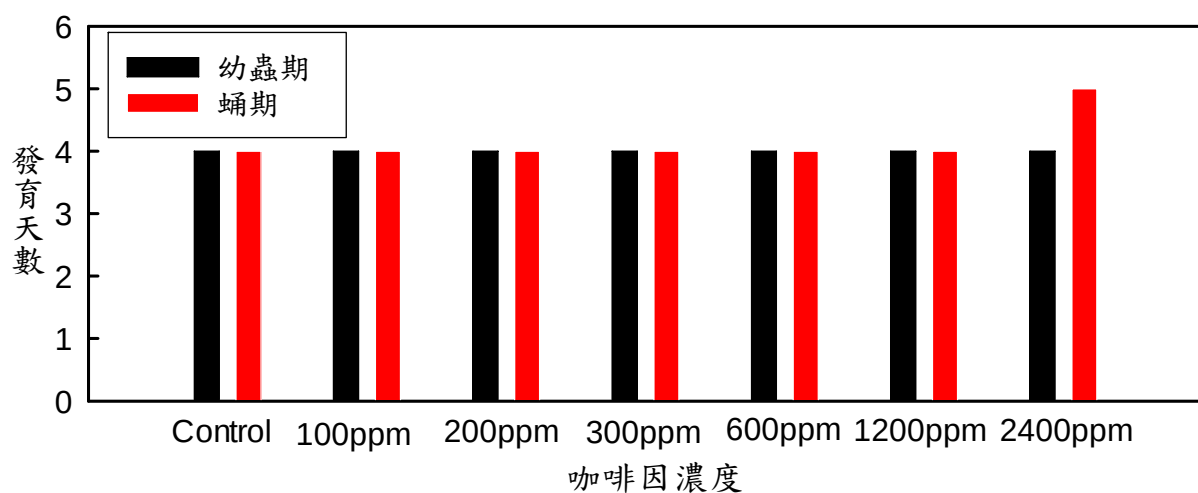
【圖十九之三】

咖啡因對果蠅幼蟲發育形態的影響（親代未服用咖啡因、子代服用咖啡因）

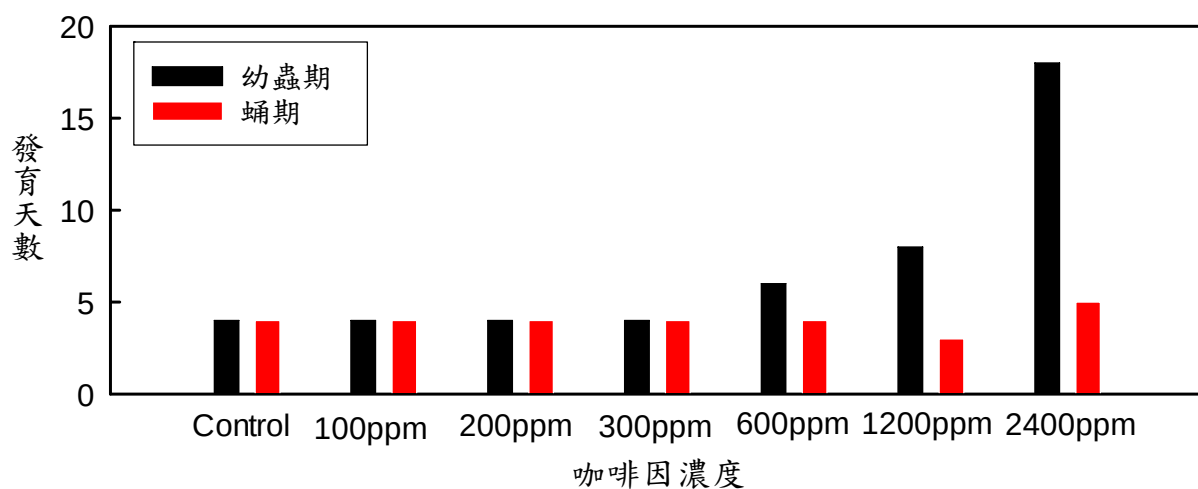
1 mm



【圖二十】 咖啡因對果蠅幼蟲發育時間的影響（親代、子代均服用咖啡因）



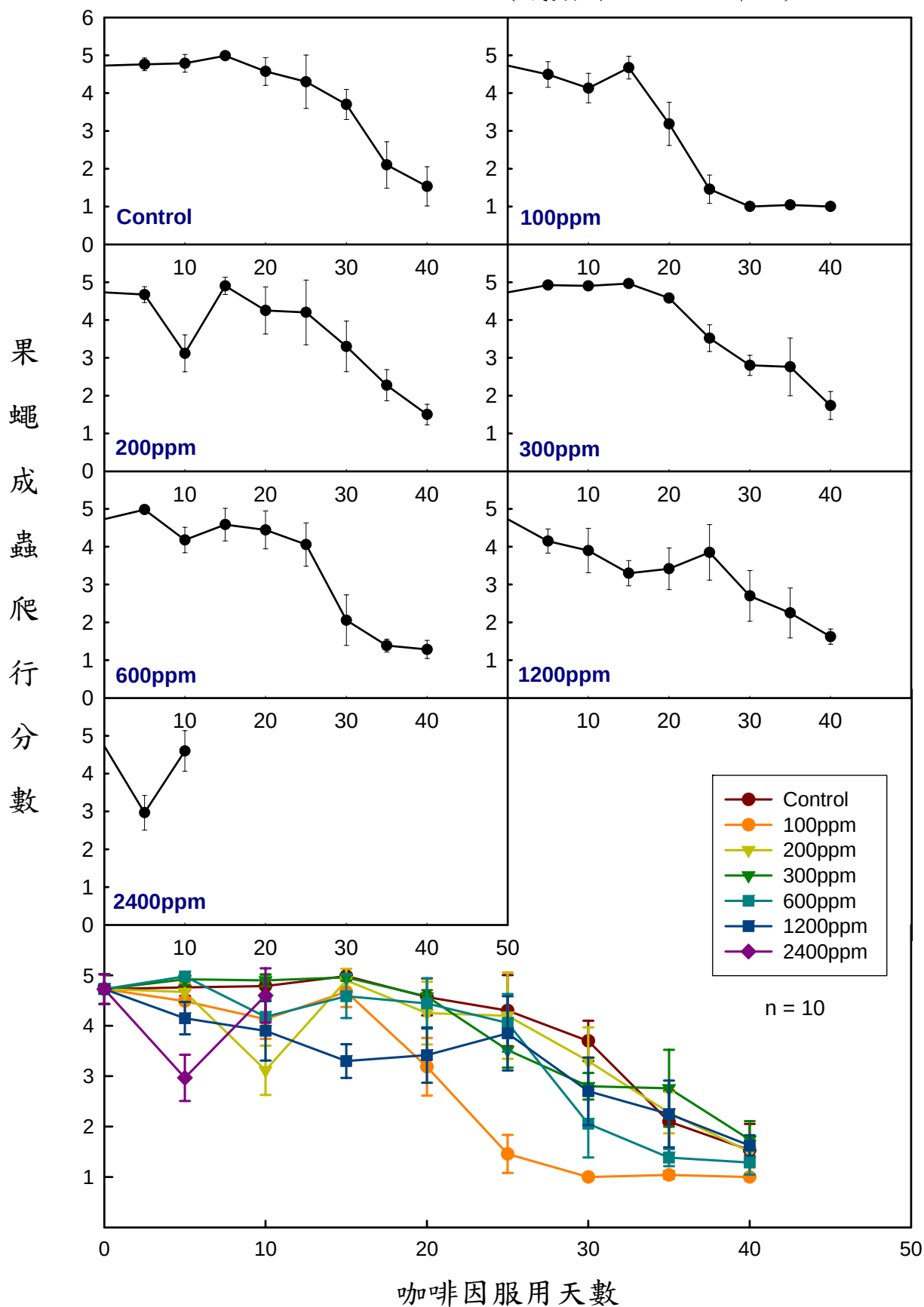
【圖二十一】 咖啡因對果蠅幼蟲發育時間的影響（親代服用咖啡因、子代未服用咖啡因）



【圖二十二】 咖啡因對果蠅幼蟲發育時間的影響（親代未服用咖啡因、子代服用咖啡因）

咖啡因對成蟲爬行反應的影響

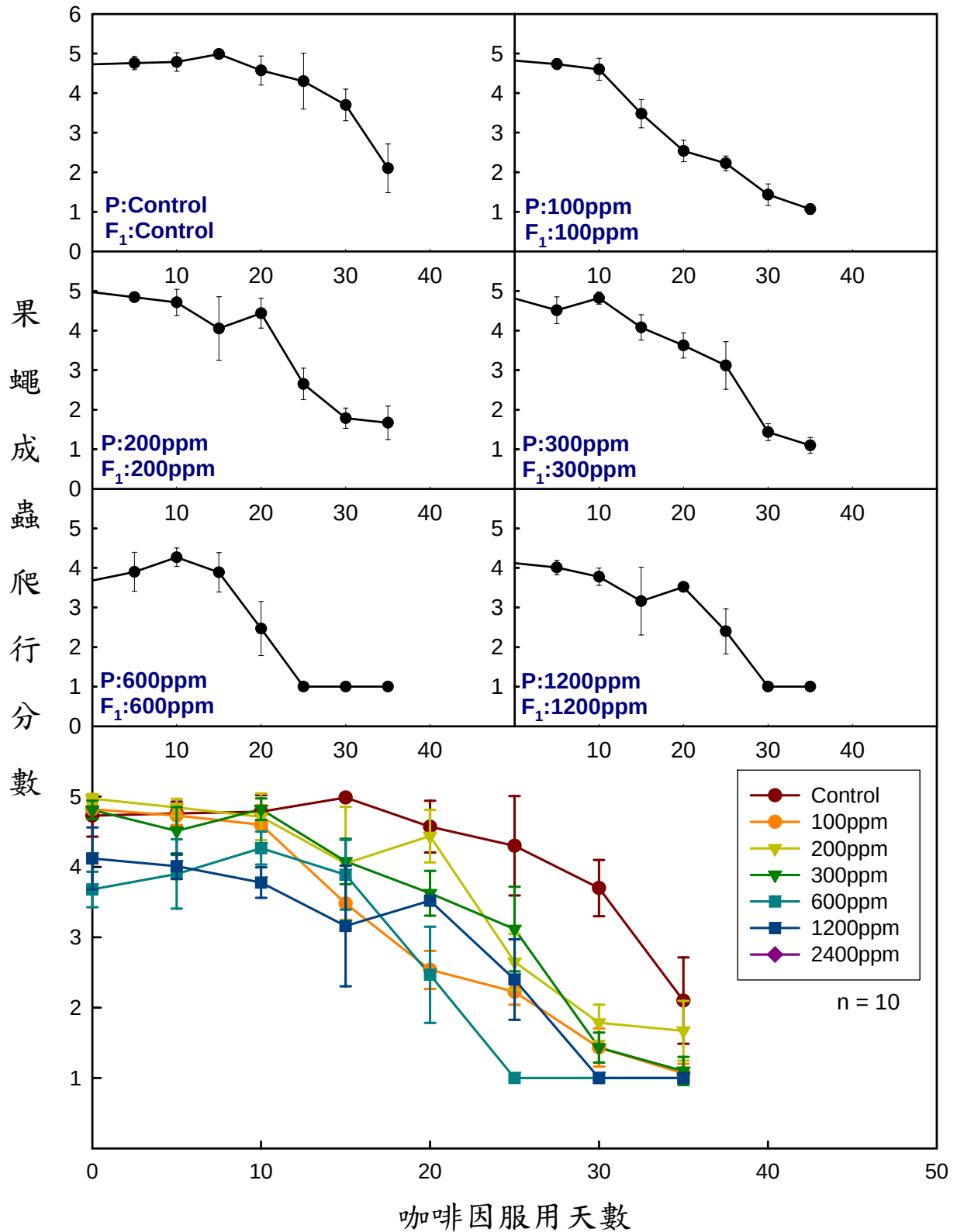
(成蟲期始服用咖啡因)



【圖二十三】咖啡因對果蠅成蟲爬行反應的影響（果蠅於成蟲期始服用咖啡因）

咖啡因對成蟲爬行反應的影響

(親代於成蟲期服用咖啡因，子代於幼蟲期始服用咖啡因)

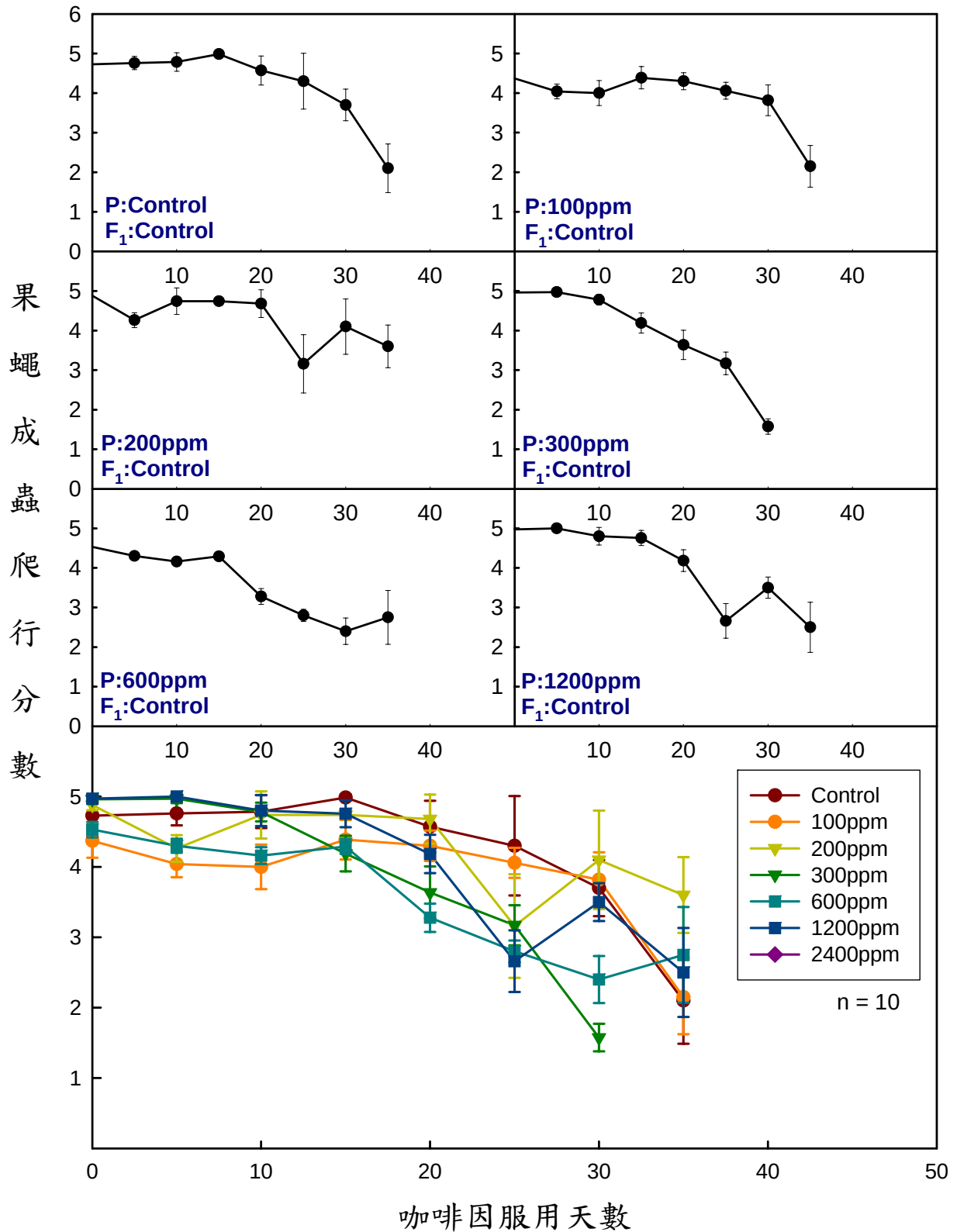


【圖二十四】咖啡因對果蠅成蟲爬行反應的影響

(親代於成蟲期服用咖啡因，而子代於幼蟲期始服用咖啡因)

咖啡因對成蟲爬行反應的影響

(親代於成蟲期服用咖啡因，而子代未服用咖啡因)

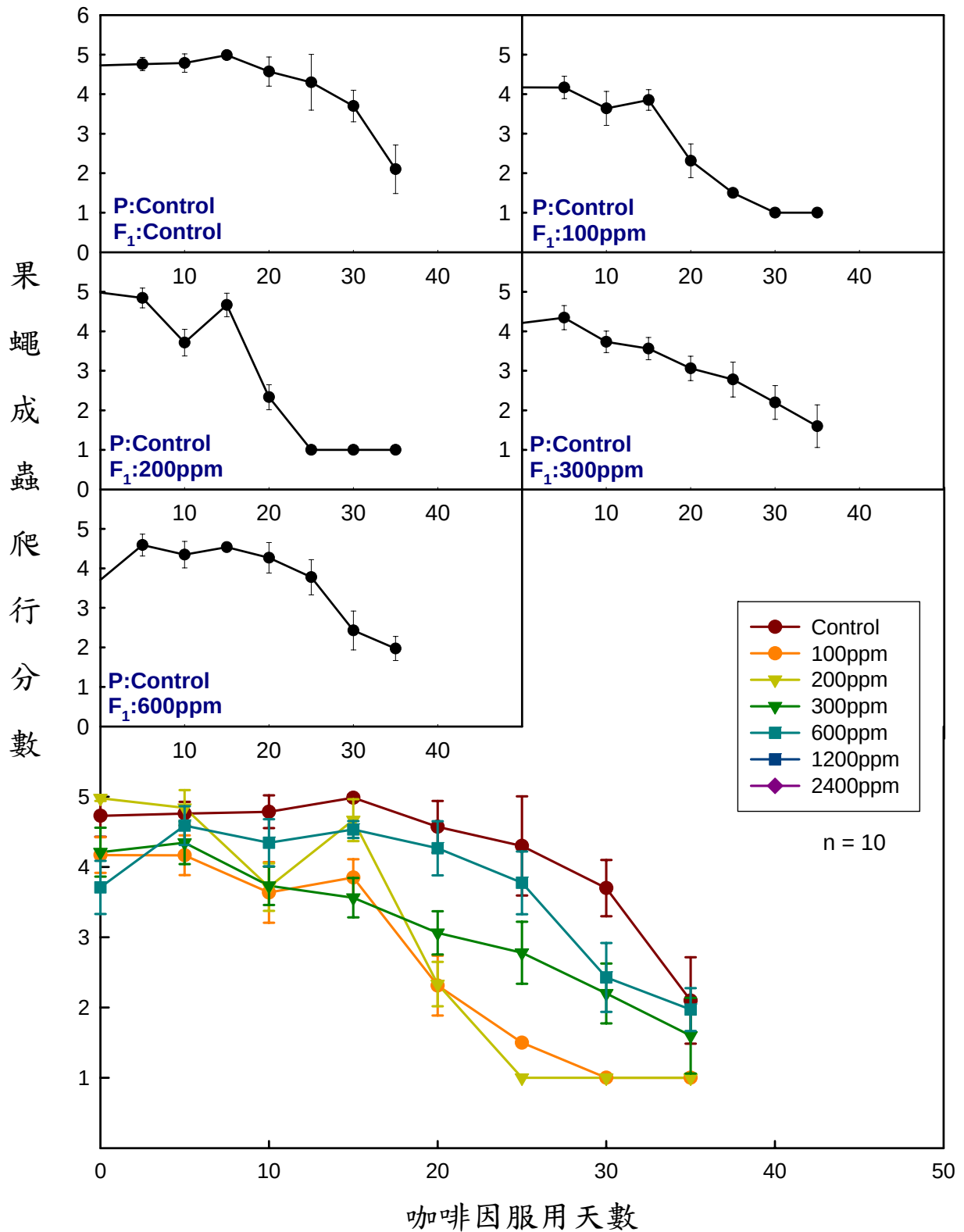


【圖二十五】咖啡因對果蠅成蟲爬行反應的影響

(親代於成蟲期服用咖啡因，而子代未服用咖啡因)

咖啡因對成蟲爬行反應的影響

(親代未服用咖啡因，而子代於幼蟲期始服用咖啡因)



【圖二十六】 咖啡因對果蠅成蟲爬行反應的影響

(親代未服用咖啡因，而子代於幼蟲期始服用咖啡因)

評語

040723 被遺忘的隱憂-下午茶(探討咖啡因對果蠅生長發育的影響)

1. 實驗過程用心，細心觀察。
2. 但實驗中咖啡因的量是否對果蠅而言，屬過量範圍。
3. 建議探討果蠅是否具有咖啡因之細胞受器。