

國立臺灣大學生物資源暨農學院昆蟲學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Entomology
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis



益達胺對黑棘蟻的亞致死效應

Sublethal effects of imidacloprid on the gray-black spiny
ant, *Polyrhachis dives*

戴允文

Yun-Wen Dai

指導教授：楊恩誠 博士

楊景程 博士

Advisors: En-Cheng Yang, Ph. D.

Chin-Cheng Yang, Ph. D.

中華民國 105 年 1 月

Jan 2016

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書



益達胺對黑棘蟻之亞致死效應
Sublethal effects of imidacloprid on the gray black spiny
ant, *Polyrhachis dives*

本論文係戴允文君 (R02632010) 在國立臺灣大學昆蟲學系、所
完成之碩士學位論文，於民國 105 年 01 月 18 日承下列考試委員審查
通過及口試及格，特此證明

指導教授：

國立臺灣大學昆蟲系暨研究所

楊恩誠博士 (指導教授)

國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程

楊景程博士 (指導教授)

口試委員：

國立彰化師範大學生物學系

林宗岐博士

國立臺灣大學昆蟲學系暨研究所 系主任、所長

(是否須簽章依各院系所規定)

楊恩誠
教授

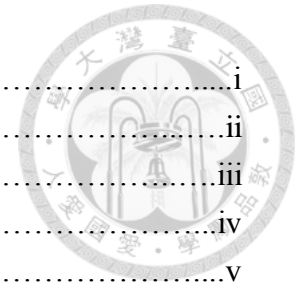
楊景程
助理教授

林宗岐
副教授

楊恩誠 (簽名)

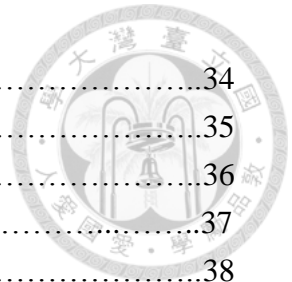
目錄

目錄.....	i
表次.....	ii
圖次.....	iii
致謝.....	iv
摘要.....	v
Abstract.....	vi
壹、前言.....	1
貳、往昔研究.....	3
一、類尼古丁殺蟲劑的特性.....	3
二、益達胺對昆蟲的毒性評估.....	4
三、益達胺對昆蟲的影響.....	4
1. 蜜蜂 (<i>Apis mellifera</i>).....	5
2. 其他昆蟲.....	6
四、黑棘蟻的生物學及重要性.....	8
五、化學藥劑對種間競爭的影響.....	9
參、材料與方法.....	10
一、試驗昆蟲採集及飼養.....	10
二、口服毒性資料建立.....	10
(一) 藥劑配置.....	10
(二) 口服毒性試驗.....	11
(三) 濃度挑擇.....	11
三、覓食活動檢定.....	12
四、不同藥劑對黑棘蟻與入侵外來種螞蟻間個體種間競爭.....	12
五、不同藥劑對黑棘蟻與入侵外來種螞蟻間群組種間競爭.....	13
六、統計分析.....	13
肆、結果.....	15
益達胺對黑棘蟻的口服毒性.....	15
覓食活動檢定.....	15
不同藥劑對黑棘蟻與入侵外來種螞蟻間個體種間競爭.....	16
不同藥劑對黑棘蟻與入侵外來種螞蟻間群組種間競爭.....	17
伍、討論.....	19
覓食活動.....	19
新類尼古丁對種間交互作用的影響.....	20
陸、參考文獻.....	23
柒、附錄.....	54



表次

表一、物種間互動三種行為階段大致分類與定義.....	34
表二、以不同濃度益達胺處理黑棘蟻小型蟻巢之死亡率.....	35
表三、以不同濃度益達胺處理黑棘蟻外勤蟻之死亡率.....	36
表四、益達胺處理黑棘蟻於 72 小時之 LC1、LC15 及 LC50.....	37
表五、第一隻黑棘蟻抵達食物區的時間.....	38
表六、不同藥劑處理下，黑棘蟻個體與小型入侵紅火蟻相遇後第一次展現行為模式之比例	39
表七、不同藥劑處理下，黑棘蟻個體與大型入侵紅火蟻相遇後第一次展現行為模式之比例	40
表八、個體競爭下火蟻及黑棘蟻死亡率.....	41
表九、群體試驗後的黑棘蟻與紅火蟻的死亡率.....	42



圖次

圖一、黑棘蟻覓食活動場所.....	43
圖二、黑棘蟻與入侵紅火蟻個體競爭場示意圖.....	44
圖三、黑棘蟻與入侵紅火蟻群體競爭場示意圖.....	45
圖四、黑棘蟻於四十八小時間的覓食活動.....	46
圖五、黑棘蟻接觸不同濃度處理之益達胺時，黑棘蟻與紅火蟻進入中央食物區的時間.....	47
圖六、火蟻累積存活率.....	48
圖七、黑棘蟻累積存活率.....	49
圖八、火蟻於種間競爭時之死亡地點.....	50
圖九、黑蟻於種間競爭時之死亡地點.....	51
圖十、火蟻死亡時間.....	52
圖十一、黑棘蟻死亡時間.....	53

誌謝

求學一路走的顛簸，需要學習與感謝的太多。首先要感謝兩位指導教授楊景程老師與楊恩誠老師，研究的道路是無遠弗屆的，謝謝兩位老師帶我進入螞蟻與農藥的世界。不僅在學識上，老師在生活上也時常幫助我、開導我。也謝謝兩位老師仍不記前嫌地教導我這駑鈍的學生。

謝謝 103 的各位，書書函芝世綵鈺芳學姊，小明寄綸宏瑋學長，柏遵其龍柏瑋，謝謝你們的體貼及包容，給大家添了很多麻煩，很抱歉。謝謝 206 的各位，與你們相處的時光很快樂，希望大家都能順順利利。

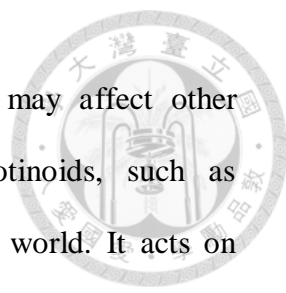
感謝我的家人，曾經半年沒回家的我，是個不孝子，感謝媽媽不停的打電話騷擾我，讓我知道高雄還有個家等著我回去，感謝爸爸在臉書傳一些商業週刊的文章，讓我提早了解社會的脈絡。感謝我身邊的朋友，謝謝你們的支持與鼓勵，我不常顯露悲傷的氛圍，但你們卻能知道我何時憂愁，並適時的給我打氣。除了謝謝，還是謝謝。

摘要

使用殺蟲劑的主要目的為消滅害蟲，但可能會造成其他非標的的生物的影響，如授粉者（蜜蜂）或其他捕食性昆蟲。益達胺為目前廣泛使用之系統性殺蟲劑，作用於昆蟲的尼古丁型之乙醯膽鹼受器（nicotinic acetylcholine receptor, nAChR），導致神經興奮過度（hyperpolarization）而麻痺死亡。研究顯示益達胺的亞致死效應對昆蟲生理與行為會造成影響，其中以造成外勤蜂不正常的覓食行為最為顯著。但同為社會性昆蟲之螞蟻卻幾乎無此類研究。螞蟻於覓食過程中，可能會直接接觸環境中殘留之藥劑或取食遭受藥劑污染的昆蟲或物質，使毒性累積於螞蟻體內；並可能藉由交哺作用（trophallaxis）傳遞給幼蟲，進而導致蟻巢衰弱。本研究選用黑棘蟻（*Polyrhachis dives*）作為研究材料，首先建立黑棘蟻的毒性資料，藉給予黑棘蟻亞致死濃度 LC₁ 及致死濃度 LC₁₅ 及 LC₅₀ 的益達胺，檢測覓食行為、行為反應及個體與群體種間競爭的結果是否受到影響。結果顯示益達胺降低黑棘蟻對食物分子的反應並影響覓食趨勢。覓食時間（foraging time）皆無顯著差異，但在致死濃度（LC₁₅ 及 LC₅₀）下標準差幅度變大，推測益達胺影響黑棘蟻腦中的感知系統，導致對外界刺激反應降低。在個體種間競爭部分，無論遭遇 major 或 minor 入侵紅火蟻，致死濃度（LC₁₅ 及 LC₅₀）的接觸使黑棘蟻侵略行為明顯下降，亞致死濃度（LC₁）則無顯著差異，個體競爭死亡率亦無顯著差異。在群體種間競爭部分，致死濃度的施用造成火蟻存活率上升，亞致死濃度則無顯著差異。此結果支持益達胺的施用會改變螞蟻的行為及改變種間競爭的結果，推測益達胺可能影響螞蟻的感知系統或腦中處理行為的區域，進而造成黑棘蟻行為改變。

關鍵詞：覓食活動、種間競爭、新類尼古丁藥劑、黑棘蟻、亞致死效應、入侵紅火蟻

Abstract



The purpose of applying insecticide is to control pest, but it may affect other non-target individual, like pollinators or predators. Neonicotinoids, such as imidacloprid, is a systematic insecticide widely used around the world. It acts on nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) inducing hyperpolarization and death. Previous studies indicated sublethal effect of imidacloprid could affect behavior of insects. Only few concerned about ant, as one of the important social insects. Ant may contact the residue of insecticide or intake prey killed by insecticide to aggregate insecticide inside the body and pass to the larva through trophallaxis, thus inducing colony collapse eventually. We built oral toxicity data of imidacloprid and tested whether imidacloprid contamination could affect foraging, behavioral reactions and interactions between a native ant *Polyrhachis dives* and an invasive ant *Solenopsis invicta* with sublethal (LC_1) and lethal concentrations (LC_{15} and LC_{50}). The results showed that imidacloprid contamination reduces the reactions of *P. dives* to food signal and affects foraging patterns. The food discovery time was not affected, but dynamic in the lethal concentrations, suggesting that imidacloprid might affect cognitive system in brain and consequently hampers the reactions to stimulus. During interspecific competition at individual level, exposed individuals displayed reduced aggression at lethal concentrations, but not at sublethal concentrations. The mortality of interspecific competition was not affected. During interspecific competition at small colony fragment level, survivorship of fire ants increase in lethal concentrations, but was no significantly affected at sublethal ones. These results suggest that that the exposure of neonicotinoid could affect behaviors of ants and the interspecific interaction outcomes among different species.

Key words: foraging behavior, interspecific competition, neonicotinoid, *Polyrhachis dives*, *Solenopsis invicta*, sublethal effect.

壹、前言

隨著全世界人口急速上升，糧食需求為目前人類面臨到的重要問題之一，而化學藥劑的使用為目前保護作物的主要手段。施用殺蟲劑的目的為消滅目標害蟲，但也會影響到非標的昆蟲例如授粉者蜜蜂或其他捕食性昆蟲。殺蟲劑對殘存個體造成生理或行為上的影響，稱為亞致死效應 (sublethal effect)，藉由亞致死或致死劑量或濃度影響昆蟲 (Desneux *et al.*, 2007)。研究指出存在於田間的益達胺濃度約在 10 µg/kg 以下 (Curé *et al.*, 1999; Schmuck, 1999; Schmuck *et al.*, 2001; Bonmatin *et al.*, 2003; Decourtye *et al.*, 2004a)，此濃度與半致死濃度及致死濃度相距甚遠。但藉由表面 (topical)、飲食 (dietary) 及殘留 (residual) 等方式，可能使昆蟲接觸到低濃度或劑量的殺蟲劑，反覆地覓食可能使毒性累積於體內 (Kunkel *et al.*, 2001; Pareja *et al.*, 2011)。

益達胺 (imidacloprid) 為類尼古丁 (neonicotinoid) 的神經毒殺蟲劑，作用於菸鹼酸乙醯膽鹼接受器 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)，使昆蟲神經刺激麻痺而死 (Yamamoto, 1965; Bai *et al.*, 1991; Tomizawa and Yamamoto, 1992;1993; Tomizawa and Casida, 2003;2005)。

接觸性及胃毒性的系統殺蟲劑的特性，使其可以經由植物的輸導系統分布全身。主要防治刺吸式口器害蟲，對節肢動物毒性高，對哺乳類毒性低，因此廣受害蟲防治市場的喜愛。但益達胺的亞致死效應造成許多昆蟲的行為及生理產生影響 (Desneux *et al.*, 2007)。

入侵紅火蟻 (*Solenopsis invicta*) 為立足於台灣的外來入侵種，根據紅火蟻防治中心的用藥資料，益達胺為防治入侵紅火蟻的推薦藥劑之一，藥劑的撒佈，可能會使其他螞蟻接觸到益達胺的機會增加。黑棘蟻 (*Polyrhachis dives*) 為台灣常見的螞蟻，偏好居住於中空物體內如廢棄竹筒，台灣農民常使用竹筒作為籬笆，增加黑棘蟻暴露於藥劑的機率。前人研究指出，火蟻發生地區與黑棘蟻族群重疊 (Tsai *et al.*, 2009)，使黑棘蟻可能接觸到益達胺。基於生物抗性的 (biotic resistance)

概念，黑棘蟻具有領域性及巡邏之行為，並會主動攻擊入侵紅火蟻，為抵抗火蟻的潛力物種 (Wu *et al.*, 2013)，可以改善目前防治火蟻面臨的花費昂貴及防治成效亦受影響等問題。

目前研究多著重於對人類經濟價值高的授粉者蜜蜂身上，對於同為膜翅目的螞蟻研究則較為少數。本研究首先建立益達胺對黑棘蟻的口服毒性資料，並藉由給予黑棘蟻不同濃度的益達胺 (LC₁、LC₁₅ 及 LC₅₀)，觀察益達胺的亞致死效應對其覓食規律、及個體及群體種間競爭的影響，提供未來藥劑防治害蟲時對本土性黑棘蟻的影響的科學評估。

貳、往昔研究



一、類尼古丁殺蟲劑的特性

類尼古丁殺蟲劑為尼古丁的類似物，主要與生物體中央神經系統的菸鹼酸乙醯膽鹼接受器 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 進行不可逆 (irreversibly) 的結合，由於乙醯膽鹼酯酶無法分解類尼古丁，使其對於菸鹼酸乙醯膽鹼接受器產生持續的神經刺激，使生物麻痺、痙攣或興奮而死亡 (Yamamoto, 1965; Bai *et al.*, 1991; Tomizawa and Yamamoto, 1992, 1993; Tomizawa and Casida, 2003, 2005)。由於類尼古丁殺蟲劑對昆蟲的菸鹼酸乙醯膽鹼接受器親和力較脊椎動物的高，使其對哺乳類的毒性較低，對節肢動物例如昆蟲等毒性較高 (Liu and Casida, 1993; Yamamoto *et al.*, 1995; Tomizawa *et al.*, 2000; Matsuda *et al.*, 2001; Tomizawa and Casida, 2003, 2005)。由於此特性，類尼古丁殺蟲劑被廣泛使用於植物保護上。

最早合成出的類尼古丁殺蟲劑為 nithiazine [2-(nitromethylene)-tetrahydro-1,3-thiazine]，其有效成分為 nitromethylenen，由於對光的穩定性不佳，無法被作為商品化殺蟲劑 (Schroeder *et al.*, 1984; Sattelle *et al.*, 1989; Mullins, 1993; Kagabu and Medej, 1995; Kagabu, 1997)。益達胺 [imidacloprid, 1-(6-chloronicotiny)-2-(nitroimino)-imidazolidine] 問世之後，因其對光的穩定性佳 (Moriya *et al.*, 1992; Mullins, 1993; Kagabu and Medej, 1995; Kagabu and Akagi, 1997; Matsuda *et al.*, 2001) 及毒性對昆蟲較哺乳類佳等特性，使其在害蟲防治市場上成為熱門商品 (Liu and Casida, 1993; Kagabu and Medej, 1995; Kagabu, 1997; Kagabu and Akagi, 1997; Nauen *et al.*, 2001; Tomizawa and Casida, 2003)。但近期的文獻指出，益達胺的使用對哺乳類的神經系統可能會造成影響 (Kimura-Kuroda *et al.*, 2012)。

益達胺為具有胃毒性及接觸性之系統性殺蟲劑，並且具有可溶於水的特性 (610mg/L, 20°C)，因此得以用於進於種子處理、粒劑施用、葉面噴灑及土壤施用的方式進行害蟲防治 (Elbert *et al.*, 1990)。益達胺主要針對半翅目與繭翅目等刺吸式口器之昆蟲，例如葉蟬、蚜蟲、薊馬、介殼蟲及粉蝨，對咀嚼式昆蟲，例如鱗翅



目幼蟲及鞘翅目昆蟲也具有良好的防治效果。但益達胺對線蟲及蟎類則效果不佳。除了殺蟲效果外，益達胺也具有殺卵效果 (Elbert *et al.*, 1991)。


二、益達胺對昆蟲的毒性評估

評估殺蟲劑對於標的物的毒性在過去常使用半數致死量 (the median lethal dosage, LD50) 及半數致死濃度 (the median lethal concentration, LC50) 作為主要毒性指示，但亞劑量的濃度或劑量 (sublethal concentration or dose) 也需列入考慮範圍。亞劑量的濃度雖然不會直接造成昆蟲的死亡，卻有可能造成昆蟲行為的改變。無論是致死濃度或是亞致死劑量都可能影響昆蟲的行為，稱為亞致死效應 (sublethal effect)，其定義為殺蟲劑 (濃度可為亞致死或致死) 對接觸過殺蟲劑的殘存個體產生生理或行為上的影響 (Desneux *et al.*, 2007)。

許多研究指出，益達胺存在於環境中的土壤、花粉及花蜜中，其濃度約在 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下，因此在野外實際的狀況下，昆蟲並不會接觸到達半數致死劑量或濃度等致死劑量 (Curé *et al.*, 1999; Schmuck, 1999; Schmuck *et al.*, 2001; Bonmatin *et al.*, 2003; Decourtye *et al.*, 2004a)。類尼古丁殺蟲劑作用為不可逆之特性，因此對昆蟲的毒性是具累積性的 (Rondeau *et al.*, 2014)。根據前人報告指出，衰弱的蜂群 (depopulated beehives) 所居住的蜂巢及內部的蜂蠟有相對高的益達胺殘留 (Pareja *et al.*, 2011)，表示野外殘留的低濃度益達胺，可能會經由外勤昆蟲的日常活動帶入而累積於巢內。然而社會性昆蟲 (蜜蜂及螞蟻) 的數量龐大，藉由大量外勤昆蟲進行覓食活動以支持巢內同伴的需求。藥劑的施用使非標的昆蟲可能藉由表面 (topical)、飲食 (dietary) 及殘留 (residual) 等方式接觸到野外殘留的殺蟲劑 (Kunkel *et al.*, 2001)，外勤昆蟲於野外反覆地覓食，進而增加接觸環境中低濃度的益達胺的機率，且可能會導致毒性的累積，或者藉交哺行為 (trophallaxis) 將含有益達胺的食物傳遞給幼蟲，進而導致蟻群衰弱。

二、益達胺對昆蟲的影響

自從 1994 年開始，法國發現蜜蜂取食向日葵園中之花蜜後產生不正常的行




為，例如蜂群衰弱、歸巢失敗及蜂產品產量減少，原因可能與大量使用益達胺處理過的向日葵種子 (Gaucho®) 進行種植有關。研究顯示，益達胺於向日葵的輸導系統移行並擴散到各個部位，造成取食向日葵之昆蟲，接觸益達胺藥劑後死亡 (Schmuck, 1999; Schmuck *et al.*, 2001)。此事件也導致全球開始注意益達胺對蜜蜂的影響。

1. 蜜蜂 (*Apis mellifera*)

由於蜜蜂對農業及生態系統非常重要 (Klein *et al.*, 2007; Kremen *et al.*, 2007)，且近幾年發生的蜂群衰竭失調症候群 (Colony collapse disorder, CCD) (Stokstad, 2007) 可能與蜜蜂暴露在化學藥劑中有關 (Thompson, 2003; Desneux *et al.*, 2007)，使許多與益達胺相關的研究多著重在西方蜂身上。

過去研究亞致死效應對蜜蜂的影響，分成行為及生理兩部分。在行為部分，若蜜蜂口服攝入 100 µg/kg 及 500 µg/kg 的益達胺蔗糖溶液後，會造成其移動能力及溝通能力下降，進而影響蜜蜂的群體行為 (Medrzycki *et al.*, 2003)；取食益達胺濃度為 0.5 µg/L 和 5 µg/L 的蔗糖溶液會造成蜜蜂採集花粉的頻率改變和封蓋率下降 (Faucon *et al.*, 2005)；若取食含 6-100 µg/kg 益達胺的 50% 蔗糖溶液會影響蜜蜂的採集活動力及頻率 (Bortolotti *et al.*, 2003; Decourtye *et al.*, 2003; Colin *et al.*, 2004; Ramirez-Romero *et al.*, 2005)；使用濃度 50 µg/L 食物給予蜜蜂取食，會造成蜜蜂產生不正常的行為 (人工餵食器與蜂巢的往返時間拉長) (Yang *et al.*, 2008)；給予益達胺 1.5 ng/bee 劑量會導致外勤蜂的覓食活動的減少及更長的覓食飛行時間 (Schneider *et al.*, 2012)；給予蜜蜂含有 100 ppb 或 500 ppb 益達胺的蔗糖溶液 30-60 分鐘後，會使蜜蜂的活動性及溝通能力下降 (Medrzycki *et al.*, 2003)；取食益達胺濃度為 6 µl/kg 的糖水會造成外勤蜂中取食糖水的比例降低 (Colin *et al.*, 2004)。給予蜜蜂 500 ppb 及 100 ppb 益達胺蔗糖溶液取食，待 30-60 分鐘後使蜜蜂覓食，會造成蜜蜂於野外消失 (Bortolotti *et al.*, 2003)。

在生理的部分，濃度為 12-24 µg/kg 的益達胺會損害嗅覺學習能力 (Decourtye




et al., 2003; Decourtye *et al.*, 2004a); 益達胺劑量為 12 ng/bee 會影響蜜蜂的中期嗅覺記憶 (medium-term olfactory memory) (Decourtye *et al.*, 2004a); 給予幼蟲含 0.04 ng/larva 及 0.4 ng/larva 劑量的益達胺的糖水，會使其羽化後學習能力下降 (Yang *et al.*, 2012); 研究指出，在益達胺含量高的蜂巢中，會出現羽化日期延後的現象，另外也會造成蜜蜂壽命縮短及生存率降低 (Woyciechowski and Moron, 2009; Wu *et al.*, 2011); 餵食幼蟲含 5 µg/L 益達胺的食物會造成發育遲緩 (Decourtye and Devillers, 2010); 給予幼蟲 24 ng/larva 劑量的益達胺會造成其封蓋率下降 (Yang *et al.*, 2012); 在益達胺殘留量為 45 ng/g 的蜂巢中，發現幼蟲出現發育遲緩現象 (Wu *et al.*, 2011)。

2. 其他昆蟲

除了蜜蜂的研究為大宗外，過去益達胺的亞致死效應對昆蟲的研究，多著重在害蟲上。

在行為影響部分，南方散白蟻 (*Reticulitermes virginicus*) 接觸到經過濃度為 100 ppm 益達胺處理的土壤後，挖隧道的行為降低 (Thorne and Breisch, 2001); 以 10 ng/insect 劑量滴定於切葉蟻 (*Acromyrmex subterraneus subterraneus*) 背板上會造成清潔行為頻率降低 (Galvanho *et al.*, 2013); 某單家蟻 (*Monomorium antarcticum*) 接觸到濃度為 1 µg/mL 益達胺會使侵略行為降低 (Barbieri *et al.*, 2013); 入侵紅火蟻接觸到 0.01 µg/mL 益達胺會增加挖隧道活動，0.25 µg/mL 會減少挖隧道及覓食行為 (Wang *et al.*, 2015a); 某步行蟲 (*Harpalus pennsylvanicus*) 接觸到施用 0.336 g [AI]/ha 益達胺的草皮會產生麻痺、不正常行走及過度的清潔行為 (Kunkel *et al.*, 2001)。菸草粉蝨 (*Bemisia tabaci*) 取食經過益達胺濃度為 8.59 ppm (LC₂₀) 及 30.86 ppm (LC₄₀) 處理的葉子，蜜露排放量及產卵量降低，接觸到 LC₄₀ 濃度使 F1 子代雌性的數量降低 (He *et al.*, 2011; Barbieri *et al.*, 2013)。拒食效應 (antifeedant effect) 也在許多昆蟲身上觀察到，例如入侵紅火蟻取食 0.01 µg/mL 益達胺後造成其糖水消耗量減少 (Wang *et al.*, 2015a); 0.5 ppm 的益達胺處理後植



株造成菸草粉蝨的拒食效應 (Nauen *et al.*, 1998); 桃蚜 (*Myzus persicae*) (Sulzer) 接觸 0.08 mg/L (LC15) 益達胺濃度會造成蜜露分泌量下降及產生可逆的拒食效應 (Nauen, 1995); 煙草蚜蟲 (*M. nicotinae* Blackman) 接觸 0.0272 mg/L 產生拒食行為 (Devine *et al.*, 1996; Nauen and Elbert, 1997)。

在生理影影響部分，光間星天牛 (*Anoplophora glabripennis* (Motschulsky)) 雌蟲每日接觸 10 ppm 或 30 ppm 益達胺，造成卵孵化率下降 (Ugine *et al.*, 2011)。某無螫蜂 (*Melipona quadrifasciata anthidioides*) 接觸 100 ppm 會影響腦部發育及死亡率 (Tome *et al.*, 2012); 阿根廷蟻 (*Linepithema humile*) 接觸到濃度為 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 益達胺 造成 F1 子代數目下降 (Barbieri *et al.*, 2013); 以 5.25 g/100L 濃度的益達胺處理雌性菸草蚜蟲及桃蚜 (*M. persicae* (Sulzer)) 造成繁殖力下降 (Devine *et al.*, 1996); 台灣黑尾葉蟬 (*Nephotettix virescens* (Distant)) 及偽黑尾葉蟬 (*N. cincticeps* Uhler) 接觸 0.01 ppm 益達胺，造成繁殖力下降 (Widiarta *et al.*, 2001); 褐飛蝨 (*Nilaparvata lugens*) 接觸 0.09ng/insect (LD20) 劑量的益達胺造成繁殖力下降 (Bao *et al.*, 2009); 中黑苜蓿盲蝽 (*Adelphocoris saturalis* (Jakovlev)) 接觸 6.524 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的益達胺造成繁殖力下降 (Li *et al.*, 2008); 以 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的益達胺濃度處理柑橘木蝨 (*Diaphorina citri* Kuwayama) 造成壽命、繁殖力及幼蟲存活及發育率降低 (Boina *et al.* 2009); 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的益達胺會顯著地使撫育能力下降，並造成卵孵化數量及化蛹數量下降 (Wang *et al.*, 2015b)。

益達胺的亞致死效應不只對昆蟲造成負面效果，過去研究顯示低濃度益達胺可能會造成特定害蟲生殖率或產卵量的增加。在桃蚜的例子中，接觸 0.1-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的益達胺後，會刺激生殖量 (Cutler *et al.*, 2009); 二點葉蟎 (*Tetranychus urticae* Koch) 接觸或取食以濃度為 0.011 [AI] 或 0.013 [AI] 益達胺施用後的植物會刺激生殖率和壽命 (James and Price, 2002); 三化螟 (*Tryporyza incertulas* (Walker)) 接觸經過 22.5 g [AI]/ha 的益達胺噴灑的水稻會增加繁殖率 (Wang *et al.*, 2005); 以 0.0053% [AI] 益達胺施用於田間則會提高某鈍綫蟎 (*Amblyseius victoriensis*)

(Acari: Phytoseiidae) 的產卵量 (James, 1997)。



四、黑棘蟻的生物學及重要性

許多益達胺亞致死效應的研究都與授粉者蜜蜂或農業害蟲相關，但在扮演重要生態指標之螞蟻卻少有相關涉獵 (Ellison *et al.*, 2007; Gerlach *et al.*, 2013)，因此本研究以台灣常見之黑棘蟻作為實驗材料，以評估益達胺對螞蟻之亞致死效應的全面性調查。

黑棘蟻 (gray-black spiny ant, GBSA, *Polyrhachis dives*) 屬於膜翅目，蟻科，棘山蟻屬，屬於樹棲及地棲性的螞蟻。分布範圍廣布於東南亞、日本、台灣及中國南方等的，在台灣為低海拔常見物種，可於平原、丘陵等地形觀察到其族群。黑棘蟻具有編織行為，其幼蟲會吐絲 1-3 個星期，成蟲會利用幼蟲製造的絲與廢棄植株與土壤粒子結合，加強巢內結構。蟻巢常建築於葉子、雜草及樹枝間。在田間觀察下，黑棘蟻常築巢於具有中空結構之物體，例如塑膠管、廢棄竹筒或飲料罐。黑棘蟻常觀察到與蚜蟲科 (Aphidae)、介殼蟲科 (Coccidae)、粉介殼蟲 (Pseudococcidae) 及角蟬科 (Membracidae) 等昆蟲產生共生行為 (Liefke *et al.*, 1998)。

基於生物抗性 (biotic resistance) 的概念，具有生物抗性的潛力物種可以提升環境抵抗外來物種的能力，以及降低入侵物種定植成功機率 (Elton, 2013)。研究指出，黑棘蟻具有主動攻擊入侵紅火蟻之趨勢，並且因為其領域性及主動巡邏 (patrolling) 等特性，可於入侵紅火蟻初期建立族群時利用攻擊或競爭的方式下降其族群密度 (Wu *et al.*, 2013)。台灣目前入侵紅火蟻的防治策略主要為大量且密集地撒布餌劑。根據國家紅火蟻防治中心的用藥資料，益達胺為防治入侵紅火蟻的推薦藥劑之一，並且入侵紅火蟻發生的區域往往可見黑棘蟻族群的存在 (Tsai *et al.*, 2009)。因此防治入侵紅火蟻的同時，黑棘蟻可能會受到益達胺的影響。除此之外，先前提到益達胺主要用來防治刺吸式口器的害蟲，研究指出黑棘蟻常與此類昆蟲

具有共生關係 (Liefke *et al.*, 1998)，若共生昆蟲取食系統性藥劑處理的作物，黑棘蟻接觸共生昆蟲蟲體或蜜露時，也可能受到藥劑影響。



五、化學藥劑對種間競爭的影響

先前提到益達胺的亞致死效應對殘存個體產生理及行為上的影響。然而行為改變可能對群體造成廣泛的影響 (Wolf and Weissing, 2012)。對社會性昆蟲而言，競爭資源的行為常與群落大小 (colony size) 與行為可塑性 (behavioural plasticity) 有密切的關係 (Sagata and Lester, 2009)。接觸到殺蟲劑所導致的行為改變足以改變種間交互關係 (interspecific interactions) 的結果。在阿根廷蟻與某單家蟻的例子中，接觸到益達胺會改變侵略行為的比例，進而改變兩物種間的交互作用 (Barbieri *et al.*, 2013)。

不同種類的昆蟲具有不同的食物偏好，在螞蟻這個大群體 (community) 裡，有些種類偏好特定的植物部位 (如：種子)，或藉由共生生物 (如蚜蟲) 直接獲取植物物質，或在大自然中擔任捕食者的角色 (Lester *et al.*, 2003; Cerda *et al.*, 2013)。種類間食物的偏好可能造成對釋放或殘留於野外的化學物質如殺蟲劑，具有不同的接觸程度。資源的競爭實質上影響許多生物體的適存度 (fitness)，包含社會性昆蟲螞蟻 (Cerda *et al.*, 2013)。接觸到殺蟲劑所導致的行為改變足以改變種間交互關係的結果。本土種與外來種的交互關係可能與此種改變具有關聯性。若此種效應於本土種及外來種的交互關係間產生放大，將會對生態多樣性及全球變遷造成重大的問題。

參、材料與方法



一、試驗昆蟲採集及飼養

本研究以黑棘蟻作為研究昆蟲，採集地點為新北市林口，因其蟻巢常築於中空物體的內部（例如竹筒、塑膠桶或中空木頭內），故從採集地帶回實驗室後進行蟻巢分離，並提供 50 mL 塑膠管離心管作為蟻巢，以利實驗進行。塑膠離心管置於塑膠盆內，並在盆內邊緣塗上 fluon (東昇化工) 避免黑棘蟻脫逃。

黑棘蟻飼養於 $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 及 12L:12D 光週期之溫控生長箱。每日提供適量水分，以維持蟻巢濕度。另外將水分裝載至 50 mL 塑膠離心管並以棉花充填，作為水分來源，食物來源則提供蜂蜜布丁、10% 糖水作為碳水化合物來源，冷凍蟋蟀作為蛋白質來源，平均三到四天清理蟻巢廢棄物及補充所需食物。

二、口服毒性資料建立

本研究為觀察益達胺的亞致死效應對黑棘蟻的影響，故使用不同濃度的益達胺對黑棘蟻進行致死率的觀察。目前尚未有研究關於黑棘蟻的口服毒性資料，本研究將建立益達胺對黑棘蟻的口服毒性資料。

(一) 藥劑配置

益達胺 (95% TG, Bayer Cropscience AG) 為粉末狀，需溶解於 acetone (>99.5%, LCY Chemical Co.) 或 dimethylsulfoxide (DMSO, MP Biomedical) 等有機溶劑中。在先前的研究指出，蜜蜂攝食丙酮之後，覓食活動會受到影響，反之，取食 0.1% DMSO 之後，覓食活動則無被影響 (Yang *et al.*, 2008)。在前測試中，觀察到與 DMSO 混合的糖水對於黑棘蟻並無產生忌避作用，因此本研究選擇 DMSO 作為溶解益達胺的有機溶劑。

以電子分析天平 (精確度為 0.1 mg) 稱量出 10 mg 的益達胺粉末，將之加入 10 mL 的 DMSO 的溶液中，得到濃度為 1 mg/mL 的益達胺溶液，此溶液將作為保存溶液 (stock)。將保存溶液稀釋 10 倍，配置成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作為中間濃度



(intermediate concentration) 溶液，以利後續的配藥進行。

(二) 口服毒性試驗

本實驗利用提供含有益達胺的糖水 (10%)，使黑棘蟻攝食益達胺至體內，以建立益達胺對黑棘蟻的口服毒性。

將小型蟻巢 (ant-colony fragment，含 100 隻工蟻及 1 隻蟻后) 或 50 隻外勤蟻放置於塗有 fluon 的塑膠盆中，盆內含有塑膠管作為簡易蟻巢，每日提供食物及水分。每個小族群會飼養至少三天後進行實驗。將小型蟻巢及外勤蟻進行 48 小時飢餓處理 (不提供水)，確保每個組別間具有相同的飢餓程度。飢餓處理後，提供含有益達胺的糖水，並在 24 小時後移除，計算提供藥劑後 24、48 及 72 小時的黑棘蟻死亡率及蟻后狀態。

根據前試驗的資料，挑選的濃度依據為最高濃度需造成黑棘蟻高於 80% 死亡率，最低濃度需造成黑棘蟻低於 20% 死亡率。小型蟻巢提供的益達胺濃度分別為 10、8、5、4、2、1、0.6 及 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。外勤蟻提供益達胺濃度分別為 4、2.67、1.77、1.18 及 0.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；0.5% DMSO 及 10% 糖水 (sugar water) 為對照組。

本實驗為了決定行為檢測所使用的濃度，具有行走能力的個體視為存活個體，無法行走的個體視為死亡個體。

(三) 濃度挑擇

殺蟲劑的施用不僅對標的害蟲直接造成族群量的改變，也會對其生理及行為產生不直接的影響。亞致死效應 (sublethal effect) 定義為殺蟲劑施用後對存活個體的生理或行為上的影響，殺蟲劑的濃度或劑量可為亞致死或致死 (Desneux *et al.*, 2007)。在本研究中，選用與控制組死亡率無顯著差異的 LC_{1} 作為亞致死濃度及與控制死組亡率具顯著差異的 LC_{15} 及 LC_{50} 作為致死濃度，這三種濃度作為評估益達胺對黑棘蟻的亞致死效應。

三、覓食活動檢定

本實驗為檢測益達胺是否對覓食活動產生影響，將觀察接觸益達胺後的黑棘蟻覓食規律及食物搜尋能力是否產生改變。

將小型蟻巢進行口服毒性實驗，待 72 小時後（亦即飢餓處理 48 小時），挑選 100 隻黑棘蟻（外勤蟻與內勤蟻比例為 3:7）及一隻蟻后，置於含有一根透明塑膠管（以鋁箔紙包裹）的塑膠盆內。將 1 公尺長的塑膠管與塑膠盆及食物區進行連結（圖一）。先前研究指出，食物的大小會影響軌跡費洛蒙 (trail pheromone) 留下的次數及招喚的外勤蟻數量 (Mercier and Lenoir, 1999)。為了減少因食物體積或重量的不同造成的差異，各組提供的食物體積及重量均一致。以攝影機記錄 48 小時，紀錄第一隻黑棘蟻抵達食物的時間及每十分鐘食物區的黑棘蟻數量。覓食蟻蟻判定的基準為計算在食物上之個體。

四、不同藥劑對黑棘蟻與入侵外來種螞蟻間個體種間競爭

Rao & Vinson (2009) 表示單隻工蟻個體間的互動能推測螞蟻族群間的互動，並提出行為趨勢判定基準 (Rao and Vinson, 2009)，經過統計分析可歸納出三種行為模式（攻擊、防禦及擾動），藉 Wu *et al.* (2013) 修改自 Rao & Vinson (2009) 提出的行為趨勢判定基準（表一），以三種模式詮釋黑棘蟻與入侵外來種螞蟻彼此接觸所採用的行為策略。在田間觀察下，黑棘蟻與入侵紅火蟻的領域有重疊性 (Tsai *et al.*, 2009)，故使用紅火蟻作為與黑棘蟻競爭的對象。另外，由於外勤蟻有較高機率與其他種螞蟻進行互動，本實驗採用的螞蟻皆為外勤蟻。

以直徑五公分的塑膠培養皿作為互動地點，邊緣塗上 fluon 避免螞蟻逃出，利用毛筆將入侵紅火蟻個體移至培養皿上，將經過藥劑處理的黑棘蟻放入直徑三公分的 50 mL 離心管，管壁內塗上 fluon，倒置於培養皿（圖二）。靜置十分鐘後，將倒置的離心管移除，使黑棘蟻與入侵紅火蟻個體進行互動並記錄之。此試驗使用三巢不同藥劑處理的黑棘蟻各三十隻，與來自同一巢之入侵紅火蟻進行互動，由於入侵紅火蟻工蟻為工蟻多態型 (polymorphism)，體長為連續分佈，先前研究

指出，黑棘蟻遭遇不同體型的入侵紅火蟻所表現的攻擊行為比例會改變 (Wu *et al.*, 2013)，故我們使用體長大於 3 mm 者 (major) 及體長小於 3 mm 者 (minor)，紀錄兩蟻互動之後的受傷情況與死亡比例。

黑棘蟻與入侵紅火蟻個體競爭在各組間行為展現的次數不一致，另外，兩蟻遭遇所展現特定行為類型 (侵略或非侵略行為) 多寡也不同，因此本研究選用黑棘蟻與入侵紅火蟻第一次遭遇的所展現的行為進行分析。

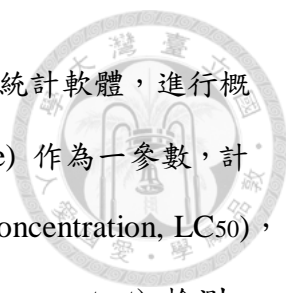
五、不同藥劑對黑棘蟻與入侵外來種螞蟻間群組種間競爭

本實驗為評估益達胺的亞致死效應對螞蟻種間競爭結果及競爭領域是否具有影響。為了模擬入侵紅火蟻再入侵 (re-invasion) 之情形，入侵紅火蟻之新建族群從鄰近區域移入，因此未受藥劑影響。在藥劑防治區的黑棘蟻已先受到藥劑影響，因此本實驗僅對黑棘蟻接觸益達胺。入侵紅火蟻族群含有 1 隻蟻后、20 隻工蟻，及 10 隻幼蟲，經過藥劑處理的黑棘蟻群體含有 80 隻工蟻，及一隻蟻后。兩群體皆進行三天飢餓處理，供應水分但不提供食物。競爭場地為三個塑膠容器組成 (圖三)，邊緣皆塗上 fluon 避免螞蟻逃脫，將兩蟻種置於兩邊的塑膠容器，中間為中央覓食區，含有蟋蟀及蜂蜜果凍作為食物來源，以 50 公分塑膠通道連接三個容器。實驗開始兩小時內，每十五分鐘記錄一次螞蟻死亡率，之後每小時記錄一次，記錄至九小時。另外，紀錄工蟻之死亡位置 (火蟻蟻巢、黑棘蟻蟻巢及中央覓食區)。

六、統計分析

口服毒性資料建立

若控制組的死亡率介於 5 - 20 %，則藥劑對標的物的死亡率將使用 Abbott's formula 公式進行校正 (Abbott, 1925)。若控制組的死亡率低於 5%，則可忽視且不須校正。若控制組死亡率高於 20%，則此實驗數據將不列入計算。



黑棘蟻的死亡率使用 Polo Plus 2.0 (LeOra Software, 1987) 統計軟體，進行概率分析 (Probit analyze)，並將控制組的死亡個體 (nature response) 作為一參數，計算黑棘蟻小型蟻巢及外勤蟻之半數致死濃度 (the median lethal concentration, LC50)，利用半數致死濃度進行藥劑試驗，數據結果使用卡方檢定 (Chi-square test) 檢測 LC50 與半數死亡率是否具有顯著差異。若無顯著差異，則使用 Polo Plus 計算小型蟻巢及外勤蟻之 LC1 及 LC15。

覓食活動檢定

使用單因子變異數分析 (one-way ANOVA)，當有顯著差異時，再用事後檢定之最小顯著差異 (Least-Significant Difference tests (LSD)) 法比較處理間之差異性顯著。

不同藥劑對黑棘蟻與入侵外來種螞蟻間個體種間競爭

使用單因子變異數分析 (one-way ANOVA)，當有顯著差異時，再用事後檢定之最小顯著差異 (Least-Significant Difference tests (LSD)) 法比較處理間之差異性顯著。

不同藥劑對黑棘蟻與入侵外來種螞蟻間群組種間競爭

使用單因子變異數分析 (one-way ANOVA)，當有顯著差異時，再用事後檢定之最小顯著差異 (Least-Significant Difference tests (LSD)) 法比較處理間之差異性顯著。

肆、結果



益達胺對黑棘蟻的口服毒性

本研究利用將益達胺與 10% 糖水混合的方式，使螞蟻口服攝入益達胺，建立益達胺對黑棘蟻的口服毒性資料。小型蟻巢控制組死亡率於 24、48 及 72 小時處理後分別為 0、0.22 及 0.22%，外勤蟻控制組死亡率為 0%、0% 及 0%，皆低於 5%，因此死亡率校正可省略。


益達胺對小型蟻巢的致死率如表二所示。於處理後的 24、48 及 72 小時，5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上的濃度造成小型蟻巢 80% 以上的死亡率。1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下的濃度造成 30% 以下的死亡率。本試驗各組濃度在 24、48 及 72 小時皆無顯著差異，但 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 在 24 及 72 小時的死亡率具有顯著差異，死亡率分別為 73.05% 及 24.5%，該濃度呈現隨處理後時間增長，死亡率下降的結果，表示黑棘蟻之行走能力隨處理後的時間變長而有回復的現象。因此選用 72 小時的口服毒性資料進行概率分析。益達胺對蟻后的中毒症狀，提供益達胺為 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上的濃度，會造成黑棘蟻蟻后死亡及抽蓄行為，提供 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下的濃度，蟻后仍能正常行走(附錄一)。

益達胺對外勤蟻的致死率如表三所示，於處理後的 24、48 及 72 小時，2.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上的濃度造成大於 60% 的死亡率。1.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下的濃度造成小於 50% 的死亡率。本試驗各組濃度在 24、48 及 72 小時皆無顯著差異。

概率分析的結果如表四所示，小型蟻巢之 LC_{1} 、 LC_{15} 及 LC_{50} 分別為 0.42、1.20 及 2.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。外勤蟻之 LC_{1} 、 LC_{15} 及 LC_{50} 分別為 0.17、0.63 及 1.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。益達胺對黑棘蟻小型蟻巢及外勤蟻的反應曲線於附錄一及二所示。

覓食活動檢定

本研究使用不同益達胺濃度處理黑棘蟻之小型蟻巢，檢測黑棘蟻的覓食行為是否受到新類尼古丁藥劑的影響。覓食規律結果如圖四所示，10% sugar water 及



0.5% DMSO 的外勤蟻的數量在試驗開始後，食物區的黑棘蟻數量上升，到接近下午一點時達到覓食高峰後開始下降，到晚上七點達到覓食數量最低點。益達胺處理組 (LC1、LC15 及 LC50) 的外勤蟻對試驗開始的食物反應較弱，外勤蟻覓食的數量上升幅度較 10% sugar 及 0.5% DMSO 低。直到第二天早上七點，外勤蟻數量有逐漸上升的趨勢，表示黑棘蟻的覓食能力受到影響。另外，黑棘蟻在第二天晚上七點的覓食低峰期，外勤蟻數量下降，但在益達胺處理組 (LC50) 並無下降趨勢，到接近凌晨一點數量下才產生少許下降趨勢。

黑棘蟻食物探索時間如表五所示，花費的平均秒數 10% sugar water 為 118.33 ± 64.29 秒，0.5% DMSO 為 165.5 ± 77.33 秒，LC1 為 248.86 ± 112.64 秒，LC15 為 444.29 ± 785.78 秒，LC50 為 603.83 ± 463.57 ，結果顯示黑棘蟻抵達食物區的時間在不同處理間沒有顯著差異 (one-way ANOVA, $p > 0.05$)，但隨著處理的益達胺濃度上升，平均時間呈現變長的趨勢。並在處理組 (LC15 及 LC50) 中觀察到標準差浮動變大的現象。

不同藥劑對黑棘蟻與入侵外來種螞蟻間個體種間競爭

在行為紀錄的部分，依照 (Wu *et al.*, 2013) 修改自 Rao & Vinson (2009) 提出的螞蟻種間行為階段分類與定義表格以紀錄黑棘蟻與火蟻展現的行為模式 (表一)。將攻擊模式歸類為侵略行為 (aggressive)，防禦及擾動行為歸類為非侵略行為 (non-aggressive)，以利結果分析。

個體種間競爭實驗的數據統計可分為四種狀況，由於兩蟻相遇所展現的行為模式為獨立事件 (Wu *et al.*, 2013)，可分為黑棘蟻遭遇 minor 入侵紅火蟻後黑棘蟻或火蟻的行為展現及黑棘蟻遭遇 major 入侵紅火蟻後黑棘蟻或火蟻的行為展現。結果顯示黑棘蟻遭遇 minor 或 major 入侵紅火蟻在控制組 (10% sugar water 及 0.5% DMSO) 呈現的侵略行為皆高於非侵略行為 (表六及表七)，反之，入侵紅火蟻遭遇黑棘蟻呈現的侵略行為皆低於非侵略行為 (表六及表七)，但 major 入侵紅



火蟻展現的侵略行為比例高於 minor 火蟻 (表七)。

黑棘蟻接觸益達胺藥劑後，遭遇 minor 入侵紅火蟻的部分，黑棘蟻在不同濃度間呈現的行為比例具有顯著差異 (one-way ANOVA, $p < 0.05$)，事後檢定顯示 10% sugar water、0.5% DMSO 及亞致死濃度 (LC1) 間無顯著差異，但致死濃度 (LC15 及 LC50) 與控制組 (10% sugar water 及 0.5% DMSO) 及亞致死濃度 (LC1) 呈現顯著差異 (表六)。相反地，入侵紅火蟻遭遇不同濃度處理的黑棘蟻呈現的行為比例沒有顯著差異 (one-way ANOVA, $p > 0.05$)。遭遇 major 入侵紅火蟻的部分，黑棘蟻在不同濃度間呈現的行為比例具有顯著差異 (one-way ANOVA, $p < 0.05$)，事後檢定顯示致死濃度 (LC15 及 LC50) 與控制組 (10% sugar water 及 0.5% DMSO) 及亞致死濃度 (LC1) 呈現顯著差異 (表七)。無論體型大小，入侵紅火蟻遭遇不同濃度處理的黑棘蟻呈現的行為比例沒有顯著差異 (one-way ANOVA, $p > 0.05$)。結果顯示益達胺造成黑棘蟻對 minor 及 major 入侵紅火蟻所展現的侵略性行為比例下降。


兩蟻交互作用發生後，個體競爭死亡比例的部分，結果顯示黑棘蟻遭遇 minor 或 major 火蟻，入侵紅火蟻的傷亡率皆高於黑棘蟻。入侵紅火蟻死亡率在 LC15 及 LC50 有下降的趨勢 (表八)。

不同藥劑對黑棘蟻與入侵外來種螞蟻間群組種間競爭

當通道設置完成，黑棘蟻首先抵達中央食物區且迅速地招募巢內同伴，入侵紅火蟻較慢抵達中央食物區 (圖五)，覓食頻率較低且招募低數量的巢內同伴。黑棘蟻佔領中央食物區後，便開始探索入侵紅火蟻巢並對遭遇到的火蟻展開攻擊。

經過九小時的種間競爭，入侵紅火蟻及黑棘蟻的存活率與時間之趨勢圖如圖六及七所示。黑棘蟻及入侵紅火蟻在群體競爭結束後之累積死亡率如表九所示。結果顯示入侵紅火蟻的死亡率皆高於黑棘蟻。

黑棘蟻接觸不同濃度益達胺後與未接觸藥劑的入侵紅火蟻進行群體種間競爭，



結果呈現入侵紅火蟻之存活率在黑棘蟻以不同濃度益達胺處理組間呈現顯著差異 (one-way ANOVA, $p < 0.05$)，事後檢定顯示以致死濃度 (LC15 與 LC50) 處理組造成入侵紅火蟻之存活率與亞致死濃度 (LC1) 及控制組 (10% sugar water 及 0.5% DMSO) 造成的死亡率顯著地下降，而接觸藥劑之黑棘蟻的死亡率於不同處理下無顯著差異 (表九)。

進一步評估兩種螞蟻於不同處理下之死亡分布情形評估其發生交互作用之主要場域，結果顯示入侵紅火蟻死亡率主要發生於中央食物區與入侵紅火蟻巢中 (圖八)；黑棘蟻的死亡分布主要發生於中央食物區與入侵紅火蟻巢中 (圖九)，顯示兩蟻產生攻擊或競爭之交互行為主要場域為中央食物區與入侵紅火蟻巢為主。然而不同藥劑處理下並未造成其死亡分布產生改變 (圖八及九)。值得一提的是，在兩組 LC50 處理組中，觀察到入侵紅火蟻進入黑棘蟻巢的情況發生，造成入侵紅火蟻死亡分布於黑棘蟻巢 (圖八)。

在死亡時間部分，結果顯示火蟻死亡率大部分發生在試驗開始後兩小時內 (圖十)；黑棘蟻死亡率大部分發生於試驗開始後三到六小時 (圖十一)，由於黑棘蟻體型上的優勢使攻擊後會立即造成火蟻致命的傷亡，入侵紅火蟻在體型上的劣勢，並不會造成黑棘蟻致命的死亡，使死亡時間延後三至六小時，然而不同藥劑處理下並未造成死亡時間的改變 (圖十及十一)。


伍、討論



覓食活動

本論文藉給予黑棘蟻小型蟻巢不同濃度 (LC1、LC15 及 LC50) 的益達胺糖水，檢測覓食活動是否受到影響，自實驗結果中發現，益達胺的接觸，會造成黑棘蟻對食物刺激後的覓食數量上升幅度下降。黑棘蟻前往食物區覓食的可能原因有兩個，第一，受到食物分子刺激後前往食物區覓食。第二，接收到同伴的化學軌跡 (chemical trail) 後招喚至食物區覓食。黑棘蟻使用招喚同伴的策略為 leader-independent trail communication，黑棘蟻不一定要跟隨偵查蟻 (scout ant) 的帶領前往食物資源，可跟隨化學軌跡的氣味抵達食物區，相較於其他棘山蟻屬螞蟻招募同伴的方式 (如 tandem running 及 group recruitment) 需要偵查蟻的帶領 (Liefke *et al.*, 2001)，化學軌跡對黑棘蟻招募同伴是十分重要的。兩個抵達食物區的原因皆需要觸角接收氣味分子完成。研究指出，菸鹼酸乙醯膽鹼接受器主要分佈於觸角葉、觸角神經及腦中處理嗅覺區域等感知系統上 (Bicker, 1999; Dacher *et al.*, 2005)，以尼古丁拮抗物 (nicotinic antagonist) 如益達胺餵食昆蟲後，會和 nAChR 結合造成學習與記憶的能力下降 (Lozano *et al.*, 2001)。觸角接收氣味分子的刺激後前往食物區之行為，需要學習與記憶等能力來完成。在蜜蜂的例子，許多研究指出益達胺的施用與嗅覺能力的損壞有關 (Decourtye *et al.*, 2003; Decourtye *et al.*, 2004a; Decourtye *et al.*, 2004b)。因此推測益達胺施用造成黑棘蟻的嗅覺能力受到影響，造成其對初期的食物分子訊號 (糖水) 或化學軌跡的反應減弱，造成初始招募工蟻的數量幅度較低。

在圖四中發現受到致死濃度 (LC50) 影響的黑棘蟻在第二天的覓食低峰期的覓食數量高於其他處理組。益達胺的施用可能造成黑棘蟻感知能力變差，進而影響覓食效率。而益達胺處理組在初期食物刺激下所產生的覓食數量較低，獲得食物的能量較少，因此在第二天覓食高峰產生後，為了補充第一天所不足的能量，使覓食活動持續進行，導致在覓食低峰時間的覓食數量沒有下降趨勢。

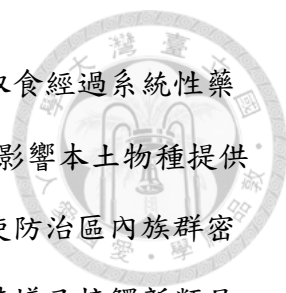


另外，本研究結果顯示，食物探索時間在致死濃度 (LC15 及 LC50) 與控制組及亞致死濃度 (LC1) 與控制組間在統計上無顯著差異，但標準差的浮動有上升趨勢。此現象可能與益達胺的攝入量有關。交哺作用可能造成黑棘蟻攝入量及累積量產生改變，此因素可能會使有些個體攝入會造成毒物興奮反應 (hormesis) 的劑量或影響嗅覺能力的劑量。前人研究指出，新類尼古丁藥劑會刺激昆蟲對氣味分子的反應，造成激效作用 (hormesis effect)，如 LD20 劑量 (0.25 ng) 的可尼丁 (clothianidin) 增加切根蟲 (*Agrotis ipsilon*) 雄蟲對性費洛蒙的反應 (Rabhi *et al.*, 2014)。蜜蜂也有相關文獻指出亞滅培 (acetamiprid) 在低於 LD0 的劑量會增加觸角對糖水刺激的敏感度 (Thany and Gauthier, 2005; El Hassani *et al.*, 2008)。由於黑棘蟻個體對益達胺攝入量的不同，使其對食物分子的反應不一致，可能為標準差浮動上升的原因。

許多研究指出新類尼古丁藥劑影響蜜蜂的覓食能力 (Bortolotti *et al.*, 2003; Decourtye *et al.*, 2003; Medrzycki *et al.*, 2003; Colin *et al.*, 2004; Ramirez-Romero *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2012)。螞蟻和蜜蜂使用不同的策略去定位及傳達食物位置。大多數的螞蟻使用種類間或巢間 (colony-specific) 特殊的費洛蒙指引同伴或招喚同伴至食物地點，而坐落於觸角的化學接收器可辨別巢內同伴分泌的費洛蒙或食物散發的氣味分子 (Ozaki *et al.*, 2005)。另一方面，蜜蜂藉由特定的溝通方式，包含搖擺舞 (waggle dance) 協調覓食活動及食物方向定位 (Riley *et al.*, 2005)。由於新類尼古丁影響特定的神經傳遞途徑，並導致行為的改變。並且因為覓食策略的不同，新類尼古丁造成的影響在物種間亦不相同。

新類尼古丁對種間交互作用的影響

入侵紅火蟻於 2003 年在台灣發現蹤跡，族群主要分布於桃園、台北等地 (Yang *et al.*, 2009)。台灣防治火蟻以大量且密集撒布餌劑為主 (Tsai *et al.*, 2009)。因此，這些區域可能會殘留許多新類尼古丁藥劑 (例如益達胺)，並且可能會藉由



不同路徑影響其他螞蟻，如直接接觸施用於環境中的殺蟲劑、取食經過系統性藥劑處理的作物或共生昆蟲（如蚜蟲及介殼蟲）產生的蜜露，可能影響本土物種提供的生物抗性。若入侵紅火蟻防治區的火蟻因為藥劑的撒布，而使防治區內族群密度下降，造成周圍地區的入侵紅火蟻再入侵，若防治區內的黑棘蟻已接觸新類尼古丁藥劑，則火蟻的再入侵之創始族群 (founder population) 與受到藥劑影響的黑棘蟻相遇後會有更高的機率存活，增加立足或獨佔該棲地的食物資源的機率。

新類尼古丁藥劑普遍地以高濃度餌劑的劑型用於防治螞蟻 (Rust *et al.*, 2004; Jeschke *et al.*, 2010) 然而對非目標的螞蟻，低濃度農業藥劑的使用是個重大問題。在個體競爭部分，實驗結果顯示不管遭遇 major 或 minor 火蟻，黑棘蟻接觸致死濃度 (LC₁₅ 及 LC₅₀) 後，侵略行為的比例顯著地降低。在群體試驗中顯示接觸致死濃度 (LC₁₅ 及 LC₅₀) 的黑棘蟻會造成紅火蟻死亡率下降。

黑棘蟻在田間及實驗室觀察下，具備了強烈的領域性，並在蟻巢的周圍可發現工蟻巡邏的現象，這些工蟻同時也會抵禦靠近黑棘蟻巢敵人 (Jong, 2008)。本實驗也觀察到黑棘蟻會佔據中央覓食區及通往入侵紅火蟻巢之通道，與 (Wu *et al.*, 2013) 的結果類似。於群體試驗中，發現 LC₅₀ 處理組中有兩組裝載的黑棘蟻巢的塑膠盆內具有入侵紅火蟻死亡個體。表示入侵紅火蟻在前往黑棘蟻巢的塑膠盆中，巢附近的黑棘蟻無法抵禦入侵紅火蟻接近黑棘蟻巢，使入侵紅火蟻於黑棘蟻巢中死亡，此現象可能與侵略性行為的下降有關，進而使抵禦外敵入侵的能力受到影響。

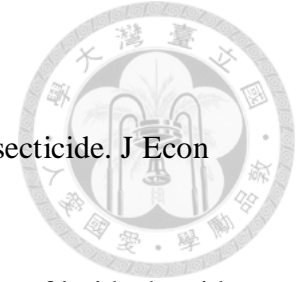
Barbieri *et al.* (2013) 發現不同螞蟻物種的交互作用可能會因為使用亞劑量的新類尼古丁而對本土種螞蟻有負面作用。接觸 1.0 µg/mL 益達胺的 *M. antarcticum* 與阿根廷蟻 (*L. humile*) 進行種間競爭時，接觸藥劑的 *M. antarcticum* 遭遇有接觸藥劑或無接觸藥劑的阿根廷蟻皆展現較低比例的侵略行為，而接觸藥劑的阿根廷蟻與未接觸藥劑的 *M. antarcticum* 交互作用，展現較強侵略性，結果顯示新類尼古丁可能促進入侵種的擴散。兩研究指出益達胺的亞致死效應確實會影響種間競

爭的結果。

行為決定了群落的塑形與生物的立足 (Sih *et al.*, 2012; Cerda *et al.*, 2013)。昆蟲腦的神經若與新類尼古丁藥劑接觸會造成感知及學習新行為能力的損壞 (Palmer *et al.*, 2013)。本研究指出新類尼古丁以不同方式影響螞蟻的行為與適存度。因此，此類神經性殺蟲劑的非目標效應可能潛在地影響其他自然界的生物。未經控制的施用新類尼古丁藥劑會改變侵略行為及種間競爭的結果。然而，種類間不同食物的偏好性及行為將會導致不同程度的殺蟲劑暴露，進而改變種間行為及群落的交互作用。


新類尼古丁藥劑對非目標生物的影響必須被重視，尤其是本土生物所建立的生物抗性。本研究指出接觸新類尼古丁可能會影響黑棘蟻對食物的敏銳度以及造成侵略能力的降低，進而導致黑棘蟻在覓食活動或抵禦外敵的能力受到影響。覓食行為為維持族群成長及發展之重要行為，而競爭行為的則與螞蟻在食物及空間資源的獲取有密切關係。黑棘蟻領域性及巡邏性使其在野外與入侵紅火蟻相遇的機率上升，並可藉其競爭為攻擊型在入侵紅火蟻定殖的初期降低其建立族群的機率。但藥劑的施用可能會使黑棘蟻提供對抗入侵紅火蟻之生物抗性受到影響，造成本土生物的抗性下降。未來的研究可評估環境中殘存的藥劑及其他新類尼古丁藥劑對本土螞蟻物種的影響，減少因為藥劑的施用對於台灣本土生態或環境造成的損失及衝擊。

陸、參考文獻



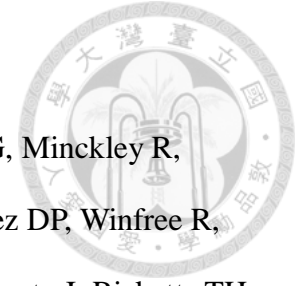
- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18: 265-267.
- Bai DL, Lummis SCR, Leicht W, Breer H, Sattelle DB. 1991. Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor neurone. *Pestic Sci* 33: 197-204.
- Bao H, Liu S, Gu J, Wang X, Liang X, Liu Z. 2009. Sublethal effects of four insecticides on the reproduction and wing formation of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pest Manag Sci* 65: 170-174.
- Barbieri RF, Lester PJ, Miller AS, Ryan KG. 2013. A neurotoxic pesticide changes the outcome of aggressive interactions between native and invasive ants. *P Roy Soc B-biol Sci* 280: 20132157.
- Bicker G. 1999. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microsc Res Techniq* 45: 174-183.
- Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Fleche C, Colin ME, Bengsch ER. 2003. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Anal Chem* 75: 2027-2033.
- Bortolotti L, Montanari R, Marcelino J, Medrzycki P, Maini S, Porrini C. 2003. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bull Insectol* 56: 63-67.
- Cerda X, Arnan X, Retana J. 2013. Is competition a significant hallmark of ant (Hymenoptera: Formicidae) ecology? *Myrmecol News* 18: 131-147.
- Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP. 2004. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: Relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch Environ Con Tox*

- 47: 387-395.
- Curé G, Schmidt H, Schmuck R. 1999. Results of a comprehensive field research programme with the systemic insecticide imidacloprid (Gaucho®). pp 49-59. In: Belzunces L, Pe lissier C, Lewis G (eds). Hazards of Pesticides to Bees. France: INRA.
- Cutler GC, Ramanaidu K, Astatkie T, Isman MB. 2009. Green peach aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), reproduction during exposure to sublethal concentrations of imidacloprid and azadirachtin. *Pest Manag Sci* 65: 205-209.
- Dacher M, Lagarrigue A, Gauthier M. 2005. Antennal tactile learning in the honeybee: Effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. *Neuroscience* 130: 37-50.
- Decourtye A, Devillers J. 2010. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. pp 85-95. In: Thany SH (ed). *Insect nicotinic acetylcholine receptors*. New York: Springer.
- Decourtye A, Lacassie E, Pham-Delegue MH. 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag Sci* 59: 269-278.
- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delegue MH. 2004b. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotox Environ Safe* 57: 410-419.
- Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M, Pham-Delegue MH. 2004a. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic Biochem Phys* 78: 83-92.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech J-M. 2007a. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52: 81-106.
- Devine GJ, Harling ZK, Scarr AW, Devonshire AL. 1996. Lethal and sublethal effects of

- 
- imidacloprid on nicotine-tolerant *Myzus nicotianae* and *Myzus persicae*. Pestic Sci 48: 57-62.
- El Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C. 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). Arch Environ Con Tox 54: 653-661.
- Elbert A, Overbeck H, Iwaya K, Tsuboi S. 1990. Imidacloprid, a novel systemic nitromethylene analogue insecticide for crop protection. Brighton Crop Prot Conf, Pests Dis 2: 21-28.
- Elbert A, Becker B, Hartwig J, Erdelen C. 1991. Imidacloprid - a new systemic insecticide. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 44: 113-146.
- Ellison AM, Record S, Arguello A, Gotelli NJ. 2007. Rapid inventory of the ant assemblage in a temperate hardwood forest: Species composition and assessment of sampling methods. Environ Entomol 36: 766-775.
- Elton CS. 2013. The ecology of invasions by animals and plants, London: The University of Chicago Press. 181pp.
- Faucon JP, Aurieres C, Drajnudel P, Mathieu L, Ribiere M, Martel AC, Zeggane S, Chauzat MP, Aubert MFA. 2005. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Pest Manag Sci 61: 111-125.
- Galvanho JP, Carrera MP, Moreira DDO, Erthal M, Silva CP, Samuels RI. 2013. Imidacloprid inhibits behavioral defences of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). J Insect Behav 26: 1-13.
- Gerlach J, Samways M, Pryke J. 2013. Terrestrial invertebrates as bioindicators: an overview of available taxonomic groups. J Insect Conserv 17: 831-850.
- He YX, Zhao JW, Wu DD, Wyckhuys KAG, Wu KM. 2011. Sublethal effects of




- imidacloprid on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) under laboratory conditions. *J Econ Entomol* 104: 833-838.
- James DG. 1997. Imidacloprid increases egg production in *Amblyseius victoriensis* (Acari: Phytoseiidae). *Exp Appl Acarol* 21: 75-82.
- James DG, Price TS. 2002. Fecundity in two spotted spider mite (Acari : Tetranychidae) is increased by direct and systemic exposure to imidacloprid. *J Econ Entomol* 95: 729-732.
- Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A. 2010. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J Agr Food Chem* 59: 2897-2908.
- Jong JJ. 2008. Models of division of labor and expression of biological clock in the colony of gray-black spiny ant, *Polyrhachis dives* Smith (Hymenoptera: Formicidae). Taipei, Taiwan: National Taiwan University. 110 pp.
- Kagabu S. 1997. Chloronicotiny insecticides: discovery, application and future perspective. *Rev Toxicol* 1: 75-129.
- Kagabu S, Medej S. 1995. Stability comparison of imidacloprid and related compounds under simulated sunlight, hydrolysis conditions, and to oxygen. *Biosci Biotech Bioch* 59: 980-985.
- Kagabu S, Akagi T. 1997. Quantum chemical consideration of photostability of imidacloprid and related compounds. *J Pestic Sci* 22: 84-89.
- Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H. 2012. Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS One* 7(2): e32432. doi:10.1371/journal.pone.0032432.
- Klein A-M, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world

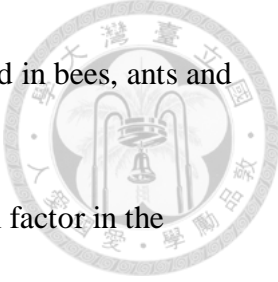



- crops. P Roy Soc B-biol Sci 274: 303-313.
- Kremen C, Williams NM, Aizen MA, Gemmill-Herren B, LeBuhn G, Minckley R, Packer L, Potts SG, Roulston Ta, Steffan-Dewenter I, Vazquez DP, Winfree R, Adams L, Crone EE, Greenleaf SS, Keitt TH, Klein A-M, Regetz J, Ricketts TH. 2007. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecol Lett* 10: 299-314.
- Kunkel BA, Held DW, Potter DA. 2001. Lethal and sublethal effects of bendiocarb, halofenozide, and imidacloprid on *Harpalus pennsylvanicus* (Coleoptera: carabidae) following different modes of exposure in turfgrass. *J Econ Entomol* 94: 60-67.
- Lester PJ, Baring CW, Longson CG, Hartley S. 2003. Argentine and other ants (Hymenoptera: Formicidae) in New Zealand horticultural ecosystems: distribution, hemipteran hosts, and review. *New Zeal Entomol* 26: 79-89.
- Li GP, Feng HQ, Liang SS, Qiu F. 2008. Sublethal effects of four insecticides on the development and reproduction of *Adelphocoris suturalis* Jakovlev (Hemiptera: Miridae). *Acta Entomol Sinica* 51: 1260-1264.
- Liefke C, Holldobler B, Maschwitz U. 2001. Recruitment behavior in the ant genus *Polyrhachis* (Hymenoptera, Formicidae). *J Insect Behav* 14: 637-657.
- Liefke C, Dorow WHO, Holldobler B, Maschwitz U. 1998. Nesting and food resources of syntopic species of the ant genus *Polyrhachis* (Hymenoptera, Formicidae) in West-Malaysia. *Insect Soc* 45: 411-425.
- Liu MY, Casida JE. 1993. High Affinity binding of [H-3]imidacloprid in the insect acetylcholine receptor. *Pestic Biochem Phys* 46: 40-46.
- Lozano VC, Armengaud C, Gauthier M. 2001. Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. *J*



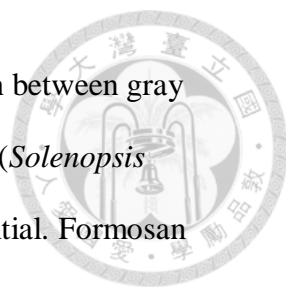
- Comp Physiol A 187: 249-254.
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. Trends Pharmacol Sci 22: 573-580.
- Medrzycki P, Montanari R, Bortolotti L, Sabatini AG, Maini S, Porrini C. 2003. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. Bull Insectology 56: 59-62.
- Mercier JL, Lenoir A. 1999. Individual flexibility and choice of foraging strategy in *Polyrhachis laboriosa* F. Smith (Hymenoptera, Formicidae). Insect Soc 46: 267-272.
- Moriya K, Shibuya K, Hattori Y, Tsuboi S-i, Shiokawa K, Kagabu S. 1992. 1-(6-Chloronicotiny)-2-nitroimino-imidazolidines and related compounds as potential new insecticides. Biosci Biotech Bioch 56: 364-365.
- Mullins JW. 1993. Imidacloprid - a new nitroguanidine insecticide. Acs Sym Ser 524: 183-198.
- Nauen R. 1995. Behaviour modifying effects of low systemic concentrations of imidacloprid on *Myzus persicae* with special reference to an antifeeding response. Pestic Sci 44: 145-153.
- Nauen R, Elbert A. 1997. Apparent tolerance of a field-collected strain of *Myzus nicotianae* to imidacloprid due to strong antifeeding responses. Pestic Sci 49: 252-258.
- Nauen R, Koob B, Elbert A. 1998. Antifeedant effects of sublethal dosages of imidacloprid on *Bemisia tabaci*. Entomol Exp Appl 88: 287-293.
- Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Elbert A, Jeschke P, Tietjen K. 2001. Acetylcholine receptors as sites for developing neonicotinoid insecticides. pp 77-105. In:

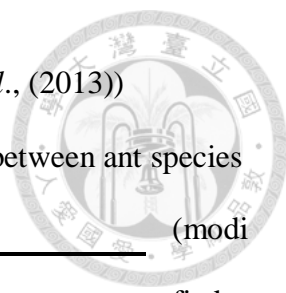
- 
- Ishaaya I, (ed). Biochemical sites of insecticide action and resistance. Berlin: Springer-Verlad.
- Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Iwasaki M, Yokohari F, Satoji Y, Nisimura T, Yamaoka R. 2005. Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science* 309: 311-314.
- Palmer MJ, Moffat C, Saranzewa N, Harvey J, Wright GA, Connolly CN. 2013. Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nat Commun* 4: 1634.
- Pareja L, Colazzo M, Perez-Parada A, Niell S, Carrasco-Letelier L, Besil N, Veronica Cesio M, Heinzen H. 2011. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *Int J Environ Res Pu* 8: 3844-3858.
- Rabhi KK, Esancy K, Voisin A, Crespin L, Le Corre J, Tricoire-Leignel H, Anton S, Gadenne C. 2014. Unexpected effects of low doses of a neonicotinoid insecticide on behavioral responses to sex pheromone in a pest insect. *PLoS One* 9: e114411. doi:10.1371/journal.pone.0114411
- Ramirez-Romero R, Chaufaux J, Pham-Delegue MH. 2005. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* 36: 601-611.
- Rao A, Vinson SB. 2009. The Initial behavioral sequences and strategies of various ant species during individual interactions with *Solenopsis invicta*. *Ann Entomol Soc Am* 102: 702-712.
- Riley JR, Greggers U, Smith AD, Reynolds DR, Menzel R. 2005. The flight paths of honeybees recruited by the waggle dance. *Nature* 435: 205-207.
- Rondeau G, Sanchez-Bayo F, Tennekes HA, Decourtye A, Ramirez-Romero R, Desneux

- 
- N. 2014. Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Sci Rep* 4: 8.
- Rust MK, Reiersen DA, Klotz JH. 2004. Delayed toxicity as a critical factor in the efficacy of aqueous baits for controlling argentine ants (Hymenoptera : Formicidae). *J Econ Entomol* 97: 1017-1024.
- Sagata K, Lester PJ. 2009. Behavioural plasticity associated with propagule size, resources, and the invasion success of the Argentine ant *Linepithema humile*. *J Appl Ecol* 46: 19-27.
- Sattelle DB, Buckingham SD, Wafford KA, Sherby SM, Bakry NM, Eldefrawi AT, Eldefrawi ME, May TE. 1989. Actions of the insecticide 2(nitromethylene)-tetrahydro-1,3-thiazine on insect and vertebrate nicotinic acetylcholine Receptors. *P Roy Soc B-biol Sci* 237: 501-514.
- Schmuck R. 1999. No causal relationship between Gaucho® seed dressing in sunflowers and French bee syndrome. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 52: 257-299.
- Schmuck R, Schoning R, Stork A, Schramel O. 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L. Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag Sci* 57: 225-238.
- Schneider CW, Tautz J, Gruenewald B, Fuchs S. 2012. RFID Tracking of Sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS One* 7: e30023. doi:10.1371/journal.pone.0030023.
- Schroeder ME, Flattum RF, Sanborn JR. 1984. The mode of action and neurotoxic properties of the nitromethylene heterocycle insecticides. *Pestic Biochem Phys* 22(2): 148-160.
- Sih A, Cote J, Evans M, Fogarty S, Pruitt J. 2012. Ecological implications of

- 
- behavioural syndromes. *Ecol Lett* 15: 278-289.
- Stokstad E. 2007. The case of the empty hives. *Science* 316: 970-972.
- Thany SH, Gauthier M. 2005. Nicotine injected into the antennal lobes induces a rapid modulation of sucrose threshold and improves short-term memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Brain Res* 1039: 216-219.
- Thompson HM. 2003. Behavioural effects of pesticides in bees - Their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology* 12: 317-330.
- Thorne BL, Breisch NL. 2001. Effects of sublethal exposure to imidacloprid on subsequent behavior of subterranean termite *Reticulitermes virginicus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J Econ Entomol* 94: 492-498.
- Tome HVV, Martins GF, Lima MAP, Campos LAO, Guedes RNC. 2012. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS One* 7(6): e38406. doi:10.1371/journal.pone.0038406.
- Tomizawa M, Yamamoto I. 1992. Binding of nicotinoids and the related compounds to the insect nicotinic acetylcholine receptor. *J Pestic Sci* 17: 231-236.
- Tomizawa M, Yamamoto I. 1993. Structure-activity relationships of nicotinoids and imidacloprid analogs. *J Pestic Sci* 18: 91-98.
- Tomizawa M, Casida JE. 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol* 48: 339-364.
- Tomizawa M, Casida JE. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol* 45: 247-268.
- Tomizawa M, Lee DL, Casida JE. 2000. Neonicotinoid insecticides: Molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. *J Agr*

- 
- Food Chem 48: 6016-6024.
- Tsai YH, Yang CC, Lin CC, Shih CJ. 2009. The impact of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, and bait treatment on the diversity of native ants—a case study at National Taipei University, Sanshia Campus. *Formosan Entomol* 29: 263-277.
- Ugine TA, Gardescu S, Hajek AE. 2011. The effect of exposure to imidacloprid on asian longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae) survival and reproduction. *J Econ Entomol* 104: 1942-1949.
- Wang AH, Wu JC, Yu YS, Liu JL, Yue JF, Wang MY. 2005. Selective insecticide-induced stimulation on fecundity and biochemical changes in *Tryporyza incertulas* (Lepidoptera : Pyralidae). *J Econ Entomol* 98: 1144-1149.
- Wang L, Zeng L, Chen J. 2015b. Impact of imidacloprid on new queens of imported fire ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Sci Rep* 5.
- Wang L, Zeng L, Chen J. 2015a. Sublethal effect of imidacloprid on *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) feeding, digging, and foraging behavior. *Environ Entomol* 44: 1544-1552.
- Widiarta IN, Matsumura M, Suzuki Y, Nakasuji F. 2001. Effects of sublethal doses of imidacloprid on the fecundity of green leafhoppers, *Nephotettix* spp. (Hemiptera : Cicadellidae) and their natural enemies. *Appl Entomol Zool* 36: 501-507.
- Wolf M, Weissing FJ. 2012. Animal personalities: consequences for ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 27: 452-461.
- Woyciechowski M, Moron D. 2009. Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*). *Insect Soc* 56: 193-201.
- Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS. 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS One* 6(2): e14720. doi:10.1371/journal.pone.0014720.

- 
- Wu YH, Hsu HW, Shih CJ, Yang CC. 2013. Interspecific competition between gray black spiny ant (*Polyrhachis dives*) and red imported fire ant (*Solenopsis invicta*): evaluation of ant species with biotic resistance potential. *Formosan Entomol* 33: 107-120.
- Yamamoto I. 1965. Nicotinoids as insecticide. pp 231-260. In: Metcalf RL, (ed). *Advances in pest control research*. Vol 6. New York: Wiley.
- Yamamoto I, Yabuta G, Tomizawa M, Saito T, Miyamoto T, Kagabu S. 1995. Molecular mechanism for selective toxicity of nicotinoids and neonicotinoids. *J Pestic Sci* 20: 33-40.
- Yang CC, Shoemaker DD, Wu JC, Lin YK, Lin CC, Wu WJ, Shih CJ. 2009. Successful establishment of the invasive fire ant *Solenopsis invicta* in Taiwan: insights into interactions of alternate social forms. *Divers and Distrib* 15: 709-719.
- Yang EC, Chang HC, Wu WY, Chen YW. 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS One* 7(11): e49472. doi:10.1371/journal.pone.0049472.
- Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang LH. 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 101: 1743-1748.



表一、物種間互動三種行為階段大致分類與定義 (改自 Wu *et al.*, (2013))

Table 1. The classification and definition of three behavioral phases between ant species

	(modified from Wu <i>et al.</i> , 2013)
<p>攻擊模式 (Aggressive)</p> <p>a) 以張開大顎的威脅方式接近敵人，而沒有必要的攻勢。</p> <p>b) 撲上並抓取。螞蟻打開大顎迅速躍起，威脅敵人並試圖抓住牠。</p> <p>c) 抓取並咬。螞蟻前進並以大顎夾咬敵人頭部、腰節或附肢，並將之咬下造成傷害。</p> <p>d) 舉尾* (黑棘蟻)。螞蟻伸直前腿，抬高頭部、胸部，面相敵人彎曲腹部，釋放蟻酸噴灑敵人。</p>	<p>fied</p> <p>from</p> <p>Wu <i>et al.</i>, 2013)</p>
<p>防禦模式 (Defensive)</p> <p>a) 逃脫。遭遇後迅速離開。</p> <p>b) 靜止。在遭遇或被攻擊之後、下次動作前變得靜止不動三十秒到一分鐘。</p> <p>c) 裝死。被敵圍攻或濺毒會裝死不回應敵人攻勢，保持一分鐘以上直到被放棄攻擊。</p> <p>d) 舉尾(化學防禦)。螞蟻伸直前腿，抬高頭部、胸部，向敵人彎曲腹部，同時搖晃錘節釋放毒液威嚇敵人。</p>	
<p>擾動階段 (Disturbed)</p> <p>a) 坐立不安。在敵人濺毒之後不安的浮躁移動。</p> <p>b) 癱瘓。螞蟻移動時拖動因毒液麻痺的肢體。</p> <p>c) 過度清理。螞蟻在被濺毒之後不斷的清理足和觸角。</p>	



表二、以不同濃度益達胺處理黑棘蟻小型蟻巢之死亡率

Table 2. Mortality of the small colony fragment of *P. dives* treated with imidacloprid of different concentrations

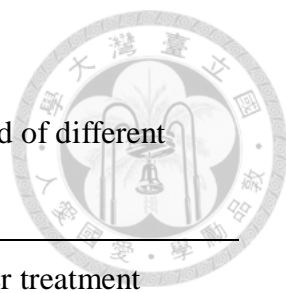
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mortality (%) of small-colony fragment at time after treatment		
	24 hr	48 hr	72 hr
10	99.80 \pm 0.41 aA	99.23 \pm 0.90 aA	97.49 \pm 2.90 aA
8	90.53 \pm 6.81 abA	88.68 \pm 7.00 abA	82.37 \pm 6.00 aA
5	93.66 \pm 9.55 aA	93.3 \pm 8.56 aA	81.51 \pm 17.17 aA
4	86.90 \pm 13.78 abA	74.89 \pm 22.1 bcA	61.6 \pm 29.09 bA
2	73.05 \pm 30.51 bA	60.81 \pm 27.82 cAB	34.5 \pm 22.40 cB
1	29.53 \pm 17.67 cA	22.06 \pm 13.44 dA	18.97 \pm 19.27 cdA
0.6	5.55 \pm 4.21 dA	7.9 \pm 6.88 eA	5.27 \pm 3.80 deA
0.5	0.24 \pm 0.48 dA	1.05 \pm 1.23 eA	0.00 \pm 0.00 eA
0.5% DMSO	0.24 \pm 0.41 dA	0.36 \pm 0.66 eA	0.36 \pm 0.66 eA
10% sugar water	0.00 \pm 0.00 dA	0.22 \pm 0.44 eA	0.22 \pm 0.44 eA

The concentrations of imidacloprid were 10, 8, 5, 4, 2, 1, 0.6 and 0.5 $\mu\text{g/mL}$; 0.5% DMSO and 10% sugar water were as control groups.

Mean \pm standard error (N=4, n=100); Means within a column and a row followed by the same letter with lower and upper case, respectively, are not significantly different by Fisher's protected LSD test at 5% level.

表三、以不同濃度益達胺處理黑棘蟻外勤蟻之死亡率

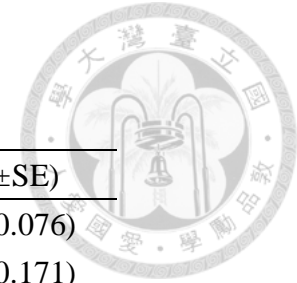
Table 3. Mortality of the foragers of *P. dives* treated with imidacloprid of different concentrations



Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mortality (%) of forager at time after treatment		
	24 hr	48 hr	72 hr
4	77.05 \pm 7.80 aA	78.20 \pm 5.42 aA	79.92 \pm 11.57 aA
2.67	73.27 \pm 11.69 abA	65.83 \pm 14.60 abA	59.65 \pm 10.77 abA
1.77	61.29 \pm 11.87 bA	52.95 \pm 19.12 bA	47.71 \pm 12.55 bA
1.18	33.45 \pm 16.94 cA	25.22 \pm 7.73 cA	30.23 \pm 10.75 cA
0.79	9.32 \pm 11.23 dA	11.18 \pm 10.15 cA	18.15 \pm 7.37 cA
0.5% DMSO	0 \pm 0 dA	0 \pm 0 cA	0 \pm 0 dA
10% sugar water	0 \pm 0 dA	0 \pm 0 cA	0 \pm 0 dA

The concentrations of imidacloprid were 4, 2.67, 1.77, 1.18 and 0.79 $\mu\text{g/mL}$; 0.5% DMSO and 10% sugar water as control groups.

Mean \pm standard error (N=4, n=50); Means within a column and a row followed by the same letter with lower and upper case, respectively, are not significantly different by Fisher's protected LSD test at 5% level.



表四、益達胺處理黑棘蟻於 72 小時之 LC₁、LC₁₅ 及 LC₅₀

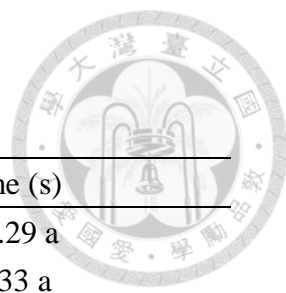
Table 4. The LC₁, LC₁₅ and LC₅₀ of imidacloprid to *P. dives* (in 72hr post-treatment)

Concentration (μg/mL)	LC ₁ (95% CI)	LC ₁₅ (95% CI)	LC ₅₀ (95% CI)	χ^2	Slope (±SE)
Small-colony fragment	0.42 (0.24-0.62)	1.20 (0.90-1.56)	2.92 (2.4-3.48)	55.496	2.774 (±0.076)
Forager	0.17 (0.051-0.31)	0.63 (0.36-0.86)	1.83 (1.52-2.22)	5.6754	2.247 (±0.171)

LC₁、LC₁₅ 及 LC₅₀ were expressed as the concentrations of imidacloprid. Data in brackets were lower and upper concentrations at 95% confidence limits.

表五、第一隻黑棘蟻抵達食物區的時間

Table 5. The time of first forager of *P. dives* entering the food area



Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Foraging time (s)
10% sugar water	118.33 \pm 64.29 a
0.5% DMSO	165.5 \pm 77.33 a
LC ₁	248.86 \pm 112.64 a
LC ₁₅	444.29 \pm 785.78 a
LC ₅₀	603.83 \pm 463.57 a

0.5% DMSO and 10% sugar water were control group. LC₁, LC₁₅ and LC₅₀ were treatment groups.

Mean \pm standard error (N=6). Means within each row followed by the small letter(s) are not significantly different at 5% level by one-way ANOVA test.

表六、不同藥劑處理下，黑棘蟻個體與小型入侵紅火蟻相遇後第一次展現行為模式之比例 (%)



Table 6. The average ratio (%) of behavioral phases when workers of *P. dives* and *S. invicta* encounter at first time under the individual competition experiment after exposed to different concentration of imidacloprid

Concentration	<i>P. dives</i> vs. minor <i>S. invicta</i>			
	Behavior phases of <i>P. dives</i>		Behavior phases of <i>S. invicta</i>	
	Aggressive	Non-aggressive	Aggressive	Non-aggressive
10% sugar water	79.82±26.36 a	20.17±25.83 a	16.59±5.44 a	83.41±5.44 a
0.5% DMSO	86.11±3.47 a	13.89±3.47 a	27.78±17.02 a	72.22±17.02 a
LC1	88.16±2.75 a	11.84±2.75 a	23.68±10.26 a	76.31±10.26 a
LC15	20±17.32 b	80±17.32 b	30±5 a	70±5 a
LC50	14.05±6.48 b	85.95±6.48 b	47.14±23.29 a	52.86±23.29 a

0.5% DMSO and 10% sugar water were control group. LC1, LC15 and LC50 were treatment groups.

Mean ± standard error (N=3, n=30). Means within each row followed by the different letter(s) are significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test and within each row followed by the small letter(s) are not significantly different at 5% level by one-way ANOVA test.

表七、不同藥劑處理下，黑棘蟻個體與大型入侵紅火蟻相遇後第一次展現行為模式之比例 (%)

Table 7. The average ratio (%) of behavioral phases when two workers of *P. dives* and *S. invicta* encounter at first time under the individual competition experiment after exposed to different concentrations of imidacloprid

Concentration	<i>P. dives</i> vs. major <i>S. invicta</i>			
	Behavior phases of <i>P. dives</i>		Behavior phases of <i>S. invicta</i>	
	Aggressive	Non-aggressive	Aggressive	Non-aggressive
10% sugar water	66.27±6.45 a	33.73±6.45 a	60.20±9.00 a	39.80±9.00 a
0.5% DMSO	69.07±3.70 a	30.93±3.70 a	58.15±12.88 a	41.85±12.88 a
LC1	79.30±15.80 a	20.70±15.80 a	57.31±8.10 a	42.69±8.10 a
LC15	33.33±16.67 b	66.67±16.67 b	50±11.11 a	50±11.11 a
LC50	0±0 b	100±0 b	72.32±2.91 a	27.68±2.91 a

0.5% DMSO and 10% sugar water were control group. LC1, LC15 and LC50 were treatment groups.

Mean ± standard error (N=3, n=30). Means within each row followed by the different letter(s) are significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test and within each row followed by the small letter(s) are not significantly different at 5% level by one-way ANOVA test.

表八、個體競爭下火蟻及黑棘蟻死亡率



Table 8. Mortality of *P. dives* and *S. invicta* minor/major during individual interspecific competition

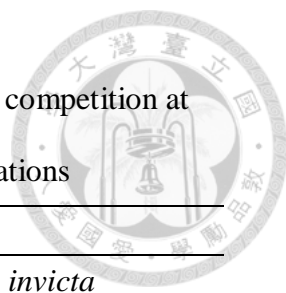
Concentration	<i>P. dives</i> vs. major <i>S. invicta</i>			
	<i>P. dives</i> vs. minor <i>S. invicta</i>		<i>P. dives</i> vs. major <i>S. invicta</i>	
	<i>P. dives</i>	<i>S. invicta</i>	<i>P. dives</i>	<i>S. invicta</i>
10% sugar water	0±0 a	91.95±7.14 a	25.20±9.34 a	61.72±25.28 a
0.5% DMSO	0±0 a	72.78±12.51 ab	8.70±3.26 bc	52.04±8.25 ab
LC1	1.75±3.04 a	66.40±19.85 b	18.13±3.26 ab	78.48±13.13 a
LC15	3.33±2.89 a	25±13.22 c	5.56±13.17 bc	37.04±25.05 b
LC50	0±0 a	0±0 d	0±0 c	0±0 c

0.5% DMSO and 10% sugar water were control group. LC1, LC15 and LC50 were treatment groups.

Mean ± standard error (N = 3, n = 90). Means within each row followed by the different letter(s) are significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test and within each row followed by the small letter(s) are not significantly different at 5% level by one-way ANOVA test.

表九、群體試驗後的黑棘蟻與紅火蟻的死亡率

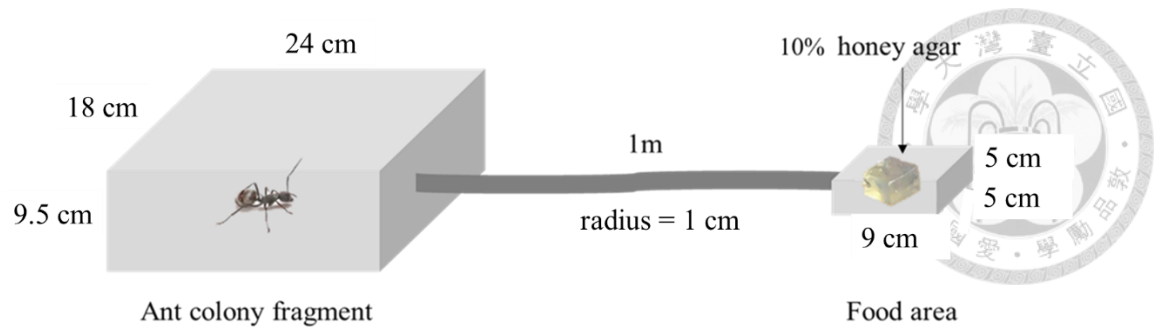
Figure 20. The mortality of *P. dives* and *S. invicta* after interspecific competition at small colony fragment level with imidacloprid of different concentrations



Concentration	Mortality (%)	
	<i>P. dives</i>	<i>S. invicta</i>
10% sugar water	2.5±2.17a	82.54±14.55a
0.5% DMSO	0.83±0.72a	88.89±7.27a
LC ₁	6.67±1.44a	98.41±2.75a
LC ₁₅	3.33±1.91a	34.92±11.00b
LC ₅₀	3.75±2.17a	49.21±23.97b

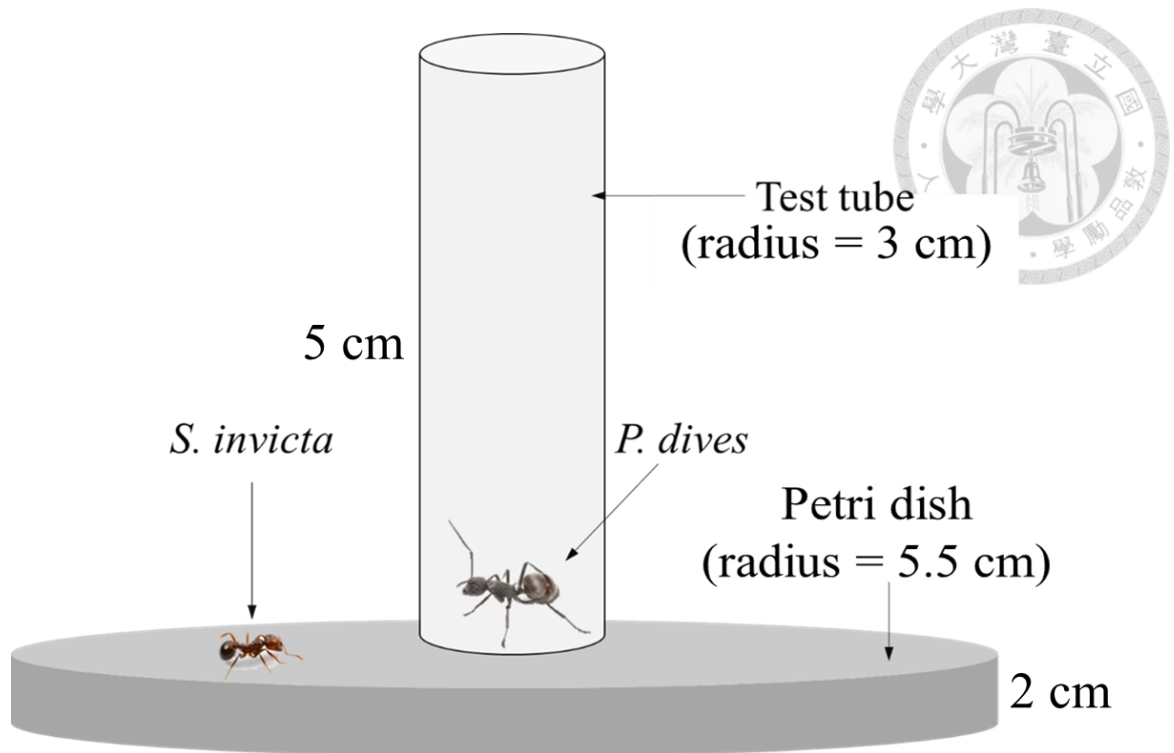
0.5% DMSO and 10% sugar water were control group. LC₁, LC₁₅ and LC₅₀ were treatment groups.

Mean ± standard error (N = 3). Means within each row followed by the different letter(s) are significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test and within each row followed by the small letter(s) are not significantly different at 5% level by one-way ANOVA test.



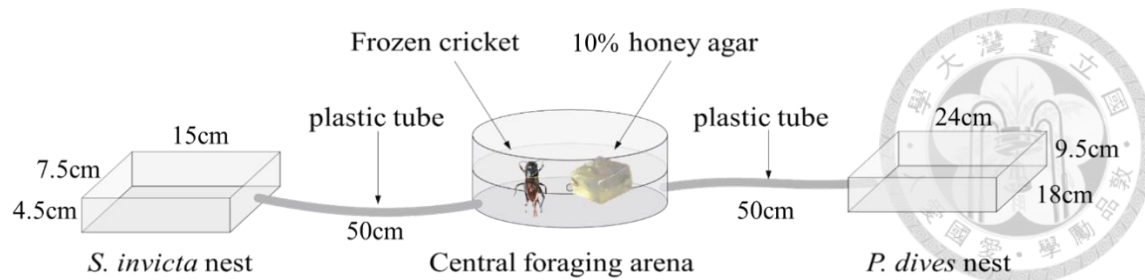
圖一、黑棘蟻覓食活動場所。活動場所由兩個塑膠容器組成，小型蟻巢及覓食區，中間以一公尺長的管子連接。

Figure 1. The area of foraging activity of *P. dives*. The area consists of ant colony fragment of *P. dives* and food area connected with 1 m tube.



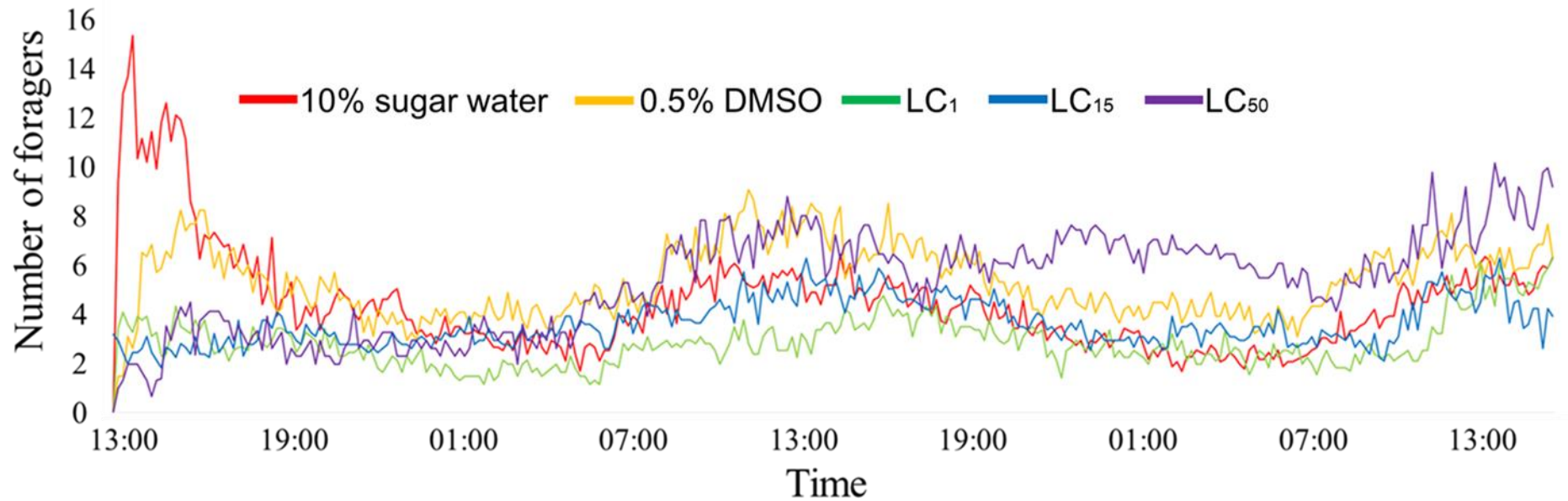
圖二、黑棘蟻與入侵紅火蟻個體競爭場示意圖。競爭場為半徑五公分的培養皿。試管為隔離黑棘蟻與入侵紅火蟻之用。

Figure 2. The design of the interspecific competition area at individual level. The area is the petri dish (radius = 5.5 cm). The use of test tube (radius = 3 cm) is for isolating the *P. dives* from *S. invicta* before recording.



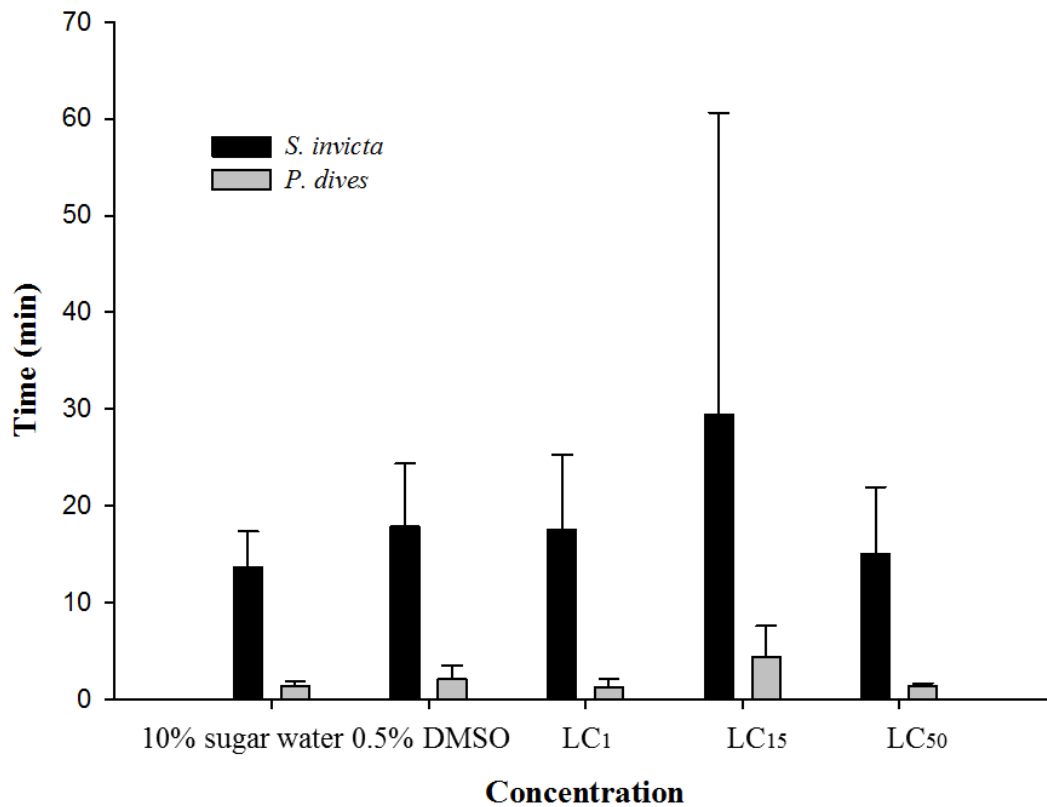
圖三、黑棘蟻與入侵紅火蟻群體競爭場示意圖。競爭場由三個塑膠容器組成，分別為入侵紅火蟻、黑棘蟻小型蟻巢，以及置有冷凍蟋蟀及蜂蜜布丁之中央覓食區。

Figure 3. The design of interspecific competition area at group level. The area consists of ant colony fragment of *P. dives* and *S. invicta*, respectively. Frozen crickets and honey agar were placed in the central foraging arena as food sources.



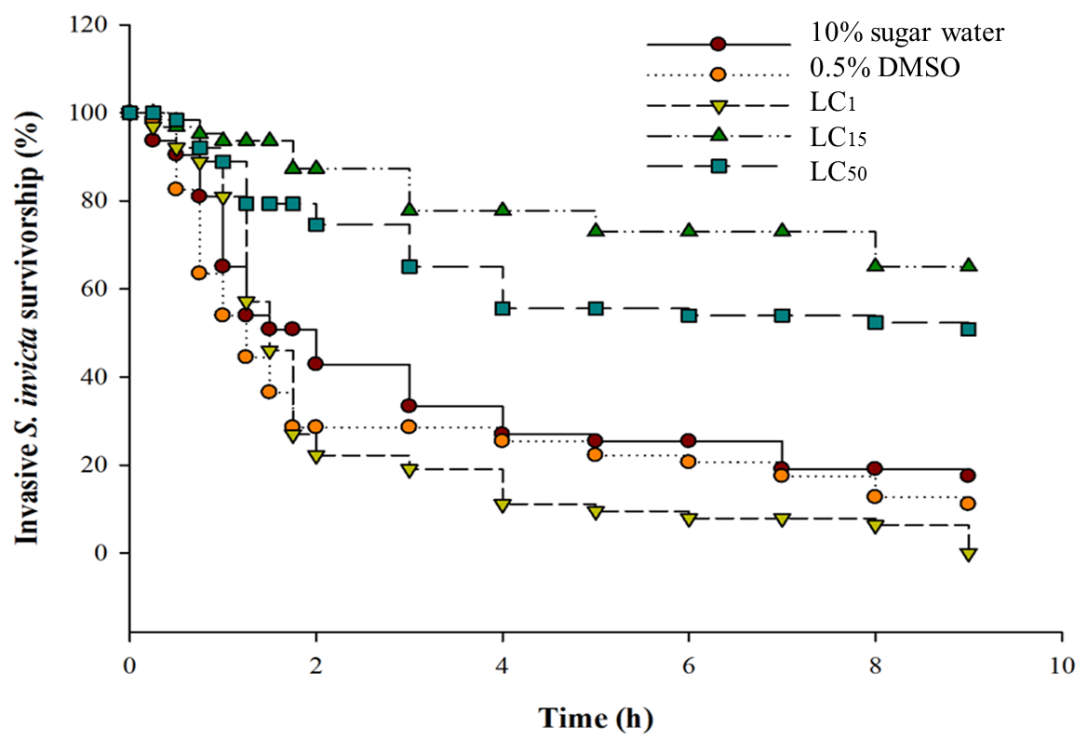
圖四、黑棘蟻於四十八小時的覓食活動。藍線及紅線分別為對照組 10% 糖水與 0.5% DMSO。綠線、紫線及淺藍線分別為益達胺濃度為 LC₁、LC₁₅ 及 LC₅₀ 的處理組 (N = 6)。

Figure 4. The foraging activity of *P. dives* in 48 hours. Blue and red line were control groups (10% sugar water and 0.5% DMSO). Green, purple and light blue lines were the treatment group with LC₁, LC₁₅ and LC₅₀ concentrations, respectively (N = 6).



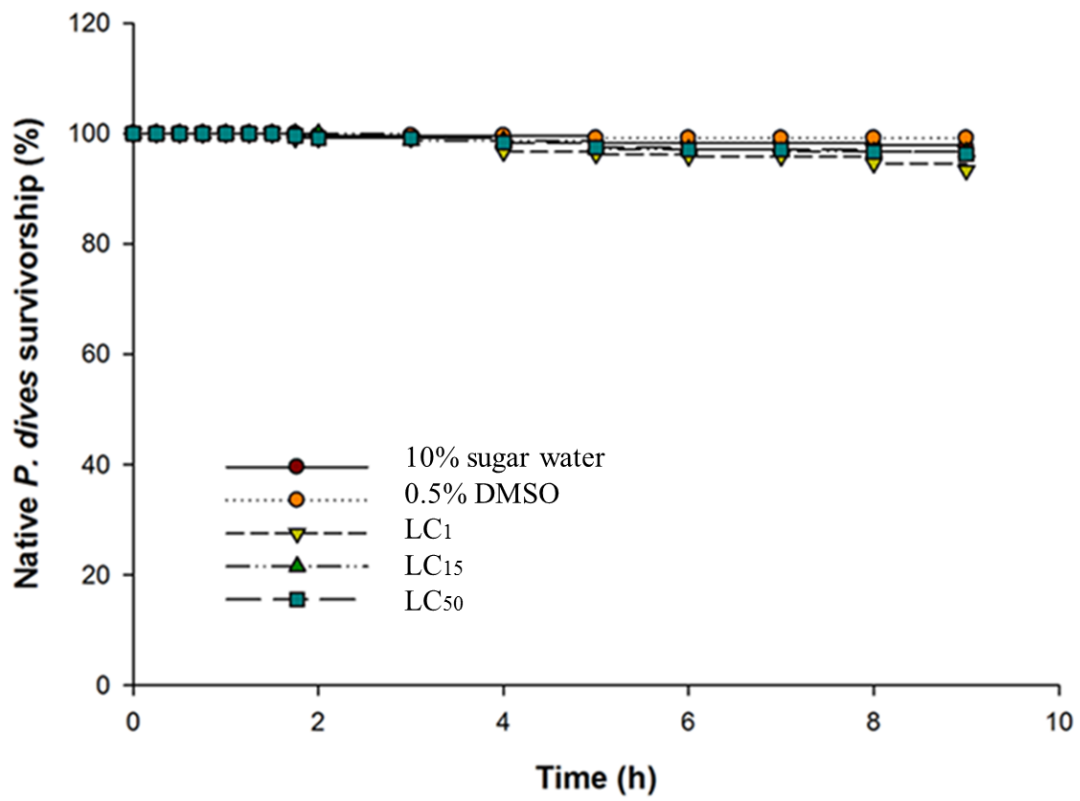
圖五、黑棘蟻接觸不同濃度處理之益達胺時，黑棘蟻與紅火蟻進入中央食物區的時間。

Fig. 5. The time of *P. dives* and *S. invicta* entering the central food arena when *P. dives* treated with different concentrations of imidacloprid.



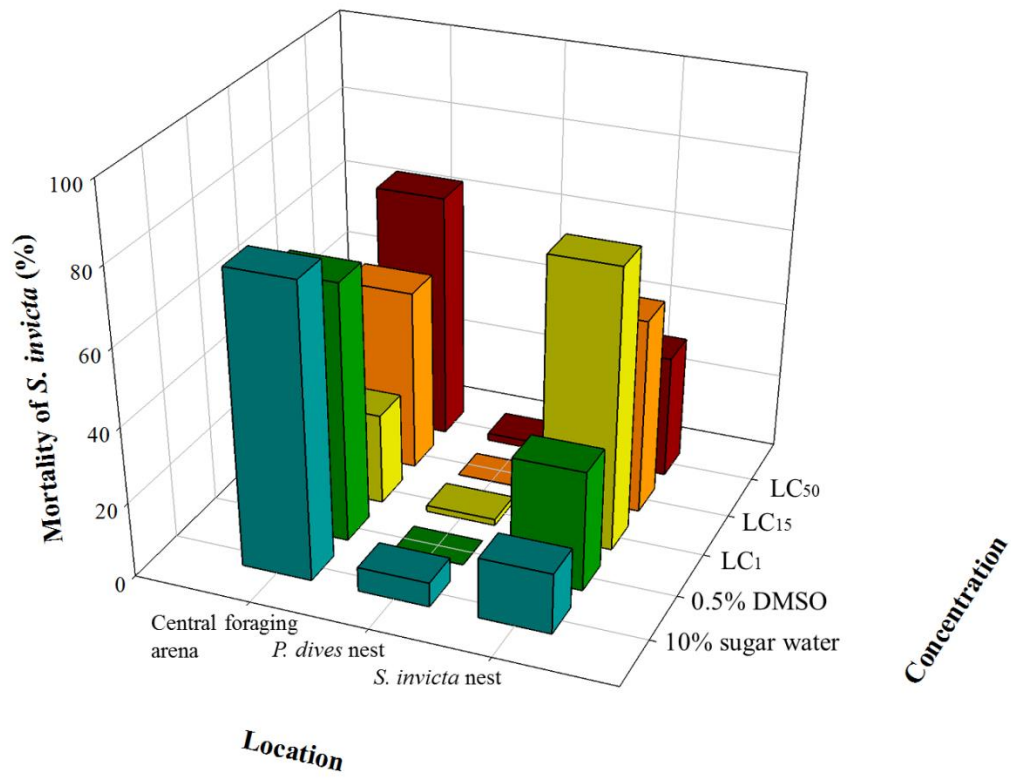
圖六、入侵紅火蟻累積存活率。

Figure 6. The accumulated survivorship of *S. invicta*.



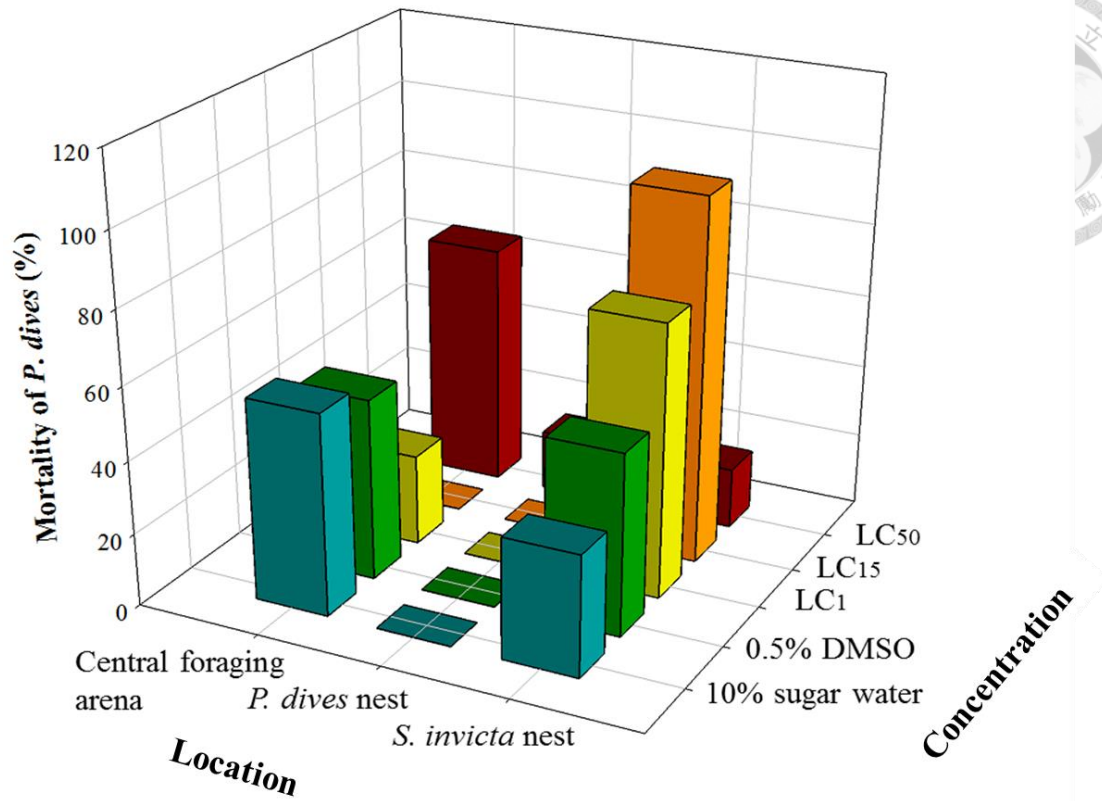
圖七、黑棘蟻累積存活率。

Figure 7. The accumulated survivorship of *P. dives*.



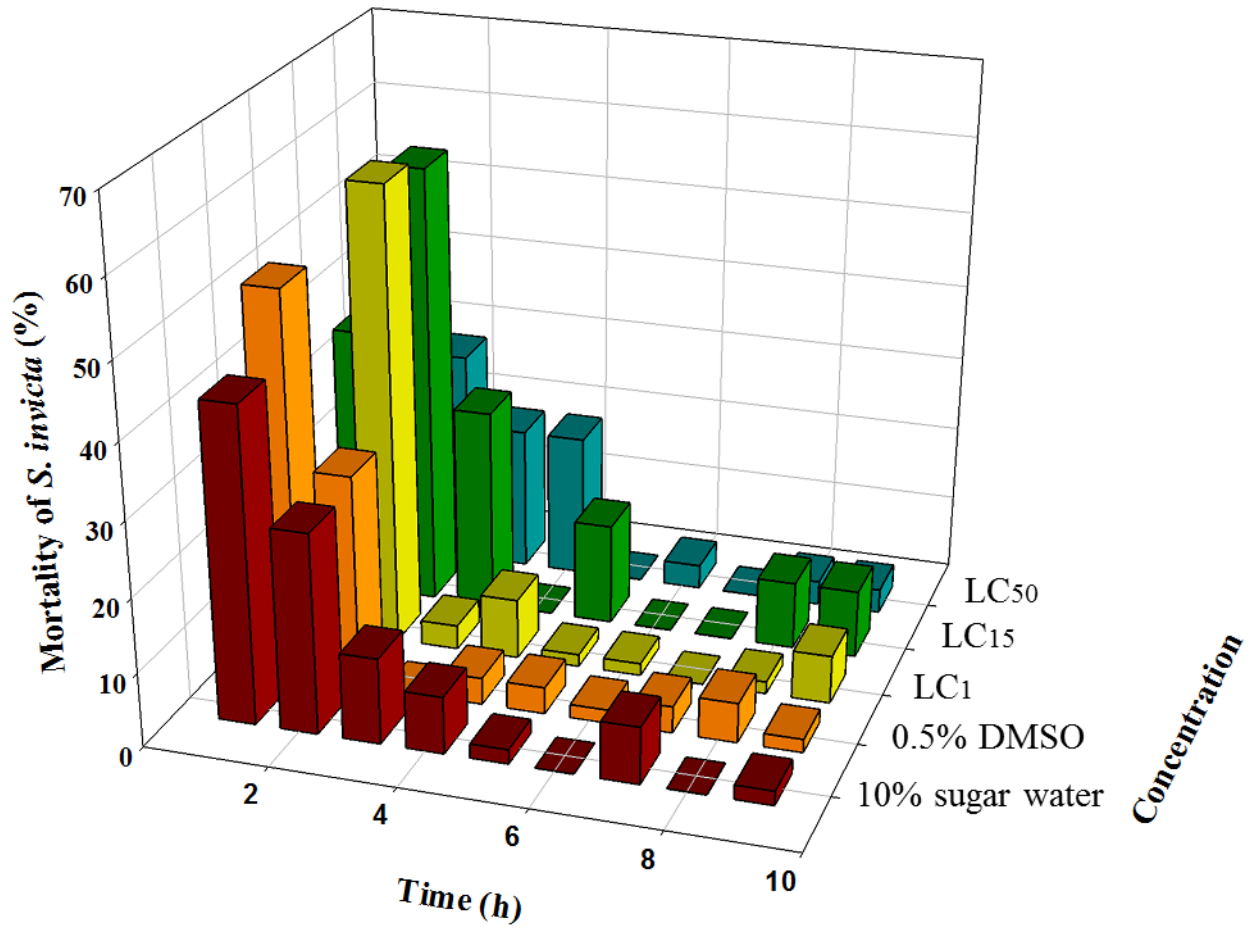
圖八、入侵紅火蟻於種間競爭時之死亡地點。

Figure 8. The location of dead *S. invicta* during interspecific competition.



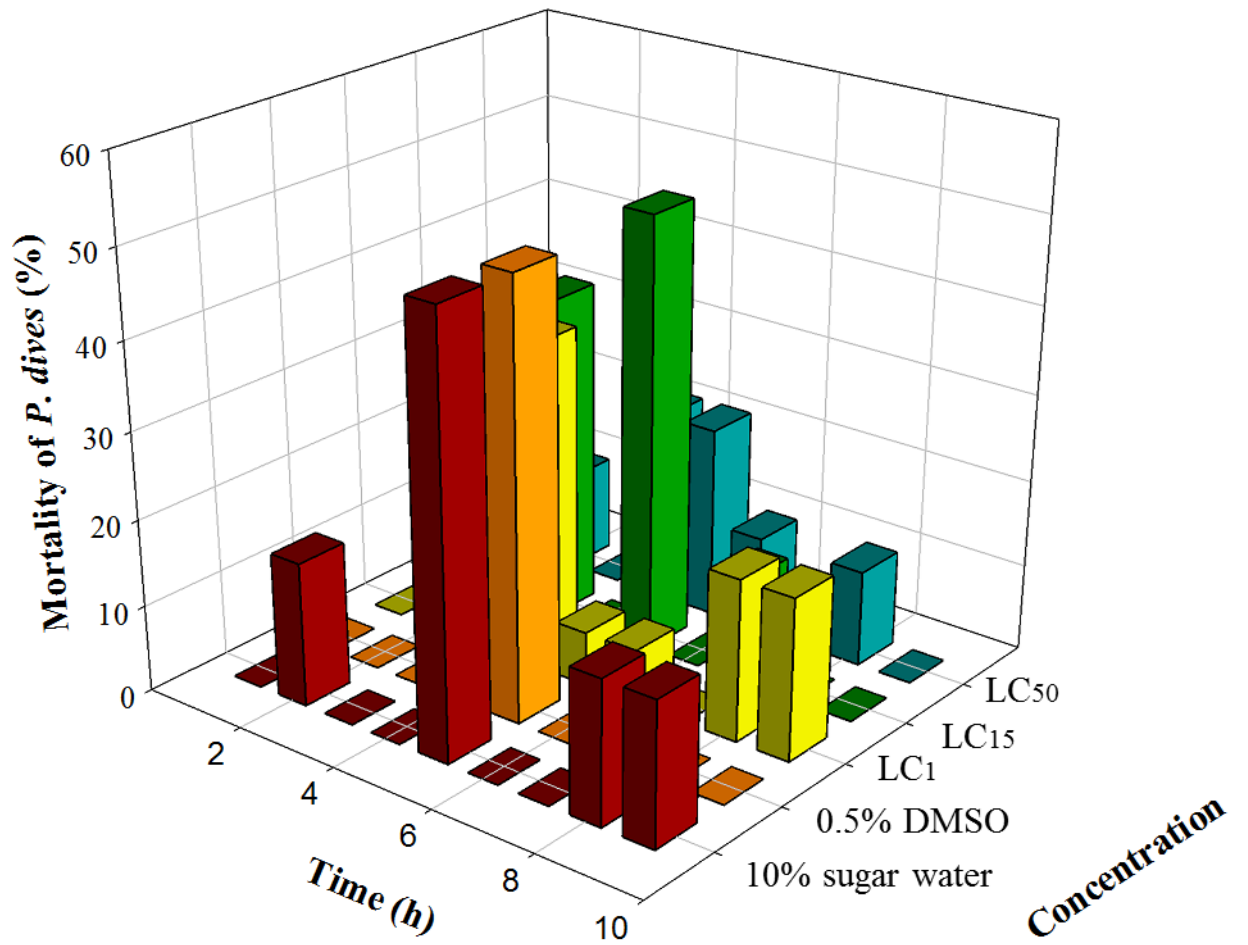
圖九、黑棘蟻於種間競爭時之死亡地點。

Figure 9. The location of dead *P. dives* during interspecific competition.



圖十、入侵紅火火蟻死亡時間。

Figure 10. The mortality time distribution of *S. invicta*.



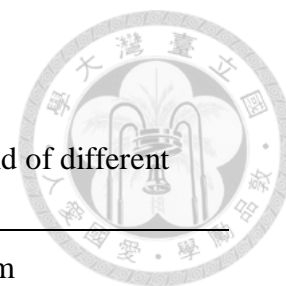
圖十一、黑棘蟻死亡時間。

Figure 11. The mortality time distribution of *P. dives*.

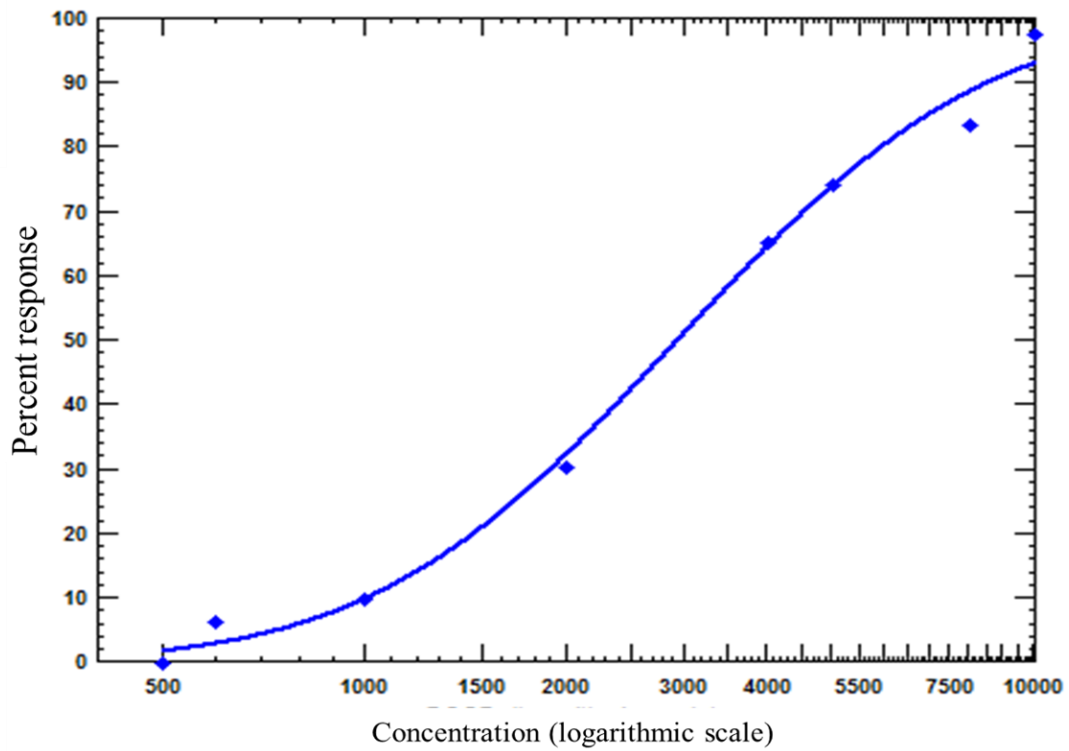
柒、附錄

附錄一 以不同濃度之益達胺處理黑棘蟻后的中毒症狀

Appendix 1. Symptom of queen of *P. dives* treated with imidacloprid of different concentrations



Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Symptom
10	convulsion, dead
8	convulsion, dead
5	convulsion, dead, cable to walk
4	convulsion, dead, cable to walk
2	convulsion, dead, cable to walk
1	convulsion, dead, cable to walk
0.6	cable to walk
0.5	cable to walk
0.5% DMSO	cable to walk
10% sugar water	cable to walk



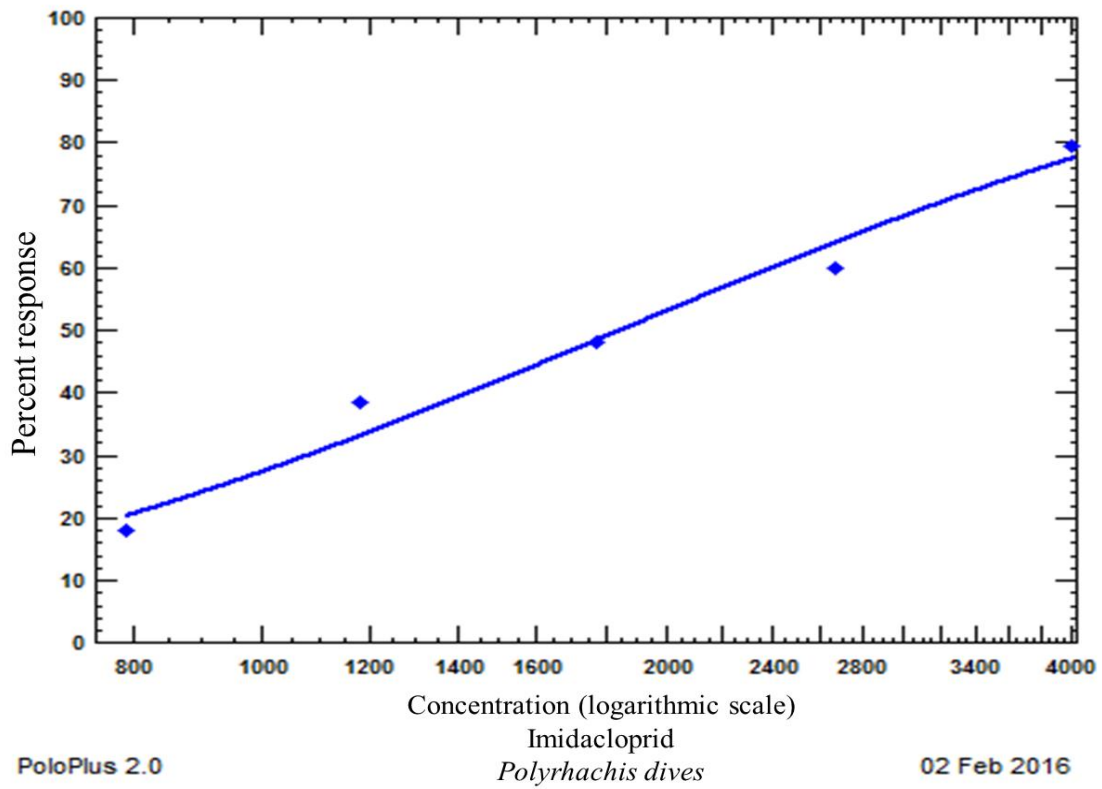
PoloPlus 2.0

Imidacloprid
Polyrhachis dives

02 Feb 2016

附錄二 益達胺對黑棘蟻小型蟻巢濃度反應曲線。

Appendix 2. Concentration-response curve of imidacloprid against small fragment colony of *P. dives*.



附錄三、益達胺對黑棘蟻外勤蟻濃度反應曲線。

Appendix 3. Concentration-response curve of imidacloprid against forager of *P. dives*.