

大安森林公園環境基礎調查
期末報告

人工光源對黃緣螢之影響
Light response in Aquatica ficta

國立台灣大學昆蟲學研究所

陳韻如，Avalon Celeste Stevahn Owens

指導教授：楊恩誠

摘要

人工光害在對自然生物生長為一重要影響因子，因應都市螢火蟲復育計畫，本實驗室以黃緣螢 (*Aquatica ficta*) 作為觀察對象，利用 LED 燈模擬夜間人工光源，觀察研究夜間光害對黃緣螢成蟲以及幼蟲分別會造成什麼影響。成蟲實驗以觀察成蟲發光行為為主軸，幼蟲試驗以檢測幼蟲基因表現狀況為主軸。實驗指出，黃緣螢雄性成蟲在弱光短波長 (444 -533 nm) 之人工光源干擾下會增加發光強度但減少發光頻率，在強光源短波長光源照射下雄蟲仍然會增加發光強度，但是發光頻率會大量減少，甚至不發光。而在受到長波長光源 (628 - 663 nm) 照射下，雄蟲之發光頻率與強度均沒有太大改變。幼蟲試驗則指出，在人工光源夜間連續照射兩個禮拜之後，約 0.7% (1450 個差異性表現基因 / 208,672 個轉錄子) 的轉錄組表現量會有顯著改變，其中青春激素相關代謝途徑在光照後表現量顯著上升，後續實驗亦指出夜間光照處理者在後續飼養過程中褪皮失敗而死亡之情形較控制組高。本計畫目前釐清人工光源對成蟲發光行為所造成之影響，而其對幼蟲之確切影響，雖然我們看到幼蟲在光害後有基因表現上的改變，但是對實際生理上之影響尚需更多科學性證據加以佐證。

研究背景

生物發光 (Bioluminescence) 泛指由活的生物體所製造的螢光，目前發現約 700 多屬生物會產生自發光，其中約 80% 存在於海洋 (Shimomura 2006)，陸生生物中則以節肢動物中的昆蟲綱為主要族群 (Marek *et al.* 2011; Oba *et al.* 2011)，而在昆蟲綱下，會發光的昆蟲包括雙翅目的眼蕈蚊科 (Mycetophilidae) 和尖眼蕈蚊科 (Sciaridae) 以及鞘翅目的螢科 (Lampyridae)、叩頭蟲科 (Elateridae)、光螢科 (Phengodidae)、和雌光螢科 (Rhagophthalmidae)，廣義的螢火蟲泛指螢科以及光螢科之昆蟲。螢火蟲是陸生生物中少數利用發光行為進行溝通與求偶者，其需要良好的水質與少污染的環境才能生存，因此也是重要的生態指標。隨著人類活動和開發，自然生物和資源在不停的消失，而如何在都市發展之下保持自然生態的平衡一直是科學家們努力的課題。台北市是個特別的都市，也是少數曾經有螢火蟲並且仍有條件進行螢火蟲復育的城市，然而，除了水源、食物、棲地環境的營造等因素外，都市內的人工光源對於螢火蟲之復育是一重要需要考量的環境因素，人工光源會干擾甚至造成螢火蟲發光求偶的行為中斷 (Costin and Boulton, 2016)，營造螢火蟲可以長期生存的都市尚需沒有人工光源的干擾的環境。本計畫利用黃緣螢 (*Aquatica ficta*)，台灣水生螢火蟲中最常見的品種作為研究對象，分別針對成蟲以及幼蟲進行光源干擾試驗，來探究人工光源對螢火蟲可能會造成的影響。

研究材料與方法

黃緣螢

黃緣螢雄性成蟲於永建國小附近採樣，樣本直接進行試驗，試驗期間提供水分，並於試驗完成後回原處野放。

幼蟲在有窗戶可透光、晚上全黑的室內用長*寬*高為 20*15*8 cm 的塑膠盆飼養，飼養用的水先曝氣一晚讓氣揮發後再使用，盆內水高維持在 3 - 4 cm 並持續打氣，室溫維持在約 24 度，水溫約 20 - 22 度。黃緣螢幼蟲每隔兩天以新鮮田螺餵食，田螺殼敲碎清洗乾淨，去除內臟後投入盆內餵食，第二天清除螺肉清洗盆子並換成乾淨的水繼續飼養，隔天再餵食螺肉。

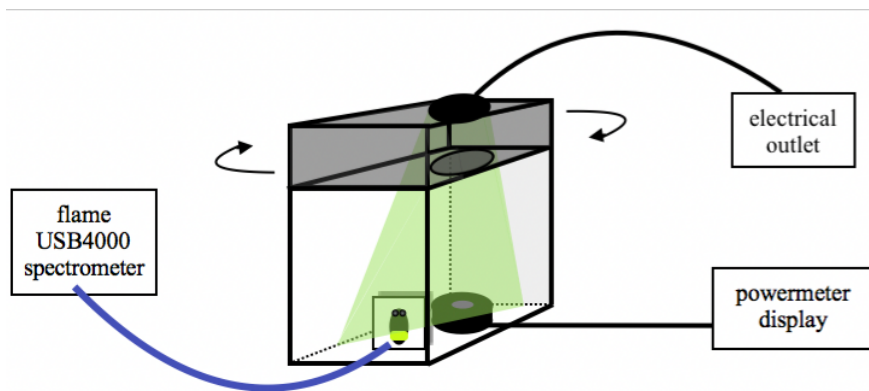
試驗光源

成蟲光源干擾試驗使用的光源為單一波長之 LED 圓型燈座，上面有內圈 10 個外圈 20 個共 30 個光源，燈泡覆蓋一片 50% 透光度的磨砂濾片。光源波長從 444 nm 到 663 nm，每增加 20-30 nm 設置一光源，共八個波長的光源，光強度以 Model 1935-C 系列的 power meter 進行測量，單位為 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ，試驗裝置如圖一 (A) 所示。

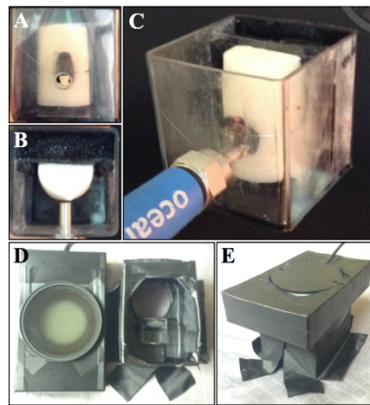
黃緣螢光幼蟲光害模擬實驗使用 5050 白光 LED 軟燈條 (紅綠模擬白光)，使用之軟燈

條長度約 30公分 18 個光源，共四條軟燈條，黏貼在 22 x 30 cm 透明壓克力板上，並用十張白色 A4 紙覆蓋在燈源上讓光源較為彌散，光強度約為 $0.001 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。

(A)



(B)



圖一、光源干擾試驗裝置示意圖 (A) 與 (B) 裝置實際構造圖。黃緣螢成蟲放置在下方固定於保麗龍上置於一透明壓克力盒內 (BA)，盒子上有小孔讓 USB4000 FLAME-S-XR1-ES 微型光譜儀光纖接頭與螢火蟲發光器靠近捕捉發出之光 (BB, BC)；LED 燈座置於上方的盒子內 (BD)，

人工光害模擬試驗

光害試驗一

黃緣螢雄性成蟲於永建國小附近採樣並飼養於 6公分高、直徑8公分、口徑9.5公分之圓柱狀透明容器中，放置於台灣大學昆蟲館樹叢間一晚，讓蟲隻適應環境，第二晚開始進行光害干擾試驗。成蟲光源干擾試驗裝置如圖一 (A) 所示，黃緣螢以細線纏繞在翅膀與背腹部，固定在保麗龍上後黏貼塑於膠薄片上，再放入一 2.5 公分長寬高的透明壓克力盒內，盒內一面有孔洞與 USB4000 FLAME-S-XR1-ES 微型光譜儀 (Ocean Optics) 之光纖接頭連接，讓螢火蟲腹部發光器與光譜儀感應器靠近到中間空隙不超過數公釐 (圖一 (B))，以即時記錄螢火蟲的發光，黃緣螢閃光之波長約為 567 nm，光譜儀設定記錄之波長為 565 nm 到 569 nm 之光，每 0.1 秒平均並記錄一次光強度。

試驗開始時間為日落後 30 分鐘、晚間七點左右開始，試驗開始前先緩衝五分鐘讓蟲適應環境，再開始持續 32 分鐘的試驗，八個波長的光源隨機單獨給予，各個波長的 quantum flux density 維持相同，每個光源均給予“弱光”與“強光”兩種光強度，“強光”者光強度大“弱光”約十倍，每個波長之“強光”與“弱光”給予的先後順序則為隨機，光給予時間為 45 秒，每次給予光照後會有一分鐘黑暗期分隔並記錄訊號，試驗順序為“光-暗-光-暗”四個階段，每波長四分鐘測量時間。光強度會先以最低亮度測量到的直坐矯正再加以算，波峰的強度則選擇 200 counts 以上的波峰再加以計算強度與頻率。

光害試驗二

實驗使用黃緣螢幼蟲約三到四齡，體長約 8 mm 幼蟲，黃緣螢四齡幼蟲分為兩組分開飼養，一組 40 隻，共八十隻，並用長 * 寬 * 高為 60 * 32 * 41 公分之不透光紙箱放置光照組以隔開人工光源對控制組的干擾，光源組晚間六點到早上六點給予 LED 燈模擬之人工光源，處理時間為兩個禮拜，兩個禮拜後進行第一次採樣，每組取樣十二隻幼蟲，隨機分成三個重複，進行 RNA 製備與 RNA-seq library 建構。

RNA 製備與 RNA-seq library 的建立

RNA 萃取使用 RNAeasy® mini kit (Qiagen) 並依照使用者手冊進行試驗，最後 RNA 回溶在 100 ul RNase free 水，進性膠體電泳檢測 RNA 品質，並用 NanoDrop 測量 RNA 產量。

RNA-seq library 的建立根據 Zhong et al. (2011) 進行，流程簡述如下：polyA RNA 分離使用 Dynabeads (Thermofisher) 進行，分離出的 polyA RNA 利用鎂離子高溫處理斷成約 200-600 的片段後，利用 ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB) 進行反轉錄反應合成第一股 cDNA，並以第一股 cDNA 為模板使用 DNA polymerase I (*E. coli*) (NEB) 和 RNase H (NEB) 合成第二股 cDNA。雙股 cDNA 利用 NEBnext Ultra II End Repair / dA-Tailing (NEB) 進行末端修補與 3' 末端 dA 添加，再利用 T4 DNA ligase (NEB) 將產物與 Y-shape adapter 黏合，最後使用 index PCR 引子對增幅產物，PCR 產物用 Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) 純化後利用 Qubit fluorometer (ThermoFisher Scientific, USA) 進行定量，隨後保存於 -20°C，定序將在 Illumina sequencer 平台進行。

基因表現量計算與差異性表現基因之篩選

RNA-seq reads 先以 ShortRead package (Morgan et al., 2009) 去除掉低辨識度的序列、adapter、以及核糖體 RNA 之序列，再以 Trinity package (Grabherr et al. 2011) 進行轉錄組組裝，得到的 unigenes 與 GeneBank nr 資料庫比對進行功能註釋，以家蠶 (*Bombyx mori*)、蜜蜂 (*Apis mellifera*)、及果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 為主要比對物種，E value 小於 1×10^{-5} 的註

釋判定為高相似功能。基因表現量的計算簡述如下，RNA-seq raw reads 先與轉錄組資料庫以 bowtie 2 進行比對，每個 read 容許的錯誤核苷酸數目為一個核苷酸。計算以 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 方法計算 (Mortazavi *et al.* 2008)。差異性表現基因 (differentially expressed genes, DEGs) 以 edgeR package (Robinson *et al.*, 2010) 進行計算，篩選出來的 DEGs 再進一步根據其 FPKM 在控制組或是光照組中有大於 3 者判定為有效基因，並區分為四組：如基因在控制組有表現但是在光照組沒有表現，判定為表現被關閉；如基因在控制組沒有表現但是在光照組有表現，則判定為表現被開啟；基因在兩組均有表現 (FPKM 均大於 3) 但在控制組表現量較高則判定為表現量下降，如在光照組表現量較高則判定為表現量上升，有效之 DEGs 再進行基因功能分析 (GO analysis)。

結果與討論

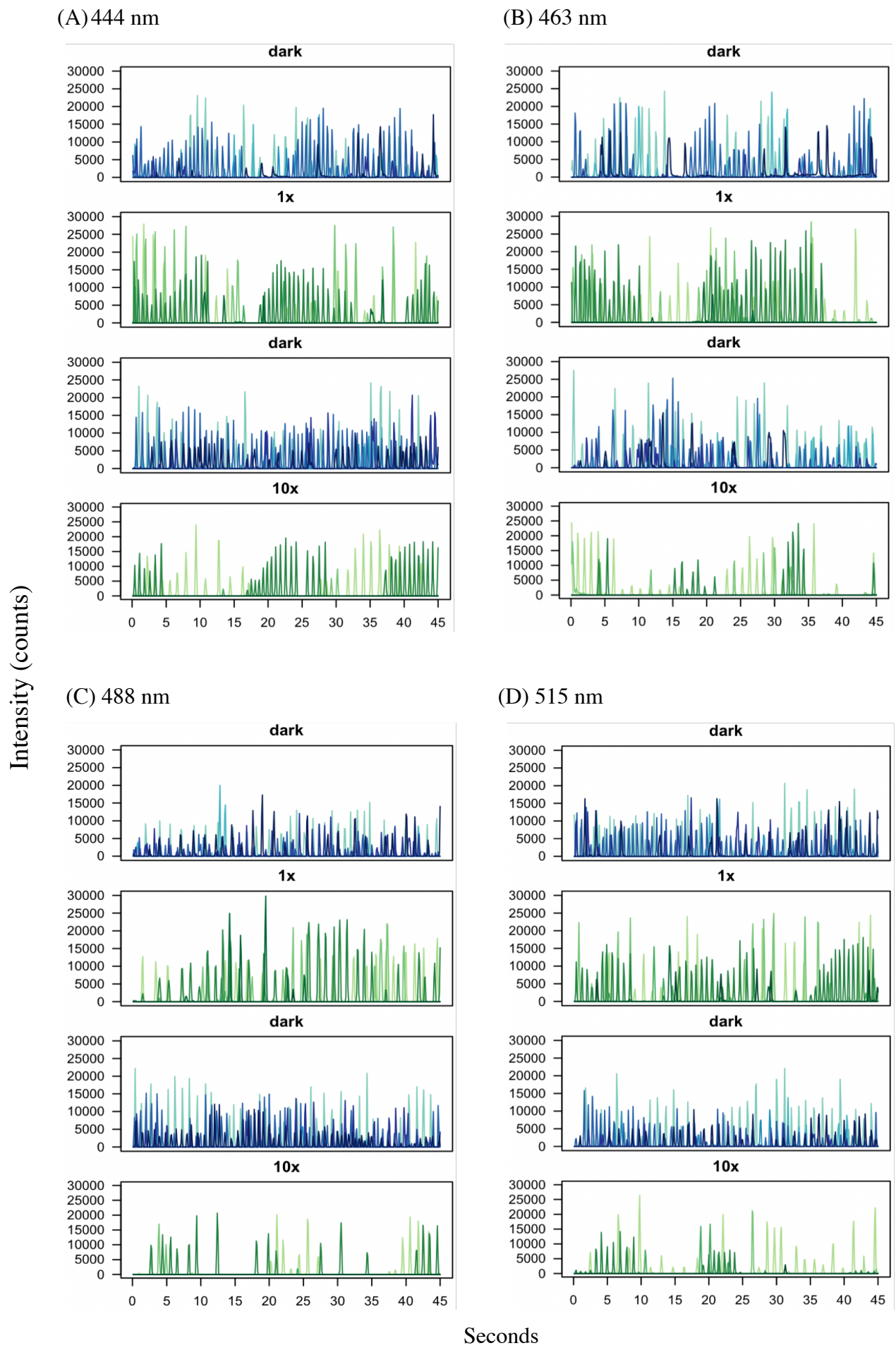
光源強度對黃緣螢學行成蟲發光行為造成不同影響

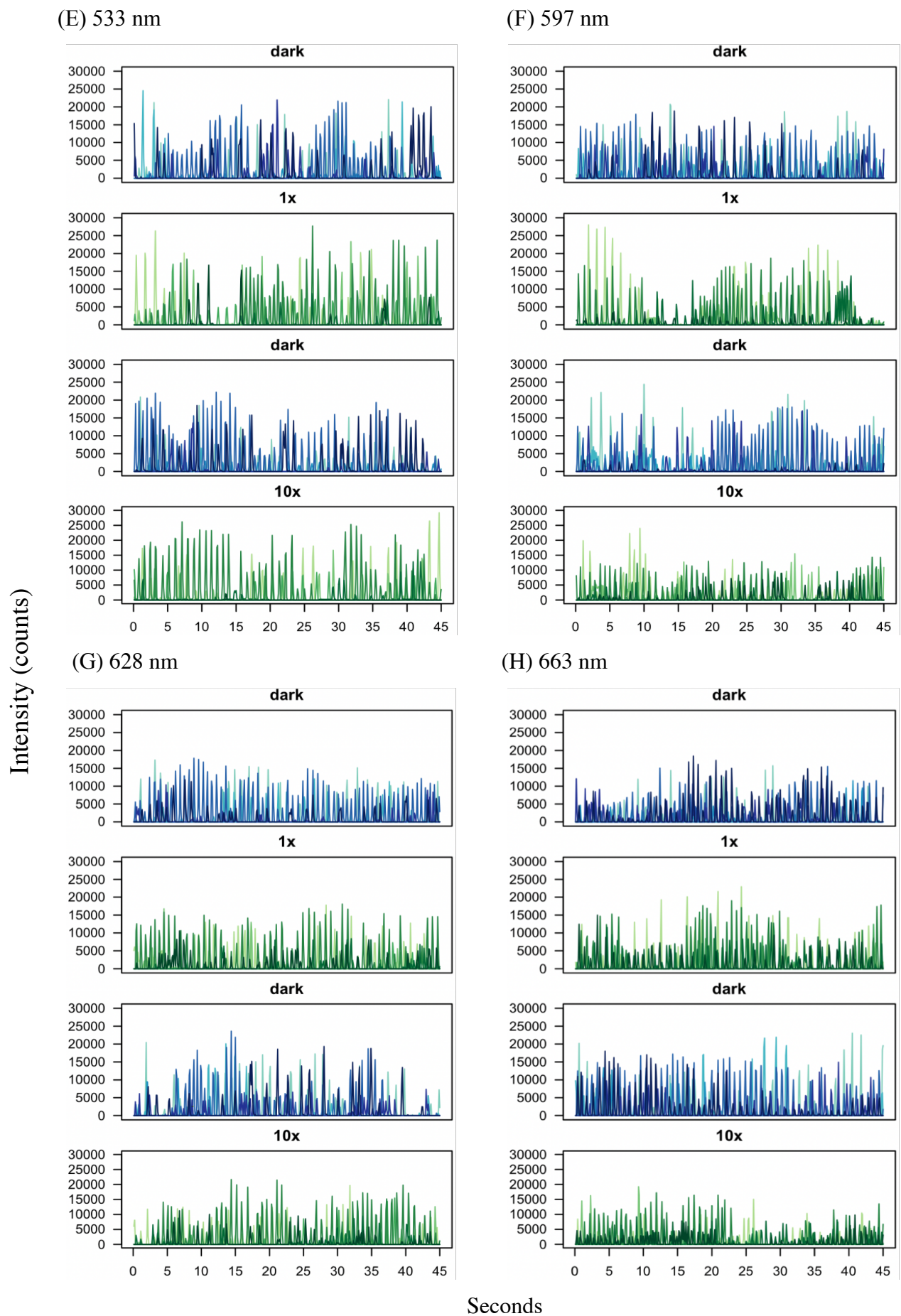
成蟲光照實驗總共進行時間分別為 2016 年 5 月 5 日到 9 日，以及 2016 年 5 月 12 日到 14 日，總共使用了 8 隻黃緣螢雄性成蟲，利用八種波長、不同強度光照短暫照射黃緣螢雄性成蟲後，觀察雄蟲發光行為，每次光給予時間為 60 秒，前面 15 秒作為蟲隻對環境的適應時間，因此該段期間之光譜不作為數據使用，後 45 秒之光譜作為有效結果。數據會先以無光狀態下最低訊號值作為背景值扣除後，再加以計算，因此訊號值小於 200 counts 者則判定為背景值，在短波長 (444 nm – 533 nm)、弱光光源的照射下，黃緣螢雄蟲發光頻率會減低，但是光強度會增加，但是在短波長、強光源的照射下，蟲發光頻率會更低，甚至不發光 (表一、圖二 (A-E)、圖三)；而在長波長光源 (628 nm – 663 nm) 的照射下，不論弱光或是強光，對黃緣螢發光強度以及頻率均沒有顯著影響 (表一、圖二 (G-H)、圖三)，雖然黃緣螢發光狀態會受到前次環境光源強弱之影響，但是大致上蟲隻可快速適應環境光源並改變自身發光強度與頻率。

表一、黃緣螢在黑暗以及八種波長與兩種強度的光源 45 秒刺激後自發螢光的作用光譜。Avg.

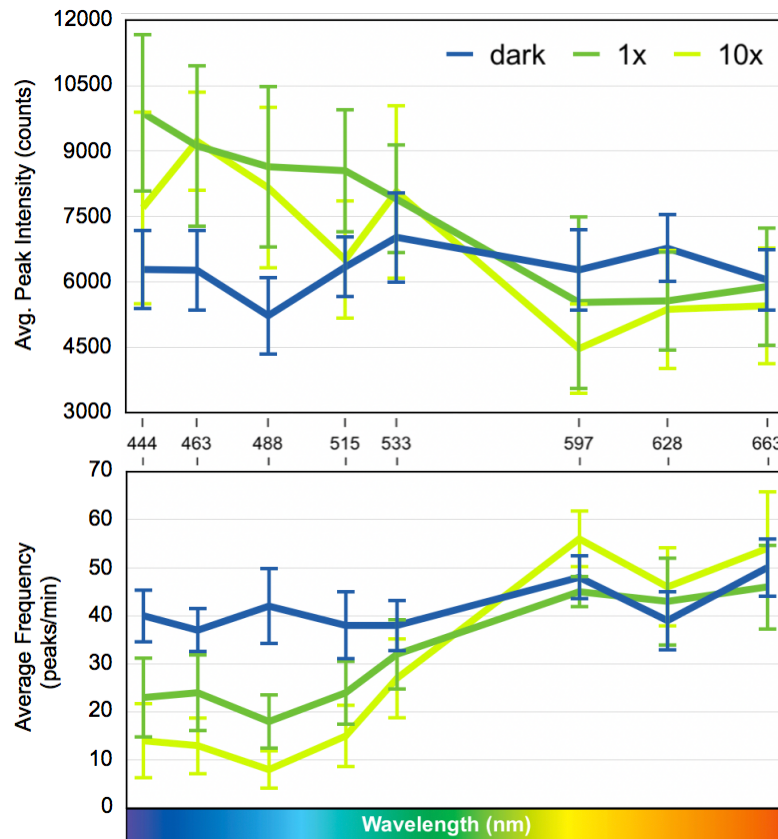
Peak Intensity (counts) 光強度 (左表)，Average Frequency (peaks/min) 光頻率 (右表)。

LED λ (nm)	avg. peak intensity (counts)			average frequency (peaks/min)		
	dark	1x	10x	dark	1x	10x
444	6284.2	9875.3	7698.9	40	23	14
463	6267.1	9119.2	9228.2	37	24	13
488	5224.1	8640.4	8158.5	42	18	8
515	6340.9	8550.3	6506.2	38	24	15
533	7022.1	7900.1	8068.7	38	32	27
597	6274.0	5528.0	4468.3	48	45	56
628	6771.8	5564.3	5369.3	39	43	46
663	6045.3	5893.4	5450.4	50	46	54





圖二、黃綠螢雄成蟲在 (A) 444 nm, (B) 463 nm, (C) 488 nm, (D) 515 nm, (E) 533 nm, (F) 597 nm, (G) 628 nm, 和 (H) 663 nm 八個波長外源光不同強度照射下自發螢光之強度與頻率。X軸：秒數；Y軸：光強度；dark: 無光照，1X: 弱光源，10X: 強光源。



圖三、黃綠螢在八種波長與兩種強度的光源 45 秒刺激時自發螢光的作用光譜，上圖為自發螢光之光譜強度，下圖為光譜頻率。X 軸：試驗光波長；Y 軸：Avg. Peak Intensity (counts) 光強度，Average Frequency (peaks/min) 光頻率。

黃綠螢幼蟲轉錄組簡介與光照後差異性表達基因篩選

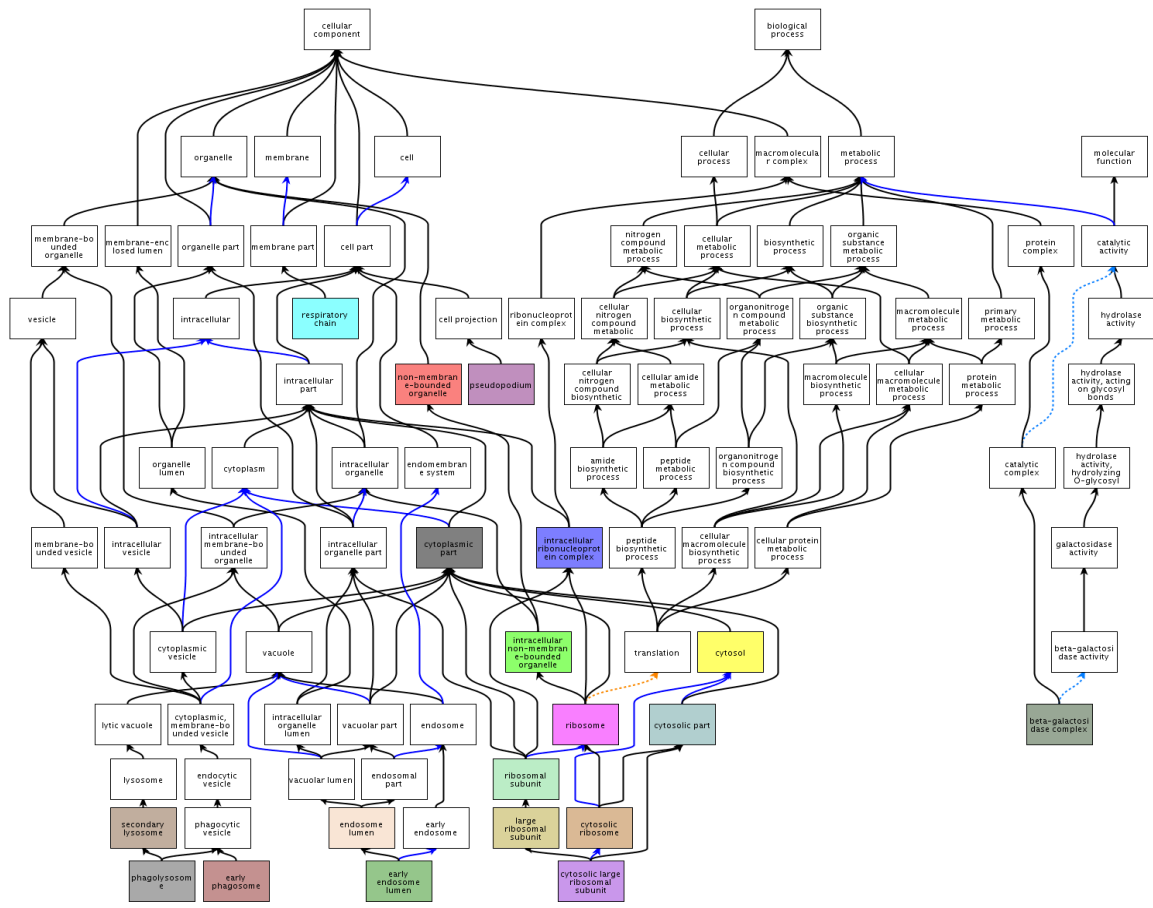
我們在光處理兩週後收取第一批幼蟲並進行 RNA-seq library 之製備與定序，並完成黃綠螢幼蟲之轉錄組組裝，黃綠螢幼蟲轉錄組包含 208,672 個 unigenes，其中 60,410 個 unigenes 完成了功能註釋 (表二)。我們根據組裝好的轉錄組作為比對資料庫，估算所有 unigenes 表現量，以表現量大於 3 FPKM 之 unigenes 進行了差異性表現基因之計算，總共得到了 1450 個差異性表現 unigene，其中光照後啟動表現的基因為 35 個，表現量增加高逾兩倍的基因為 23 個，表現量下降超過兩倍的基因為 26 個，表現被抑制的基因數目為 1366 個。

表二、黃綠螢幼蟲轉錄組詳細資料

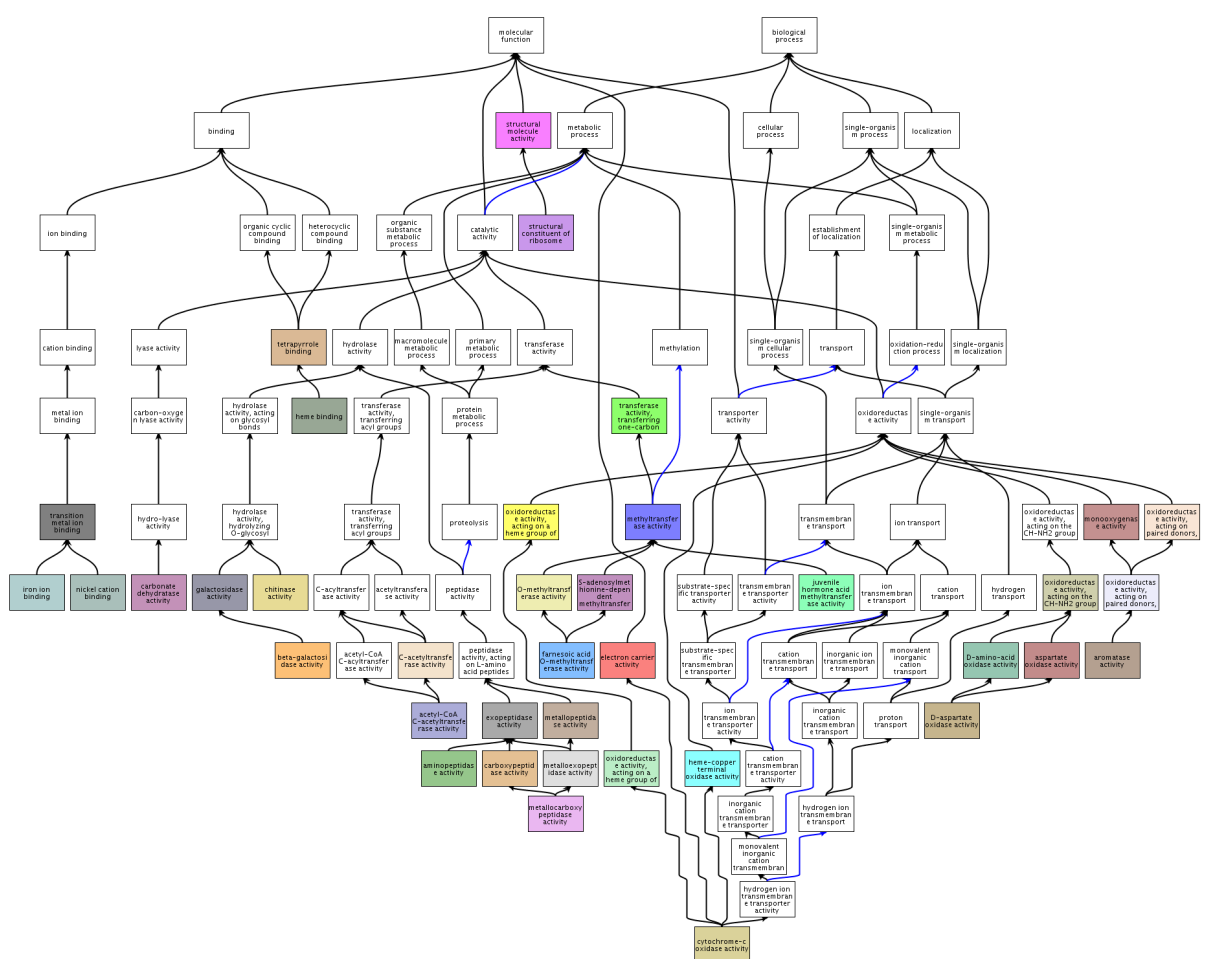
unigene 數目	功能註釋之 unigene 數目	最長 unigene 長度 (nt)	Unigene 平均 長度 (nt)	Unigene 長度 中數 (nt)	最短 unigene 長度 (nt)
208,672	60,410	26,285	456	298	201

我們針對差異性表現基因進行功能分析 (Gene Ontology, GO term analysis)，結果如圖四和圖五，GO 分析以三大類群：細胞組成份 (Cellular Component)、分子功能 (Molecular function)、和生物過程 (Biological Process) 分別探討與分析，解析基因所參與的各種可能途徑，GO 探討一般針對功能分佈樹圖落在第四到第六層的功能群組進行檢視，我們亦將第四到第六層的結果以表單呈現 (表三)。

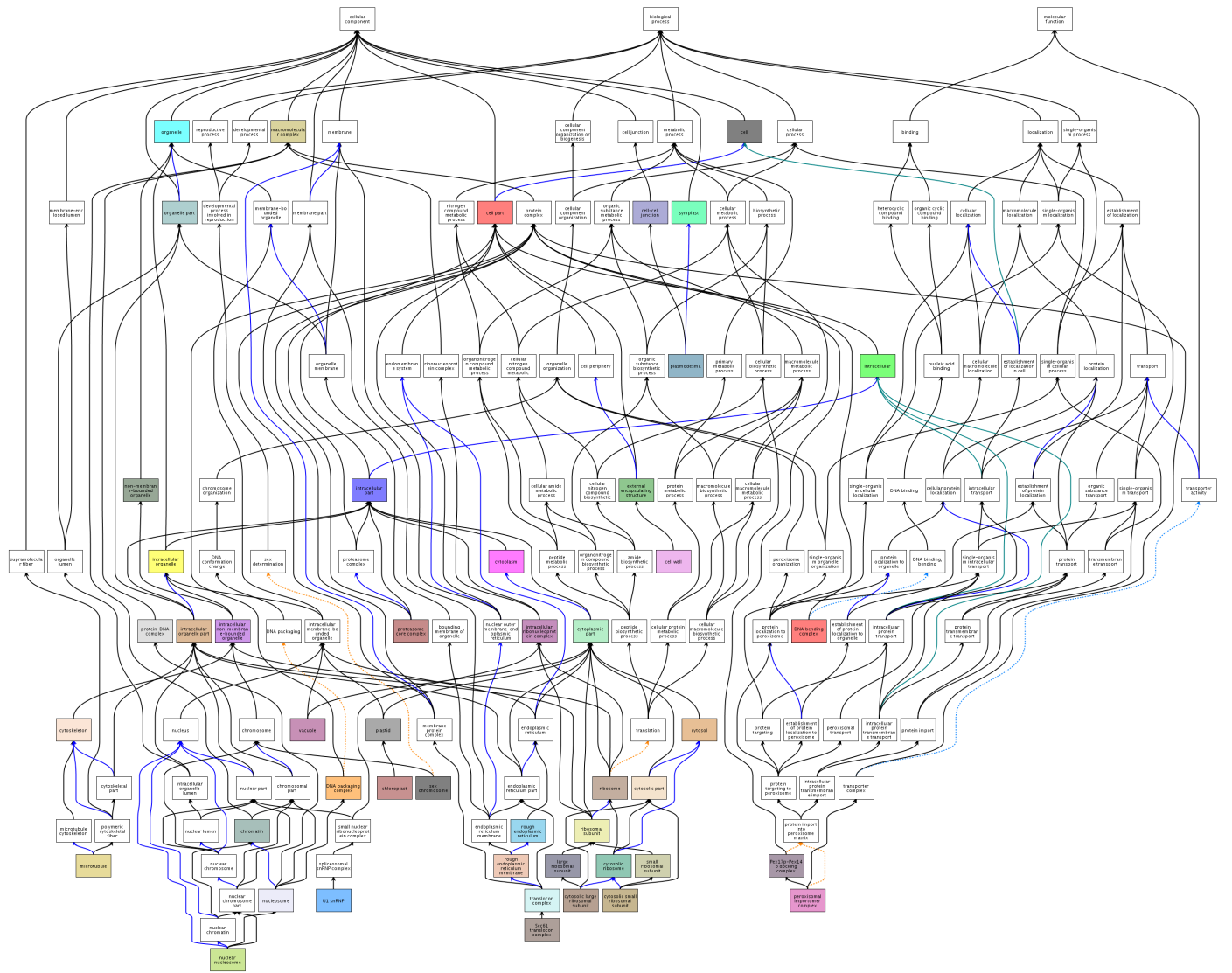
(A)

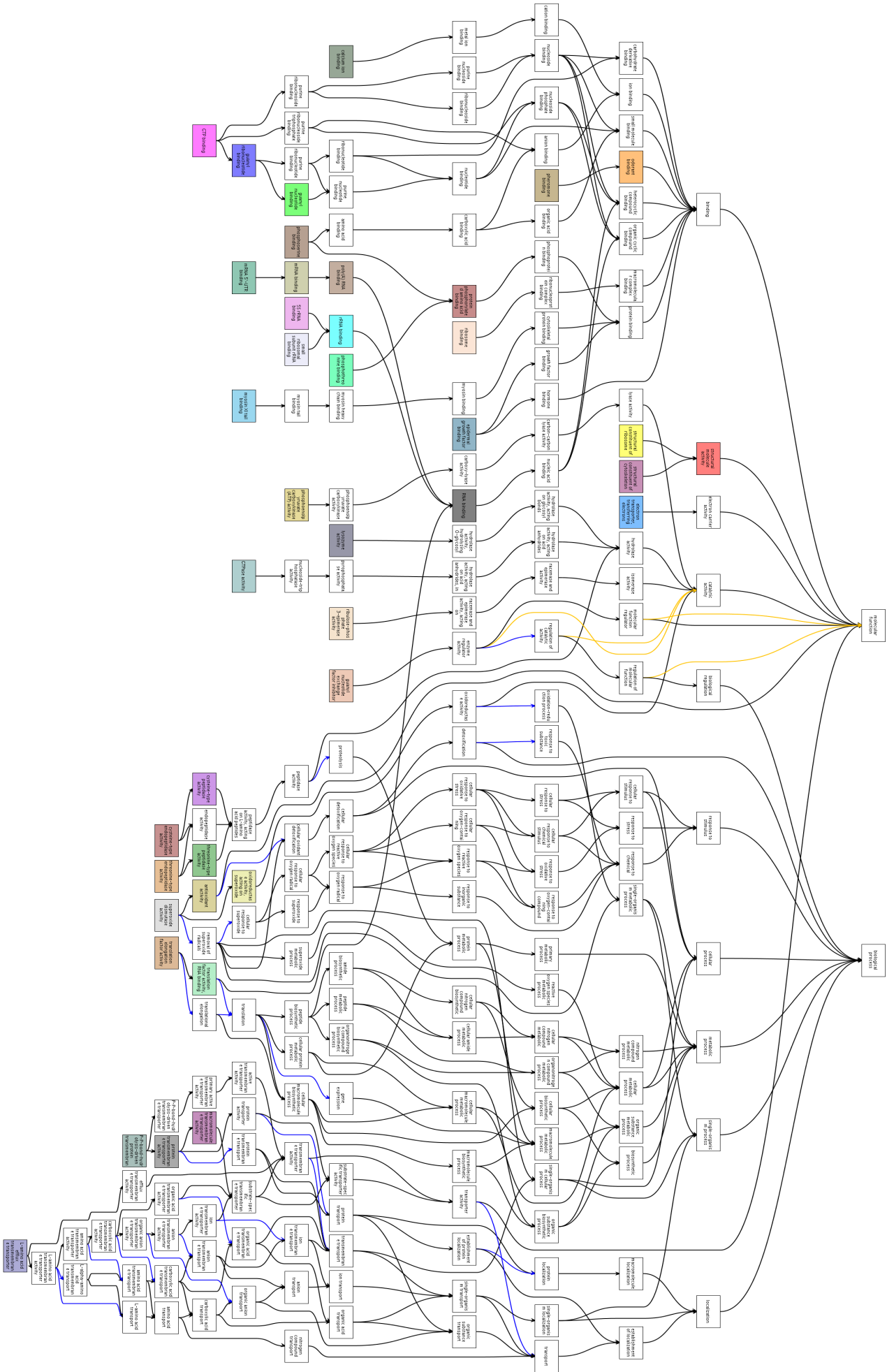


(B)



(A)





(B)

表三、黃緣螢幼蟲光處理後表現量增加 / 開啟或表現減少 / 關閉的差異性表現基因的功能性分析樹圖之第四到第六層的功能群組。

GO Terms		up-regulated / activated unigenes	down-regulated / repressed unigenes
level 4	Biological Process	digestion	primary metabolism process
		oxidation-reduction process	macromolecule metabolism process
		regulation of hormone levels	cellular biosynthesis process
	Cellular Component	respiratory chain	ribonucleoprotein complex biogenesis
level 5	Biological Process	energy taxis hormone metabolism process protein metabolism process	plasmodesma
			intracellular
			pheromone binding
	Molecular Function	tetrapyrrole binding	
level 6	Biological Process	non-membrane-bounded organelle pseudopodium	ribosome biogenesis
			macromolecular complex assembly
			cellular macromolecule metabolic process
	Cellular Component	heme binding	macromolecule biosynthesis process
level 6	Biological Process	transferase activity, transferring one-carbon	macromolecular complex disassembly
			protein metabolic process
			aminoglycan metabolic process
	Molecular Function		response to salt stress
level 6	Biological Process	antigen processing and presentation of exogenous extracellular matrix disassembly phototaxis	intracellular part
			non-membrane-bound organelle
			external encapsulating structure
	Cellular Component	isoprenoid metabolic process	RNA binding
level 6	Biological Process	proteolysis	ribosome binding
			protein phosphorylated amino acid binding
			epidermal growth factor binding
	Molecular Function		
level 6	Biological Process	transition metal ion binding oxidoreductase activity methyltransferase activity monooxygenase activity oxidoreductase activity, acting on paired donors	gene expression
			organelle assembly
			cellular macromolecular complex assembly
	Cellular Component		ribonucleoprotein complex subunit organization
level 6	Biological Process		cell wall macromolecule metabolic process
			cellular protein metabolic process
			glucosamine-containing compound metabolic
	Molecular Function		aminoglycan catabolic process
level 6	Biological Process		response to bacterium
			intracellular organelle
			cytoplasm
	Molecular Function		cell wall
level 6	Biological Process		calcium ion binding
			poly(A) RNA binding
			rRNA binding
	Molecular Function		phosphothreonine binding
level 6	Biological Process		ribulose-phosphate 3-epimerase activity
			lysozyme activity
			guanyl nucleotide exchange factor inhibitor
	Molecular Function		

本實驗以生物行為和生理反應為主，以夜間無光照組作為基準，探討在光照後基因表現的改變。我們在光源試驗後收樣本，利用 RNA-seq 組裝了黃緣螢幼蟲轉錄組，並以轉錄組資訊估算各個轉錄子之表現，以及差異性表現基因，再探討差異性表現基因的功能類群，在此討論以 biological process 相關途徑為主。針對表現量上升 / 表現開啟的功能群組當中，第五層有一群組為 ”激素代謝途徑” (hormone metabolism process) 相關者，該分支延伸到第九與第十層分別為 ”青春激素代謝途徑” (juvenile hormone metabolic process) 和 “青春激素合成途徑” (juvenile hormone biosynthetic process)，表示暴露在夜間光照環境下兩週後，黃緣螢幼蟲之青春激素代謝與合成等相關途徑表現量上升；而基因表現量下降 / 表現關閉者，其功能大致上分佈在與 “大分子代謝途徑” (macromolecule metabolic process)、“細胞組成份合成” (cellular component biogenesis) 和 “刺激反應” (response to stimulus) 等途徑相關。

從基因層次上，我們觀察到在光照處理後兩週黃緣螢幼蟲基因表現有顯著改變，且青春激素相關途徑表現量上升，在後續飼養時，我們觀察到光照處理的幼蟲較容易因為蛻皮失敗而死亡，在飼養後五個月的存活率是 28.57 % (n = 28)，控制組為 64.29 % (n = 28)，唯該組試驗因為冬天寒流水溫過低，光照組在飼養後七個月全數死亡，因此無法提供具有統計意義的結果佐證。另外值得注意的是，不同於蟑螂或是果蠅在遭受到夜間光照後生理時鐘 (circadian rhythm) 相關基因表現會受到影響，我們在差異性表現基因中沒有找到與生理時鐘相關基因，可能推測原因為：1. 螢火蟲生理時鐘相關基因與其他物種不同而無法在 NCBI nr 資料庫中比對到；2. 我們提供之人工光源或是光照持續時間不足以造成生理時鐘相關基因表現之改變，但不論是何者，我們都需要更多實驗證據來證實。

結論

本計畫利用 LED 燈模擬夜間人工光源，觀察研究夜間光害對黃緣螢成蟲以及幼蟲分別會造成什麼影響。成蟲實驗以觀察成蟲發光行為為主軸，幼蟲試驗以檢測幼蟲基因表現狀況為主軸。實驗指出，黃緣螢雄性成蟲在弱光短波長 (444 - 533 nm) 之人工光源干擾下會增加發光強度但減少發光頻率，在強光源短波長光源照射下雄蟲仍然會增加發光強度，但是發光頻率會大量減少，甚至不發光。而在受到長波長光源 (628 - 663 nm) 照射下，雄蟲之發光頻率與強度均沒有太大改變，因此，如欲在都市內復育黃緣螢，附近環境夜間光照需調整為長波長之光源以減少光源對成蟲交尾行為之干擾；幼蟲試驗則指出，在人工光源夜間連續照射兩個禮拜之後，約 0.7% (1450 個差異性表現基因 / 208,672 個轉錄子) 的轉錄組表現量會有顯著改變，其中青春激素相關代謝途徑在光照後表現量顯著上升，後續實驗亦指出夜間光照處理者在後續飼養過程中褪皮失敗而死亡之現象較控制組高。本計畫目前釐清人工光源對成蟲發光行為所造成之影響，而其對幼蟲之確切影響，尚需更多科學性證據加以佐證。

參考文獻

- Costin, KJ and Boulton AM. 2016. A field experiment on the effect of introduced light pollution on fireflies (Coleoptera: Lampyridea) in the Piedmont region of Maryland. *The Coleop. Bull.* 70: 84-86.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng QD, Chen ZH, Mauceli E, Hachee N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29: 644-652.
- Marek P, Papaj D, Yeager J, Molina S, Moore W. 2011. Bioluminescent aposematism in millipedes. *Curr Biol* 21: R680-1.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. *Nat Methods* 5: 621-628.
- Oba Y, Branham MA, Fukatsu T. 2011. The terrestrial bioluminescent animals of Japan. *Zoolog Sci* 28: 771-89.
- Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**, pp. -1.
- Shimomura O. 2006. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. Toh Tuck Link, SG: World Scientific.
- Zhong S, Joung JG, Zheng Y, Chen YR, Liu B, Shao Y, Xiang JZ, Fei Z, and Giovannoni JJ. 2011. High-throughput Illumina strand-specific RNA sequencing library preparation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011:940–949. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot5652>.