

國立清華大學

分子與細胞生物研究所

碩士論文

黑翅螢發光器之顯微構造

A study on the Fine Structures of the Light Organ in a
Firefly , *Luciola cerata* (Coleoptera: Lampyridae)

姓名：康美華 (Mei-Hua Kang)

學號：944210

指導教授：李家維博士 (Chia-Wei Li, Ph. D.)

中華民國九十九年九月

摘要

螢火蟲是生物發光最為人熟知的例子，雖然科學家對於螢火蟲的研究也已經超過百年的歷史，但是仍有許多未知的領域尚待探索。螢火蟲的螢光是來自名為發光器的組織，在全世界兩千餘種的螢火蟲中，不同種類的螢火蟲發光器外型變異甚大，成蟲的發光器大多位於蟲體尾端體節的腹面，幼蟲則分布在尾端體節的側邊。

我們用台灣數量最多的螢火蟲—黑翅螢作為材料，利用顯微方法觀察，比較成蟲和幼蟲發光器的構造差異。雄性成蟲發光器位於第五、六體節腹面，緊貼著下表皮，而幼蟲的發光器則在第八體節的側邊，左右各一。從成蟲發光器的橫切面的觀察可知，構造上分為兩層，一為發光層（**photogenic layer**），二為反光層（**reflecting layer**）。發光層是螢光反應的區域，需要大量的氧氣參與反應，數量可觀的氣管分枝緊鄰著發光細胞；反光層佔有發光器50%以上的體積，裡面的細胞填滿著大小均勻，圓形的尿酸顆粒，每個顆粒包附著單層膜。幼蟲的反光層也含有大量的尿酸顆粒，但是排列較為鬆散，尺寸大小較不均勻，顆粒密度僅有成蟲的14.03%。反光層中，成蟲的尿酸顆粒直徑尺寸0.46-1.36 μm ，而幼蟲尿酸顆粒大小變異較大，直徑範圍在1.70-7.49 μm 。螢火蟲成蟲反光層含有大量的尿酸，佔體重的5.21%。尿酸是排泄氮的代謝廢物，但是成蟲階段只吸食花蜜和露水，因此尿酸來源可能是幼蟲階段時儲存下來，到了蛹期，發光器形態和位置改變，從腹節兩側變成腹節下方，尿酸顆粒也漸漸形成厚度均勻的反光層。

Abstract

Fireflies are well-known in bioluminescent organisms. They have been studied over hundred years. There are still many unknown details to figure out. Bioluminescence is localized to the particular region of the fireflies body named the lantern or light organ. The light emission of fireflies ranges from steady glows through to complex pulse and flash systems. The light organ can be identified by white color and found in the terminal abdominal segments. It varies in the external morphology as well as the internal physiology between lampyrid species. In general, lanterns of fireflies are composed of photocytes, a tracheal system and nervous supplies. A more complex form of lantern includes an additional layer on the inner surface of the photogenic tissue. This layer is called the “reflective layer” and filled with white opaque cells that are structurally different to the photocytes.

58 species of lampyrid have been found in Taiwan. A large number of *Luciola cerata* are seen in spring and they emit yellow-green light. We use *Luciola cerata* as materials because of collecting easily. Male lanterns occupy the entire last two abdominal sternites while female lanterns degenerate to the penultimate segment. Larva have tiny two-paired lanterns in their eighth abdominal segment. The male adult emits yellow-green light, λ_{\max} is 561nm measured by the spectrometer.

The organization of the lantern can be divided to two different layers: the photogenic layer and the dorsal layer (the reflecting layer). Light is emitted from photocytes in the photogenic layer. The most striking cytoplasmic feature of the dorsal layer is the presence of numerous urate granules, surrounded by a single-layer membrane. According to the photograph by scanning electronic microscope (SEM), urate granules of adults are uniform and 0.46 to 1.36 μ m in diameter. Urate granules of the dorsal layer occupy over 50% in volume of the adult lantern. The amount of uric acid is measured 5.21% of whole dry body weight by using commercial uric acid assay kit. However, the diameter of urate granules varies from 1.70 to 7.49 μ m in firefly larva. Uric acid is the main nitrogen catabolite of insects. Most fireflies only ingest water or nectar. The high uric acid concentration of adult fireflies may be stored at the larval stage, and gather to form the dorsal layer during the pupal stage.

誌謝

寫著論文，像是將這幾年做個總結，初次的野外採集、電顯觀察，令人越發沈迷在大自然的奧妙之中。落花水面皆文章、一沙一世界，自然界的美俯拾即是，只要你有一雙懂得欣賞的眼——這點是我從李家維老師身上學到的。無論今後是否會繼續在學術這條路闖蕩，這段時間所學已融入我的人生。

感謝李家維老師不厭其煩的指導——研究與做學問態度亦如是；感謝焦傳金老師和何健鎔老師擔任口試委員及論文內容的建議；感謝華子恩博士協助提供發光器的TEM照片；感謝父母給予的無限支持與寬容；感謝實驗室的大家一同討論實驗的想法及分擔研究的喜怒哀樂；感謝很多好朋友的無可替代的陪伴與關懷；感謝每一位曾經幫助過我、關心過我的人；也感謝為學術犧牲的螢火蟲們。



目錄

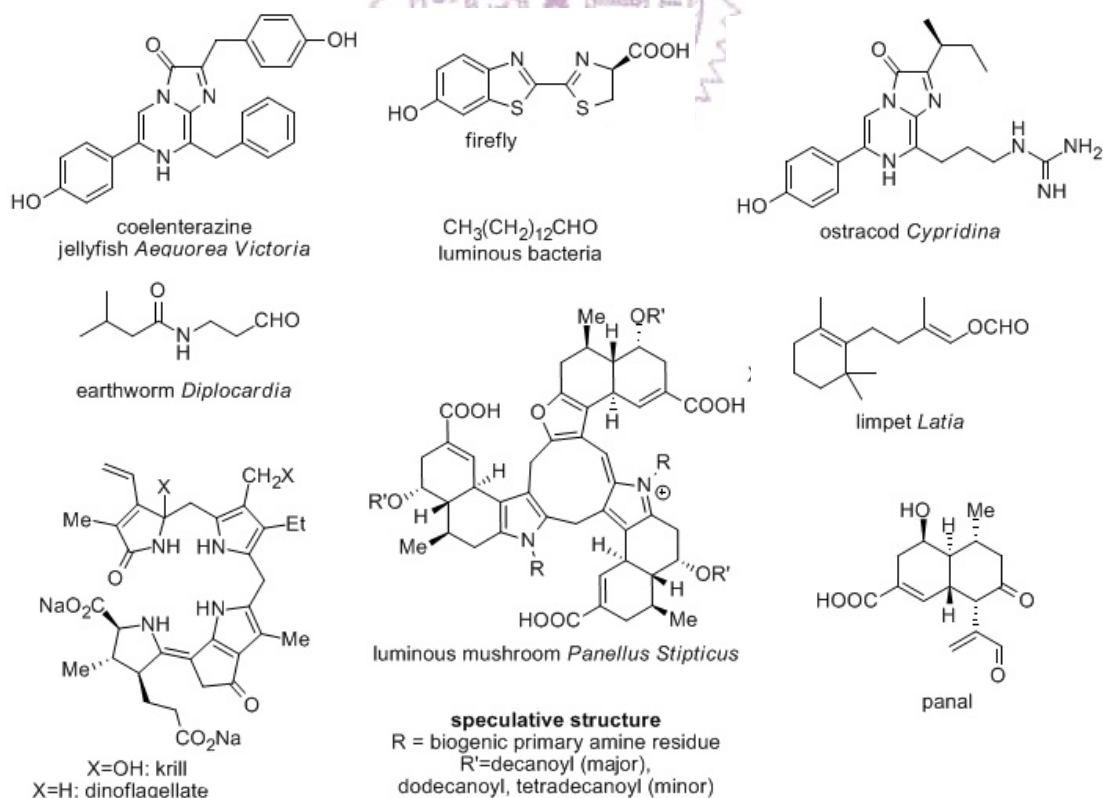
第一章.....	2
1. 前言—生物發光與螢火蟲.....	2
1.1.生物發光.....	2
1.2.發光昆蟲的介紹.....	3
1.3.螢火蟲的研究回顧.....	7
1.4.台灣的螢火蟲.....	15
1.5.黑翅螢的生活史.....	16
1.6.尿酸與昆蟲的關係.....	17
第二章.....	18
2. 實驗材料與方法.....	18
2.1.材料.....	18
2.2.實驗方法.....	18
2.3.掃描式電子顯微鏡.....	18
2.4.穿透式電子顯微鏡.....	19
2.5.發光器之尿酸含量及顆粒尺寸的分析.....	20
第三章.....	21
3. 實驗結果.....	21
3.1.雄性成蟲發光器之電子顯微鏡觀察.....	21
3.2.幼蟲之發光器之電子顯微鏡觀察.....	31
3.3.發光器之尿酸含量、顆粒尺寸及顆粒數量密度的分析.....	35
第四章.....	36
4. 討論.....	36
第五章.....	39
5. 結論與未來展望.....	39
參考文獻.....	41

第一章

1. 前言—生物發光與螢火蟲

1.1. 生物發光

法國化學家R. Boyle在十七世紀研究螢光細菌，於體外實驗（*in vitro*）證實：生物發光（*bioluminescence*）需要空氣參與反應，而且螢光強度和氧氣含量呈正比關係。1886年，法國生物學R.Dubois在軟體動物的體內，萃取出兩種物質，當兩者混合並處於含氧的環境中，便會產生螢光。現在這兩種物質已被證實為螢光素（*luciferin*）和螢光酵素（*luciferase*）（Harvey, 1980）。生物發光的現象遍佈在陸生與海洋生物，如細菌、藻類、真菌、腔腸動物、



圖一、各種發光有機體的發光素，結構各異。（Shimomura, 2006）

環節動物、昆蟲、甲殼動物、軟體動物以及魚類（Babu & Kannan, 2002; Garfield, 1982; Hastings & Johnson, 2003; Holladay, 2005; Weitz *et al.*, 2001），用來發光的發光素結構也不同（Shimomura, 2006）（圖一），但是尚未發現更多的植物和脊椎動物有生物發光的現象（Babu & Kannan, 2002）。

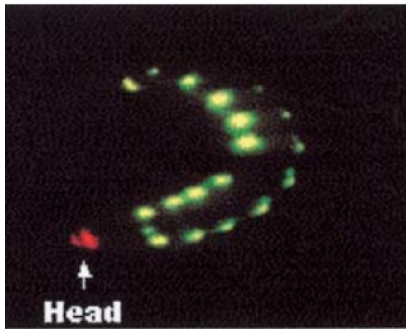
遍佈在不同物種的生物發光，是由化學反應所產生，螢光酵素催化螢光素與氧氣反應。生物剛起源的地球缺乏氧氣，厭氧生物大量繁殖，因此生物螢光可能起源於厭氧生物為了去除致命的氧氣而引發的化學反應（Timmins *et al.*, 2000）。經過長久的演化，生物螢光演變至螢火蟲族群，成了溝通及求偶的密語。

1.2. 發光昆蟲的介紹

在龐大的昆蟲綱（Insecta）之中，發光昆蟲分布在以下四個目：彈尾目（Collembola）、半翅目（Hemiptera）、鞘翅目（Coleoptera）及雙翅目（Diptera），截至目前，大多數的研究集中在鞘翅目和雙翅目的昆蟲。數量最多的鞘翅目，背部特化成堅硬的外殼，俗稱「甲蟲」，個體數量在昆蟲中佔有40%的高比例，大部份的發光昆蟲也分布在鞘翅目。螢科（Lampyridae）是最為人熟知的發光昆蟲，也就是一般人指的螢火蟲（firefly），其他還有捕蜈螢科（Phengodidae），雌蟲沒有翅膀，外型與幼蟲相似，每個體節側邊都有一個發光器，黑暗中可以看到兩排亮點，巴西的鐵路蠕蟲（railroad worm）體側發綠光之外，頭部發光器還會發出紅光（Viviani, 2002）（圖二）。叩頭蟲科（Elateridae）的*Pyrophorus*屬也是常被研究的物種，著名的熱帶叩頭蟲（*Pyrophorus noctilucus*），有兩個不同位置的發光器，一對在背部，另一個在腹部（圖三），當叩頭蟲爬行時，背部發光器發出綠色螢光，而在飛行時，腹部發橘黃光（Stolz, 2003）。

隸屬雙翅目的穴棲發光蕈蚋（*Arachnocampa luminosa*），棲息在紐西蘭

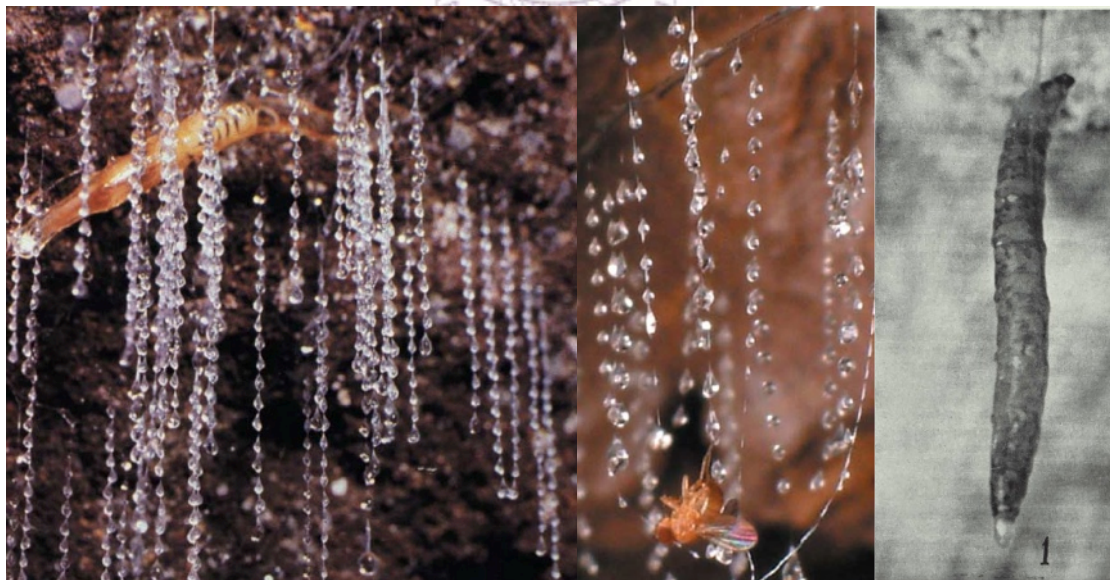
的鐘乳石洞中，幼蟲吐出含有黏液的絲線將自己懸在岩壁上，尾部發出持續的淡藍光芒吸引小昆蟲，捕食被黏液困住的昆蟲，眾多垂掛在岩壁的絲線像是水晶珠簾（Richards, 1960; Meyer-Rochow, 2007）（圖四）。



圖二、光螢科的鐵路蠕蟲（*Phrixothrix hirtus*），體側和頭部都有發光器，分別發出綠色和紅色，不同顏色的光。（Viviani, 2002）

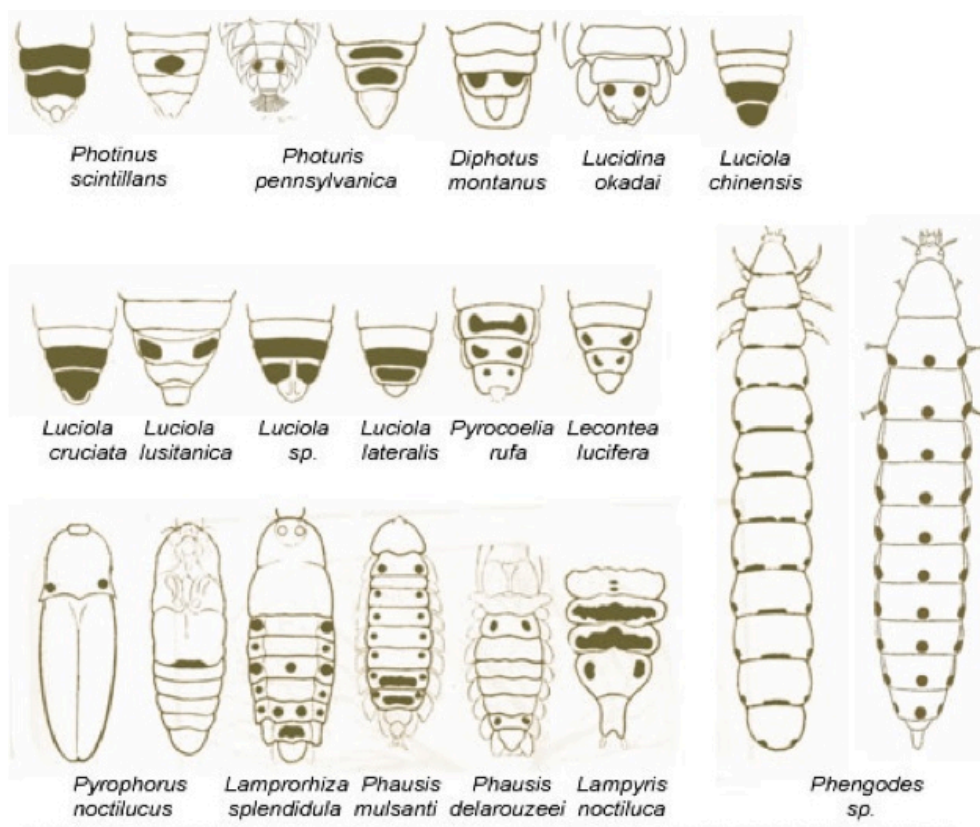


圖三、熱帶叩頭蟲（*Pyrophorus noctilucus*），頭部發光器為一對（上），腹部則為一片（下），分別發綠光和黃光（Stolz, 2003）。



圖四、發光蕈蚋（*Arachnocampa luminosa*）幼蟲的美麗陷阱，絲線上佈滿了黏液（左），幼蟲（右）懸在絲線末端並發出螢光來誘捕飛蟲（中）（Richards, 1960; Meyer-Rochow, 2007）。

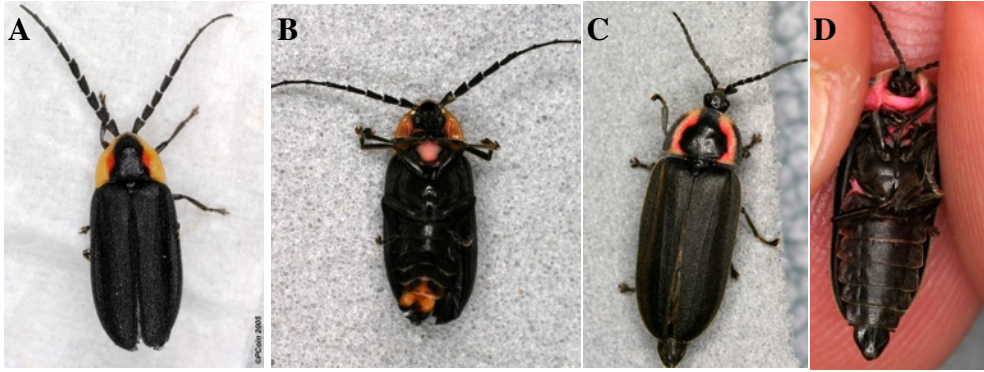
不同種類的發光甲蟲，其發光器外型相異甚遠，發光器的數量也不等，尺寸從針頭大至佔滿好幾個體節的腹面不等，位置也出現在全身，頭部、前胸或是腹節皆有（Buck, 1948）（圖五）。



圖五、不同種類的發光甲蟲，有著變異極大的發光器，深色部份為發光器位置。（Buck, 1948）

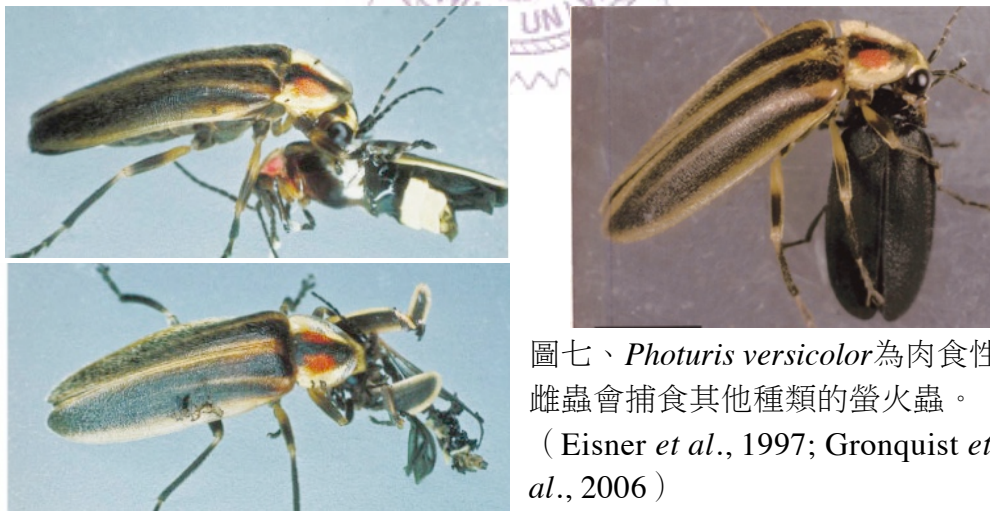
廣義來說螢科所屬之昆蟲都是螢火蟲，全世界有兩千餘種，除了南極洲以外，其他陸地皆有分布（Trimmer *et al.*, 2001）。螢火蟲為完全變態，一生經歷卵、幼蟲、蛹、成蟲四個階段，僅有三分之一的螢火蟲從卵到成蟲都會發出螢光（陳燦榮, 2003）。成蟲階段不發光的螢火蟲，多在白天活動而且發光器已經退化變小或消失，只剩外型仍然和螢科昆蟲吻合，例如*Ellychnia*屬和*Lucidota*屬（圖六），不發光的*Lucidota*屬螢火蟲利用費洛蒙來尋找配偶。

螢火蟲的性別在卵受精時已決定，但是幼蟲從外觀難以判斷性別。雄性成蟲有完整發育的翅膀，雌蟲有些與雄蟲同型，其他種類的雌蟲翅膀則部份



圖六、日行性螢火蟲。A： *Lucidota* 屬螢火蟲背面；B： *Lucidota* 屬螢火蟲腹面，失去作用的發光器為橘色區域；C： *Ellychnia* 屬螢火蟲背面；D： *Ellychnia* 屬螢火蟲腹面，沒有發光器。（圖片來自BugGuide）

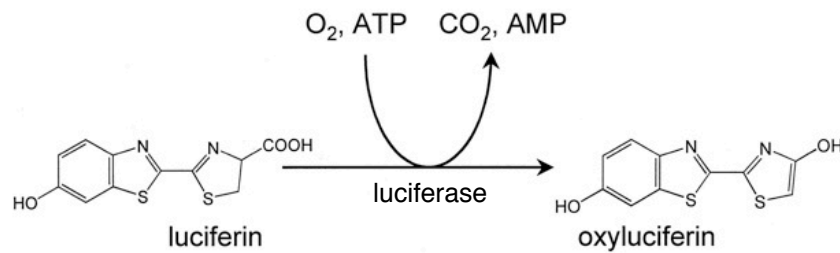
或是完全退化。成蟲的發光主要用於求偶，每種螢火蟲的螢光有著特定的波長和閃爍頻率，彼此藉著發光模式的差異，在黑暗中辨別不同的種類。*Photuris* 屬的數種螢火蟲之中（圖七），雌蟲甚至會模仿其他種類螢火蟲的發光模式，吸引非同類的螢火蟲作為獵物（Eisner *et al.*, 1997; Gronquist *et al.*, 2006; Lloyd, 1965）。此種行為稱之為攻擊性擬態（Aggressive mimicry）。



圖七、 *Photuris versicolor* 為肉食性，雌蟲會捕食其他種類的螢火蟲。（Eisner *et al.*, 1997; Gronquist *et al.*, 2006）

1.3. 螢火蟲的研究回顧

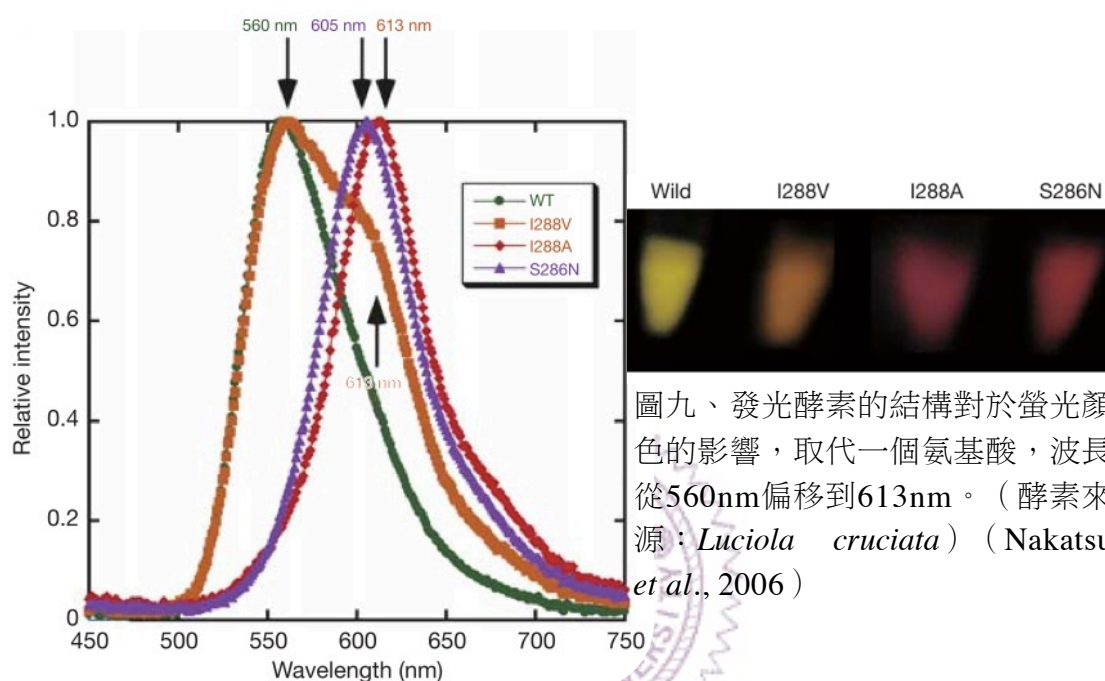
1907年，科學家猜測螢火蟲的螢光來源為體內共生的螢光細菌，如同早期發現的發光生物，而這些生物並沒有發光器官（Kuhnt, 1907）。後續的研究者試著分離且培養螢火蟲內部的螢光細菌，卻發現分離後的「細菌」不會產生螢光。經過一連串的化學分析，證實這些具有胞膜構造的顆粒並非細菌，而是細胞中含有蛋白質的微粒，也就是發光細胞顆粒（*photocyte granule*）。Harvey在1917年首次重現螢火蟲的發光反應，在發光細胞中取出發光素和發光酵素，雖然發光素和酵素混合後確實產生螢光，卻十分微弱及短暫。30年後，McElroy發現除了發光素和發光酵素之外，反應需要三磷酸腺



圖八、螢火蟲的螢光反應，需要氧氣和ATP的參與。
（Gomi & Kajiyama, 2001）

甘（ATP）提供能量，他從兔子肌肉中得到ATP，混合在發光素和發光酵素兩個反應物質，得到了明亮且持續較久的螢光。1949年，McElroy和Strehler更進一步證明了鎂離子是發光反應不可或缺的物質。往後的十年，McElroy努力純化發光素和發光酵素，得到兩者的結晶，終於在1961年，由White等人定出結構，而且只有D-form的發光素才有活性（Harvey, 1980）。螢火蟲的發光酵素是分子量約61kDa的小分子酵素，和發光素產生專一的氧化反應（Gomi & Kajiyama, 2001; Viviani, 2002）（圖八）。

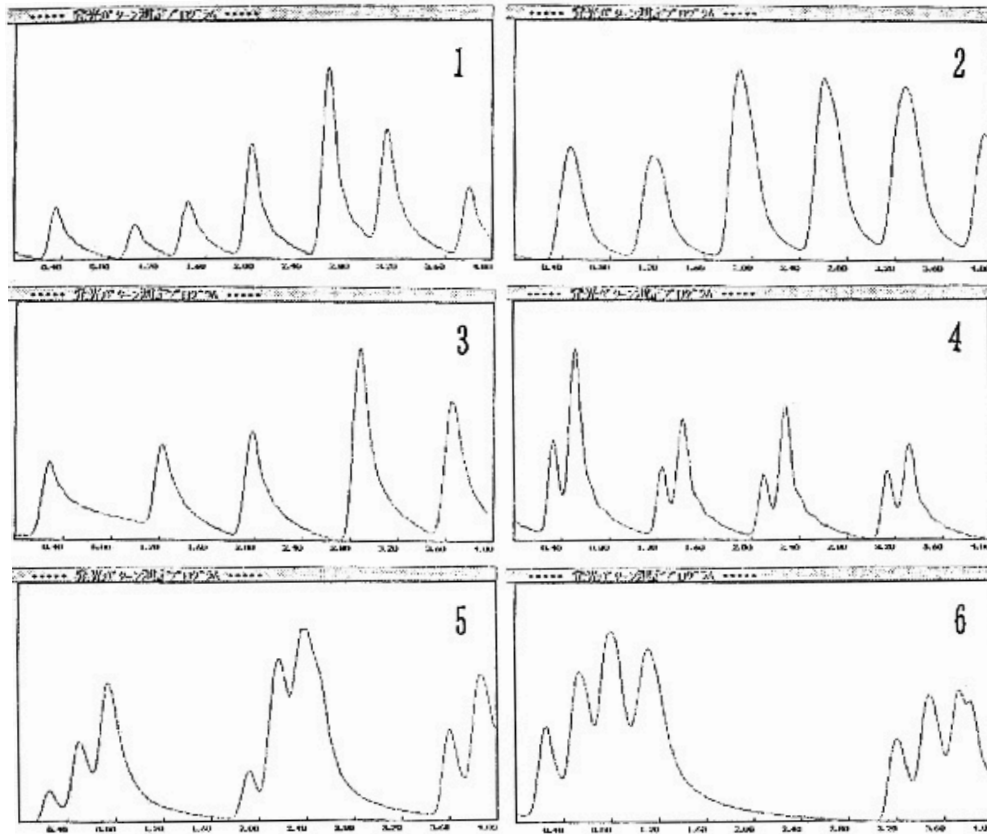
發光昆蟲種類繁多，發出來的螢光顏色各有不同，從綠光到紅光，波長範圍在530至635nm，但是這些昆蟲所使用的發光素卻是一樣的（Branchini *et al.*, 2004）。造成不同螢光顏色的主因是螢光酵素，只要酵素組成之中取代一個氨基酸，就足以改變發光酵素的三維結構，使得螢光顏色從黃綠色偏移到紅色（Nakatsu *et al.*, 2006）（圖九）。



在暗夜中發著光的螢火蟲，在陸生動物中顯得相當獨特而引人注目，從十九世紀開始成為學術研究的寵兒，螢火蟲的發光器具有系統性的特殊構造，產生有效率且多變的螢光及閃爍模式。螢光在螢火蟲之間最主要的功能是溝通，透過螢光閃爍的變化形成特有的通訊系統（Flash Communication Systems）。目前累積研究了日本的45種螢火蟲，觀察螢光閃爍在雄蟲和雌蟲交尾時所扮演的角色（Ohba, 2004），這些各有不同的通訊模式可分為6類：

- I. HP system：雄蟲發出單一而短促的螢光，雌蟲延遲一段時間——大約0.24秒後才發出螢光，回應雄蟲作為答應交尾的訊號，兩者相遇之後雌蟲閃爍頻率變快，幾乎與雄蟲同步，再進行交配。這類型的螢火蟲——例如

Hotaria parvula，雌蟲只會交配一次，交配過後不再對雄蟲的信號產生反應，因此雌蟲的回應不僅是告知雄蟲自己的位置，也宣告尚未交配的訊息。



圖十、雄蟲（*Luciola lateralis*）從飛行到接近雌蟲的閃爍模式變化。1-3是飛行時，4-6是接近雌蟲後。紀錄時間為4秒。當距離越來越近，雄蟲的螢光閃爍越來越急促，在螢光尚未暗下的期間就發生數次的閃爍。（Ohba, 2004）

II. LL system：雄蟲飛行伴隨著發光，四處找尋雌蟲的特殊閃爍螢光，當雄蟲距離雌蟲5-10公分時，雄蟲會改變發光模式，從一明一暗的單一波變成一次發光期間產生數次閃爍，才完全暗下來，如此重複，藉由特殊的閃爍模式來辨認彼此，兩者持續閃爍直到完成交尾。這類的溝通系統較為簡單，雌蟲不需要回應雄蟲的訊號，只要各自發出特有的螢光閃爍作為同種的辨認。（Ohba, 2004）（圖十）

III. Complex system：雄蟲飛行並發出較長的螢光閃爍，同性群體之間會同步發光的頻率，雌蟲無飛行能力，不會與雄蟲同步而發出不規律的螢光，因此雄蟲可以很容易的分辨出雌蟲，發現雌蟲後，雄蟲的發光頻率變得複雜多變，不再與其它雄蟲同步。

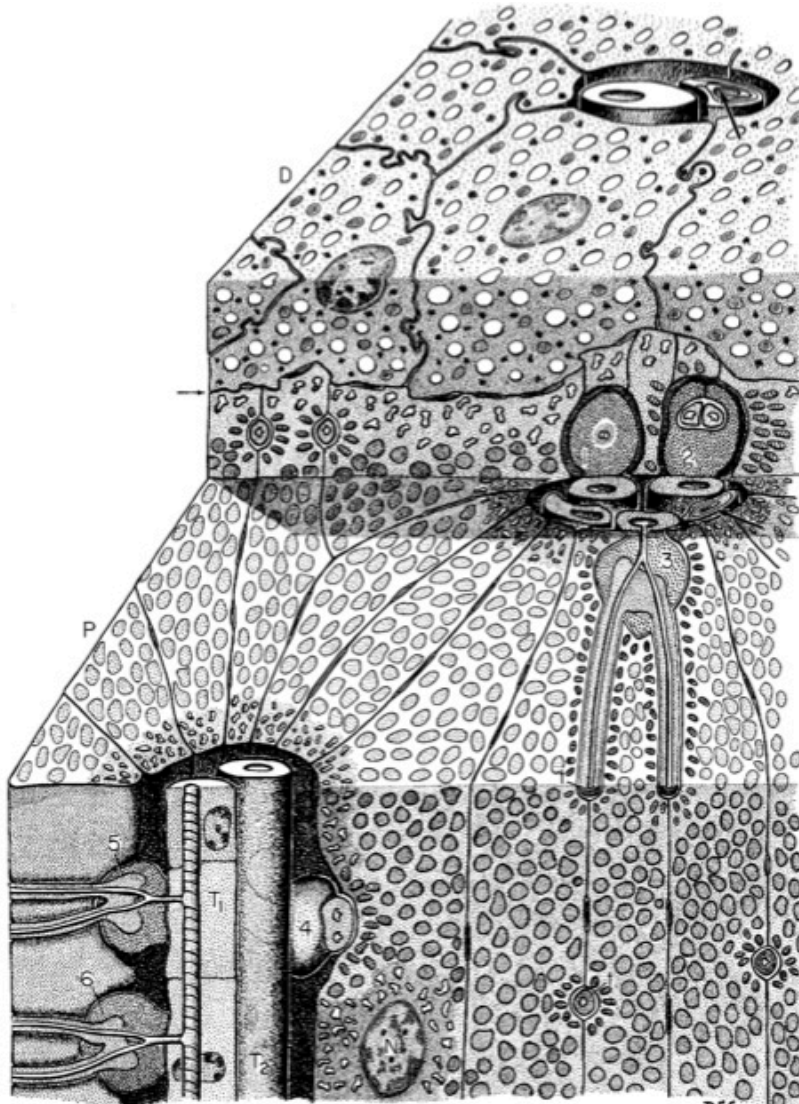
IV. PR system：雄蟲受到雌蟲持續的螢光所吸引，雄蟲靠近之後，辨識雌蟲特殊的發光器形狀和雌蟲釋出的費洛蒙，再進行交配。

V. Modified PR system：缺乏或只有微弱發光能力的螢火蟲，雄蟲和雌蟲在白天配對，利用費洛蒙來促成交配。只有在草地裡或樹蔭下等暗處的地方，才發出微弱的螢光來輔助同類的溝通。

VI. CR system：完全無發光能力的日行性螢火蟲，螢光閃爍對於異性交流毫無作用，儘利用費洛蒙的化學訊息來交配。

多樣化發展的閃爍模式，和螢火蟲的視力有緊密的關係，在第一類 HP system、最複雜的溝通模式中的螢火蟲種類，具有最大尺寸的複眼，讓雄蟲在飛行的時候清楚辨識雌蟲的回應，而雌蟲也能準確的控制回應訊號的時間。視力和閃爍模式的相輔相成，造就出螢火蟲的專屬語言。（Ohba, 2004）

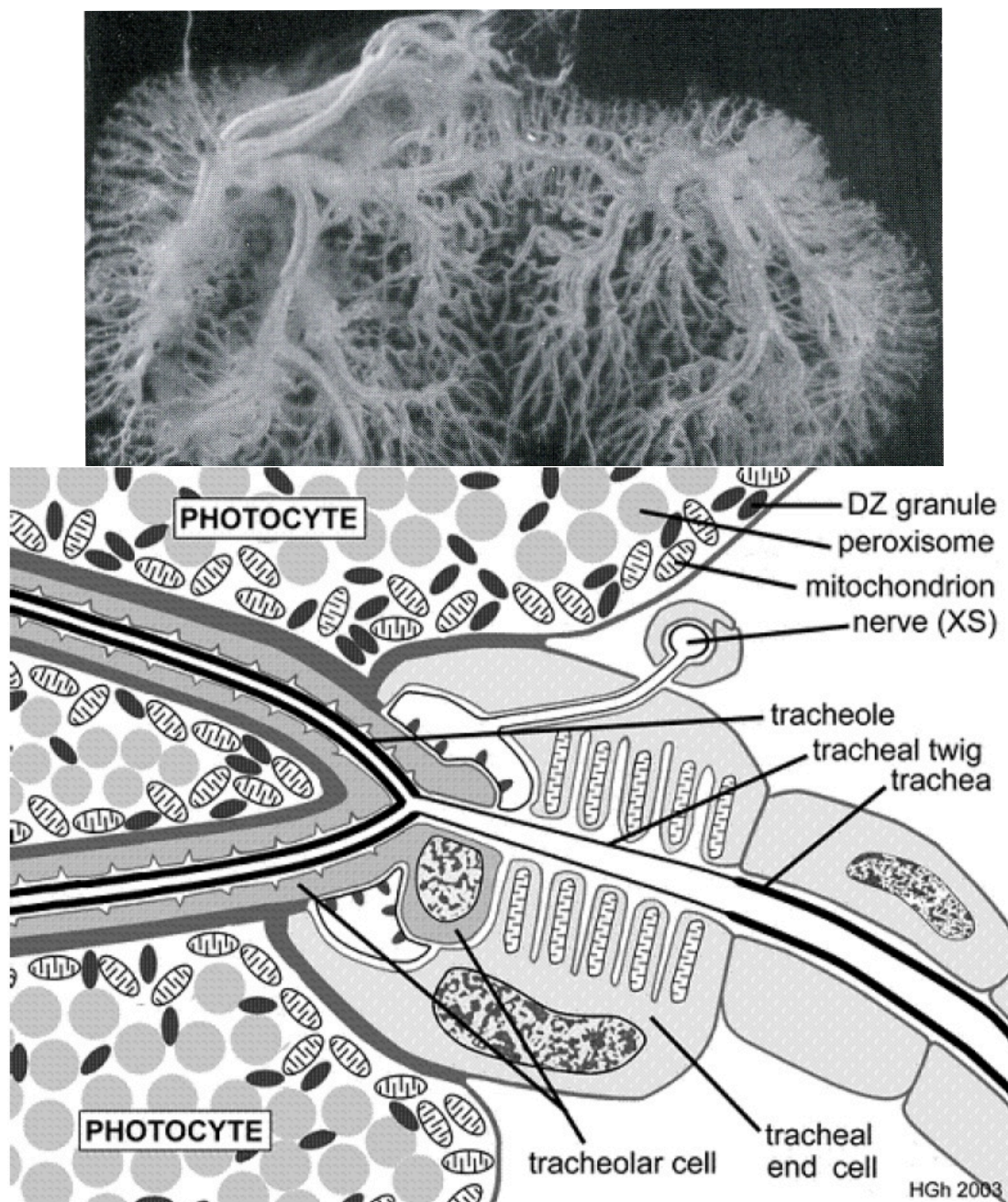
科學家認為藉由瞭解發光器的生理構造，能夠釐清螢火蟲是如何調控螢光閃爍。詳盡的顯微構造在1858年，德國科學家R. A. Kolliker指出螢火蟲發光器由兩層不同組織構成，一為發光層（photogenic layer），二為反光層（reflecting layer）。Kolliker利用化學染色方法，初步得出反光層含有許多尿酸鹽類（Harvey, 1980）。許多科學家認為大量的尿酸鹽類是為了反射螢光，讓螢火蟲的螢光看起來更亮，因而命名為反光層（Buck, 1948; Beams & Anderson, 1955; Kluss, 1958; Smith, 1963）。



圖十一、發光層與反光層交界（*Photuris pennsylvanica*），顯示了兩層細胞的相對位置和構造差異。無論是在細胞形態、排列以及氣管分布都有極大的不同，可推論兩者的功能必定有差異。P：發光層，發光細胞以氣管為中心形成放射狀的排列，富含大量的發光顆粒（又稱過氧化體，peroxisome），在細胞內部接近氣管的區域有著高密度的粒線體。D：反光層，此區的細胞排列鬆散，除了細胞核之外，僅有粒線體和圓形微粒散佈在胞質中（Smith, 1963）。

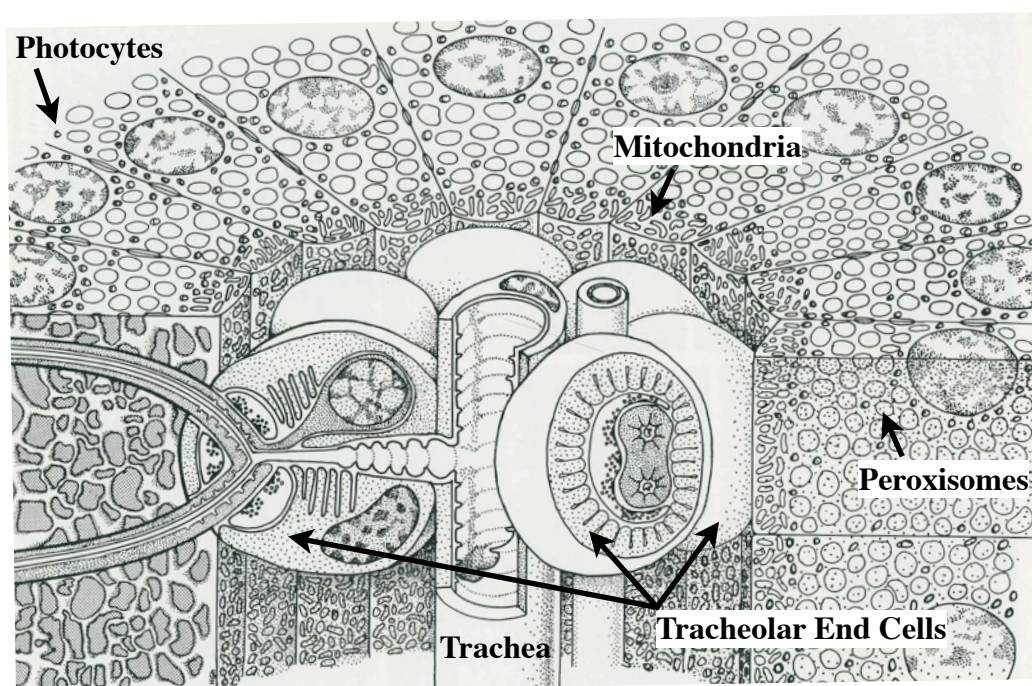
1933年，電子顯微鏡問世，將顯微鏡可觀察的維度又往前推了一大步，讓科學家可以觀察生物體內的細微構造。對於螢火蟲的研究，分為兩個大方向：發光器的構造，以及螢光閃爍的生理調控（Lund, 1911）。Buck依據氣管在發光器中分布的差異，把螢火蟲發光器的形態分為六個種類（Buck, 1948）。Smith對*Photuris*屬的螢火蟲發光器做了鉅細靡遺的顯微觀察（圖十

一)，藉由構造來了解發光機制的運作。他發現螢火蟲發光器裡密佈著許多氣管，粗大的氣管沿著反光層進入至發光層之後，分支成許多細小的氣管，緊鄰著每個發光細胞，最末端的氣管管壁甚至只有一個細胞的厚度（Smith, 1963）。1976年Hanna等人觀察到發光細胞沿著中心的氣管呈放射狀排列，細



圖十二、浸泡KOH後，分離出來的氣管系統（上），末端的分枝非常密集且細小（Ghiradella, 1998）。氣管末端細胞（Tracheolar end cell, TEC）的位置（下），TEC是特化的表皮細胞，含有突觸與神經中樞連結。氣管分支成更細小的氣管，往發光細胞之間延伸，在發光細胞與氣管鄰近的外圍區域，聚集著大量的粒線體，內部則有過氧化體，是螢光反應的發生處（Ghiradella & Schmidt, 2004）。

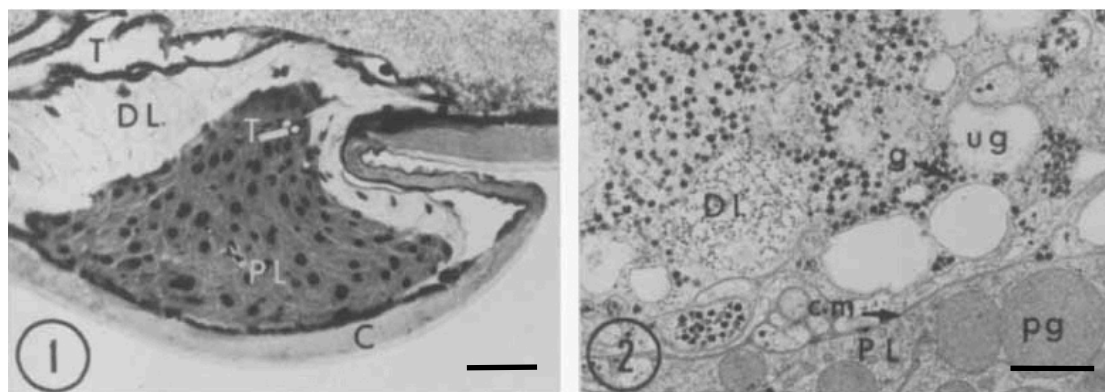
胞周圍環繞著密集的小氣管（Hanna *et al.*, 1976）。從1977年開始，Ghiradella對發光器異常密集的氣管做了系列研究（Ghiradella 1977, 1983, 1998; Ghiradella & Schmidt, 2004），發現在小氣管要分支到發光細胞周圍之前，有特化的細胞與發光細胞相接，即為氣管末端細胞（Tracheolar end cell，TEC），氣管末端細胞內部有突觸，是發光器唯一和神經中樞的連結，而發光細胞外圍與小氣管鄰近的地方佈滿了粒線體，細胞內部則充滿著發光顆粒（photogenic granule），因為顆粒含有發光素和發光酵素，也被稱為過氧化體（peroxisome）（Ghiradella, 1998; Ghiradella & Schmidt, 2004）（圖十二）。



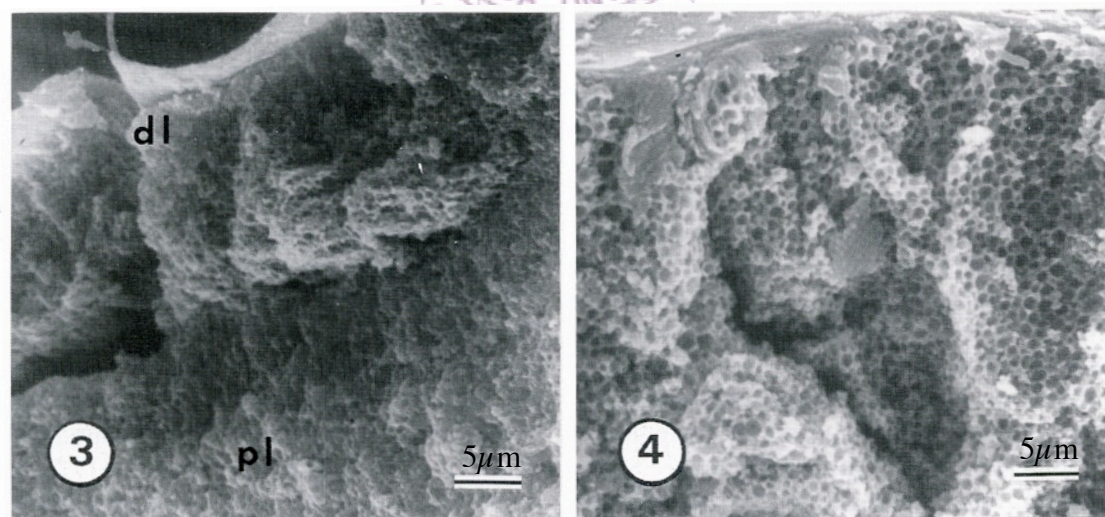
圖十三、氣管末端細胞與周圍的組織。*Photuris*屬成年雄蟲的發光細胞以氣管為中心，排列組成一個柱狀單元。氣管末端細胞內部有神經突觸，使發光器和神經中樞產生聯繫；發光細胞中靠近氣管的區域聚集著粒線體，而遠離氣管的區域遍佈過氧化體，氧氣透過氣管，先通過發光細胞的粒線體區域，最後才進入過氧化體參與發光反應。（Ghiradella, 1998）

Ghiradella推論粒線體密集之區域可作為氧氣的閥門（Ghiradella, 1977; Ghiradella & Schmidt, 2004）。2001年，Trimmer等人發現：有氧氣但沒有一氧化氮的情況下，螢火蟲不能產生發光反應，只有氧氣和一氧化氮兩者同時存在，發光器才會有螢光產生。然而，一氧化氮是螢火蟲神經中樞神經傳導物

質，加上氣管末端細胞和發光細胞的結構關係（圖十三），Trimmer推論一氧化氮抑制發光細胞內部粒線體的用氧量，使得從氣管進入的氧氣能夠到達發光細胞的過氧化體，觸發螢光反應。（Trimmer *et al.*, 2001）



圖十四、左圖為螢火蟲幼蟲的發光器剖面圖（*Photuris*屬）：杯狀的反光細胞層（DL）包覆著錐狀的發光細胞層（PL），反光層上方有粗大的氣管（T）；發光層貼近腹面表皮（C），細胞之間顯露出細小的氣管切面（T），比例尺0.5 μ m。右圖為反光層和發光層細胞的接界處（cm）：反光層含有豐富的肝糖（g）以及空掉的尿酸鹽顆粒（ug）；發光層內含密集的發光細胞顆粒（pg），和成蟲相似，比例尺1 μ m。（Peterson, 1970）



圖十五、以掃描電子顯微鏡（SEM）觀察螢火蟲幼蟲的發光器。左為反光層和發光層的交界，dl：反光層；pl：發光層。右為反光層，細胞中有許多圓形的空腔，於樣品前處理的過程中被破壞。（*Photuris*屬）（Ghiradella, 1998）

幼蟲的發光器形態只在少數文獻有較為詳盡的介紹，Peterson指出美洲的*Photuris*屬螢火蟲幼蟲的發光器（圖十四），缺乏特化的氣管末端細胞，無法精確調控螢光閃爍，而且發光細胞的排列散亂，無法有效率的連結氣管，使得氧氣傳送的速率較成蟲低（Peterson, 1970）。研究螢火蟲逾三十年的Ghiradella博士整理了*Photuris*屬的發光器，在幼蟲和成蟲之間的差異：在幼蟲的發光細胞中，粒線體和發光顆粒散佈在細胞質（圖十五）；成蟲的粒線體和發光顆粒，則是位在發光細胞的特定區域，與氣管的位置有關。除此之外，成蟲特有的氣管末端細胞也未出現在幼蟲發光器中，因此幼蟲的發光細胞沒有直接與神經形成聯繫（Ghiradella, 1998）。

1.4. 台灣的螢火蟲

在台灣一年四季都可見到不同種類的螢火蟲，截至目前已發現62種（兩科，十四屬）（高屏地區賞螢手冊, 2007）。螢火蟲依幼蟲的生活型態可分為陸生、半水生及水生三種。陸生種類數量最多，台灣各地都有分布；半水生的螢火蟲在台灣只有一種，為鹿野氏黑脈螢（*Pristolycus kanoi*），棲地在中、北部山區；而台灣的水生螢火蟲有黃緣螢（*Luciola ficta*）、黃胸黑翅螢（*Luciola hydrophila*）及條背螢（*Luciola substriata*）三種，因為棲地水質要求較高，個體數量遠不及陸生種類。陸生螢火蟲生活在潮濕的泥地或草叢中，捕食蝸牛或蚯蚓，利用體側的氣孔呼吸，體型最大，山窗螢（*Pyrocoelia praetexta*）的雌幼蟲體長可達8公分。半水生的鹿野氏脈翅螢棲息在潮濕的山壁上，獵捕水中的螺類，將獵物拖到岸上才進食。水生螢火蟲生活在乾淨的水域中，體側有特化的氣管腮讓牠們可以在水裡呼吸，食物來源為螺類，有和同類分食的習性，幼蟲到末齡會爬上陸地，在泥地或石縫中渡過蛹期。

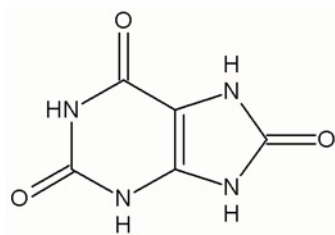
一年當中，觀察到大量成群螢火蟲出現的時段，可以分為兩季：第一季為三到五月，以黑翅螢（*Luciola cerata*）和台灣窗螢（*Pyrocoelia analis*）最為常見，其他還有紅胸黑翅螢（*Luciola kagiana*）、端黑螢（*Luciola praeusta*）、條背螢和黃緣螢等等，種類繁多，個體數也最多；第二季為十到

十二月，則是窗螢屬（*Pyrocoelia*）和短角窗螢屬（*Diaphanes*）的螢火蟲最活躍，體型比熠螢屬（*Luciola*）大，螢光更為亮眼，如山窗螢和橙螢（*Diaphanes citrinus*）等，在中、高海拔山區，還可發現雪螢（*Diaphanes niveus*）、神木螢（*Diaphanes nubilus*）這些數量稀少的螢火蟲。

1.5. 黑翅螢的生活史

黑翅螢隸屬於螢科（*Lampyridae*）熠螢亞科的熠螢屬（*Luciola*）（陳燦榮，2002），熠螢屬的成蟲有特定的閃爍模式與同類溝通的行為，故而得名，是螢科種類及個體數量最多的一屬，幼蟲為肉食性。黑翅螢的生命週期大約是一年，主要棲息在海拔1500公尺以下的地區，每個生長階段都會發螢光。成蟲的外觀特徵為頭部有一部份覆蓋在橘黃色的前胸背板下方，翅鞘黑色，體長約1公分，雄蟲和雌蟲外型相似，均有完整翅膀，雌蟲體型比雄蟲略大一些。雄蟲具兩節發光器，腹部除了末端的乳白色發光器，其他體節呈現黑色，而雌蟲的發光器退化縮小，僅剩一節，除了發光器之外腹部呈橘黑混色。蟲卵呈淡黃色，約二至三週孵化，大部分時間是幼蟲階段，依環境變化和食物充足與否，幼蟲會經歷四到五次蛻皮，蛻一次皮便多一個齡期，終齡幼蟲在化蛹前有一段前蛹期，幼蟲會將自己包覆在土繭中，牠們蜷曲著身體，不進食也不動，約一週後化蛹。蟲蛹在受到刺激的狀態下會發出淡淡的螢光，經過二至三週，半透明的蛹體色會漸漸轉黑，最後化成閃爍飛舞的成蟲，在每年的三至五月為成蟲大量出現的時間，數量非常壯觀（陳燦榮，2003）。

春末夏初，剛日落的兩個小時，是黑翅螢成蟲活動最旺盛的時候，雄蟲在夜空中高調地閃爍飛舞著，而雌蟲停在路旁的草叢裡，雄蟲利用閃爍的螢光來吸引雌蟲交配，交配完的雄蟲將會死去，雌蟲把卵產在潮濕的泥土之後，也會結束牠的一生。



圖十六、 Uric acid的化學結構

1.6. 尿酸與昆蟲的關係

尿酸 (uric acid) 分子式 $C_5H_4N_4O_3$ (圖十六)，分子量為168，是嘌呤 (purine) 代謝後產生的含氮廢物，也是昆蟲的排泄廢物之一，幾乎不溶於水，因此容易形成結晶，以乾燥的固體形式排出昆蟲體外，如此一來能減少水分的散失，避免影響體內的水分平衡 (Klowden, 2007)。

除了做為氮排泄的媒介，有些昆蟲會廢物利用，將尿酸轉做其他用途。有些種類的蟑螂會把尿酸沈積在脂肪體 (fat body) 的特化的尿酸鹽細胞 (urate cells)，含量甚至達到體重的10%，在飲食缺乏的時候再度利用 (Ehresmann, 1990)。另一種雄蟑螂，會儲存佔體重5%的尿酸在副腺 (accessory gland) 中，再吸收到精囊中，與雌蟑螂交配後，雌蟑螂再利用尿酸，做為卵囊和蛋的氮元素來源 (Roth & Dateo, 1965)。有些鱗翅目 (Lepidoptera) 的蛾類在蛹期中無法正常的進行氮的排泄，這段期間便從排泄尿酸轉為儲存尿酸在脂肪體，然後羽化之前，儲存的尿酸會轉移到直腸，以便快速的排放出來 (Klowden, 2007)。金龜子 (scarab beetle) 的表皮細胞沈積了許多尿酸，當光線照射到特殊構造的表皮，呈現出虹彩般的色澤。 (Hegedüs, 2006)

第二章

2. 實驗材料與方法

2.1. 材料

每年四至五月間，在苗栗獅頭山的山區道路旁，有成群的螢火蟲成蟲在夜空中飛舞，採集到的螢火蟲大多數為黑翅螢、少數有紅胸黑翅螢、黃綠螢。黑翅螢體長約1公分，雄蟲具兩節發光器，雌蟲只有一節。十二月至翌年一月，同一地點的潮濕岩壁上，可發現黑翅螢的幼蟲，在黑暗中可看見微弱的黃綠光，但是一受驚嚇就不發光，採集時需避免用光或聲音刺激幼蟲。幼蟲體色為全黑，在前胸背板的左右兩側帶著兩塊淡橘色的花紋，發光器位於第八腹節的兩邊體側，發光時呈現左右兩個亮點，由外型難以分辨性別。五至六齡的幼蟲，體長約1.2-1.5公分。採集到的幼蟲於實驗室人工飼養，在乾淨的容器鋪上潮濕的棉花，餵食幼蟲螞蟥或小昆蟲，置於通風和陰暗的環境，定期清理及更換棉花。飼養的幼蟲有一隻化為蟲蛹。

2.2. 實驗方法

2.2.1. 掃描式電子顯微鏡

樣品觀察前處理：

將25% 戊二醛（glutaraldehyde）、16%甲醛（para-formaldehyde）和磷酸緩衝溶液（phosphate buffer saline, PBS, 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄、0.27g KH₂PO₄，調整pH值到7.4，加ddH₂O使總體積為1公升），稀釋混合成2.5% 戊二醛和4% 甲醛的固定液。切下雄的黑翅螢成蟲含發光器的體節，浸泡於配置好的混合固定液中一小時。用PBS清洗殘留的固定液，兩次各5分鐘。2%四氧化銨（Osmium tetroxide）固定一小時，穩固組織的膜構

造，此時組織呈現黑色。用PBS清洗殘留的固定液，三次各5分鐘。在濃度20%、30%、50%、70%、80%、95%和100%（兩次）的酒精中序列脫水，各30分鐘。100%丙酮脫水30分鐘，共兩次。最後，用臨界點乾燥（Critical Point Drying）做最後的脫水。

樣品前處理完畢，依想要觀察的剖面將發光器體節切開，牢固於樣品載台上，抽真空一個晚上，鍍上金顆粒之後，使用型號Hitachi S-4700（Type II）的掃描式電子顯微鏡（Scanning Electronic Microscope，SEM）觀察，。

氣管的觀察：

儘快分離出發光器後，浸泡在含有3%膠原蛋白酵素（collagenase）的溶液，3個小時，清除掉細胞之間的膠原蛋白，使細胞與氣管分離之後，再進行上述的樣品觀察前處理，但最後不經過臨界點乾燥，透過自然乾燥，再上機觀察。

2.2.2. 穿透式電子顯微鏡

（此部份為華子恩博士製作）

樣品一樣經過前處理後，浸潤在25%、50%、75%和100%（兩次）的Spurr's resin／100%酒精溶液中，每個濃度各浸泡30分鐘至一小時，最後將樣品放在模具中，注入100% Spurr's resin，直到液面淹過樣品，平放於攝氏70度烘箱中，聚合16小時。

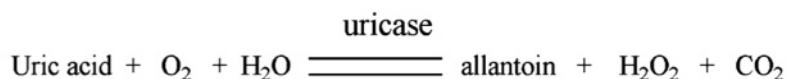
Spurr's resin的配方：（參照市售的說明書作微調）

Spurr's Resin	
NSA	13.0g
DER 736*	2.5-3.0g
ERL 4206	5.0g
DMAE	0.2g

*：控制樹脂硬度，量越多越軟。

將包含樣品組織的樹脂塊尖端，修成平整的梯形。利用超薄切片機切成厚度約40-60nm的薄片，用鍍有弗氏膜的銅網撈起後，待乾至少一個晚上，略過染色步驟，直接上機觀察，型號為Hitachi, H-7500的穿透式電子顯微鏡（Transmission Electron Microscope，TEM）。

2.2.3.發光器之尿酸含量及顆粒尺寸的分析



圖十七、尿酸和尿酸氧化酵素的反應式

市售的尿酸分析試劑（Uric acid assay kit），內含尿酸氧化酵素（uricase）以及uric acid probe，與尿酸反應後（圖十七），可用比色計測定吸光值（570nm），或是用微量盤分析儀來偵測螢光（Ex/Em=535/590nm），計算出樣品中的尿酸含量。把螢火蟲置於50°C的烘箱裡一個晚上，測量其乾重，取下發光器，加入去離子水作為Buffer磨碎，均勻搖晃之後，與尿酸分析試劑反應，於溫度37°C中，避光靜置30分鐘。反應完畢後，測量螢光強度，因為螢光強度和尿酸含量呈正比，對應標準點作圖，可計算出樣品中所含的尿酸。

用分析軟體Image J（版本1.43），分析電子顯微鏡拍攝的反光層，測量不同倍率下的尿酸顆粒直徑，對應比例尺的真實尺寸與螢幕像素比，計算出顆粒的實際直徑，共計算69-100個顆粒，並計算單位面積的顆粒數量。

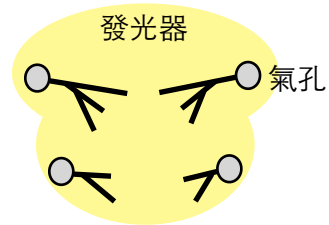
第三章

3. 實驗結果

3.1. 雄性成蟲發光器之電子顯微鏡觀察

發光器位於蟲體腹面的最後兩節（圖十九），緊貼著下表皮，用肉眼觀察是略帶黃色的乳白色。從此兩節的橫切面（圖二十）及縱切面（圖二十一、二十二）觀察到發光器，厚度約200 μm ，佔了腹部體節厚度的30%以上，結構非常緊密。發光器（圖二十三、三十二）從構造上的差異，可分為背層（Dorsal layer）和腹層（Ventral layer），從螢火蟲的腹部往內部延伸，依序為下表皮、腹層、背層、肌肉與其他臟器，以及背面表皮。氣管從背層延伸到腹層，腹層由許多發光細胞（photocytes）組成，發光反應便在此發生，因此腹層又稱為發光層（photogenic layer），發光細胞之間有著許多氣管的細小分支，以提供發光反應所需的大量氧氣。背層除了較為粗大的氣管之外，填滿了密密麻麻的圓形顆粒（圖二十四），為尿酸的球形結晶，大小非常均勻（圖二十五、三十二），顆粒外圍有單層膜的包覆（圖二十八、三十三、三十四），有些顆粒在樣品置備過程中脫落，僅剩下外圍包覆的膜（圖二十七）。從切開的顆粒可以觀察到，內部為實心構造，結晶呈輻射狀排列（圖二十六）。這些大小及結構都很均勻的尿酸結晶顆粒，佔了發光器一半以上的體積，將發光細胞產生的螢光往相同的方向集中反射，因此又稱為反光層（reflecting layer）。

去除掉最後兩節體節的細胞，留下密集的氣管，粗大的氣管從體側氣孔開始延伸，分支後延伸到發光器內部（圖二十九）。每節發光器在左右對稱的表皮位置各有一個氣孔（圖三十），共四個，氣管也分作四組，由不同的氣孔左右對稱的延伸分枝到發光器組織中（圖十八）。



圖十八、黑翅螢氣孔和氣管分布示意圖。



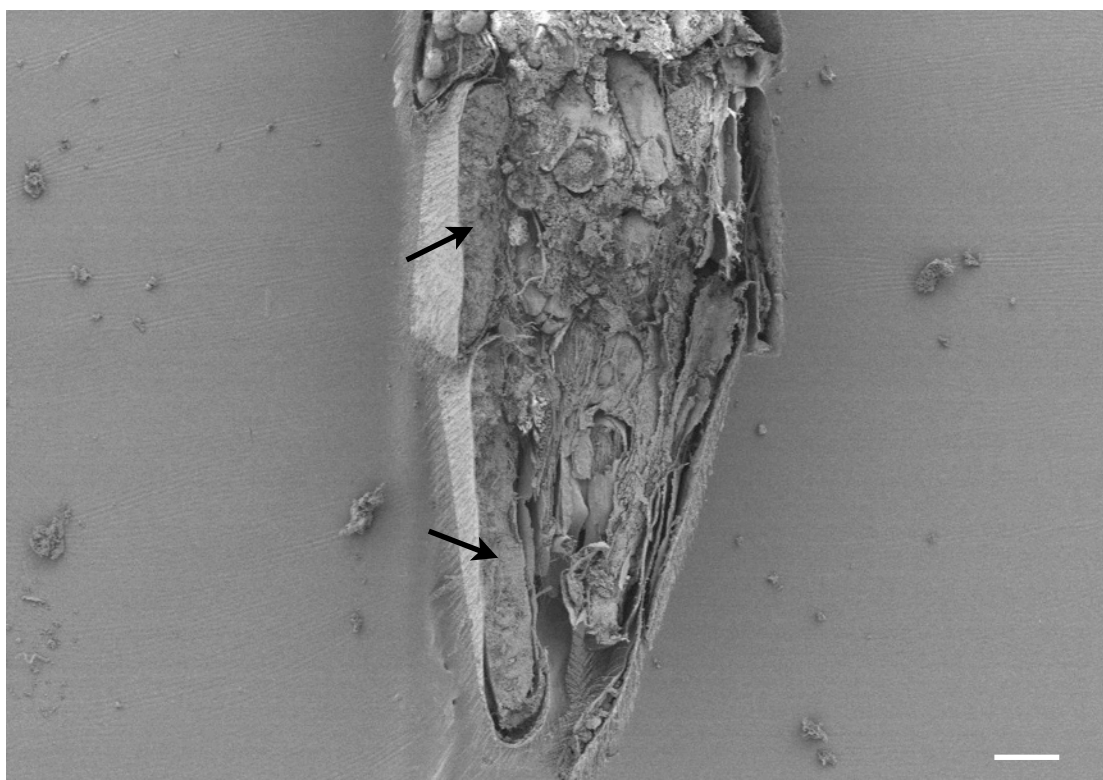
- 掃描式電子顯微鏡



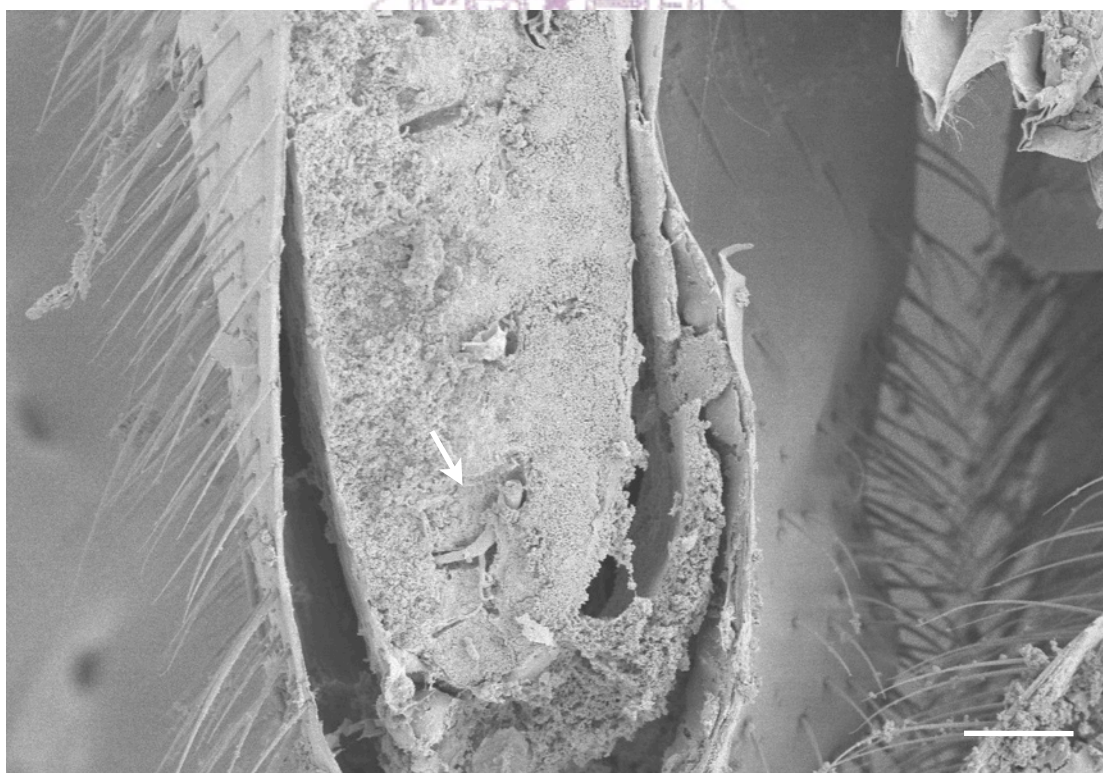
圖十九、黑翅螢雄性成蟲，乳白色的兩節區域為發光器。



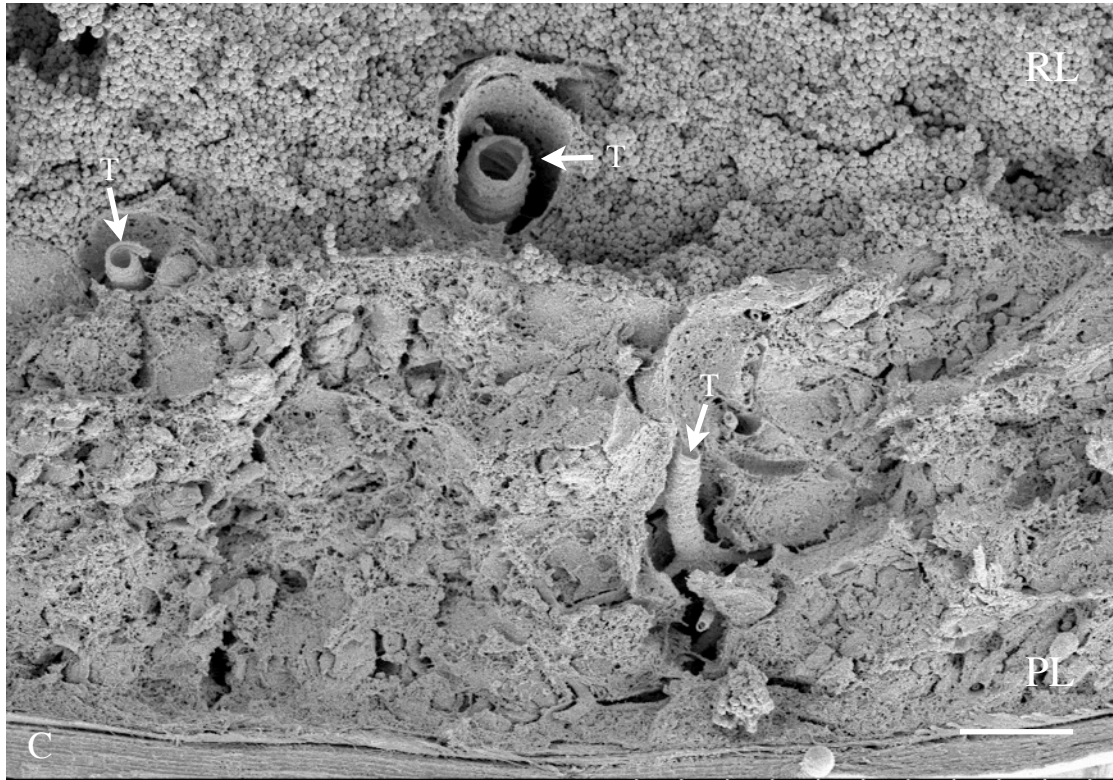
圖二十、黑翅螢雄蟲的橫切面（切面為圖二十之紅色虛線），白色箭頭之間為乳白色的發光器，黑色箭頭所指為腹部表皮，比例尺為 $200\mu\text{m}$ 。



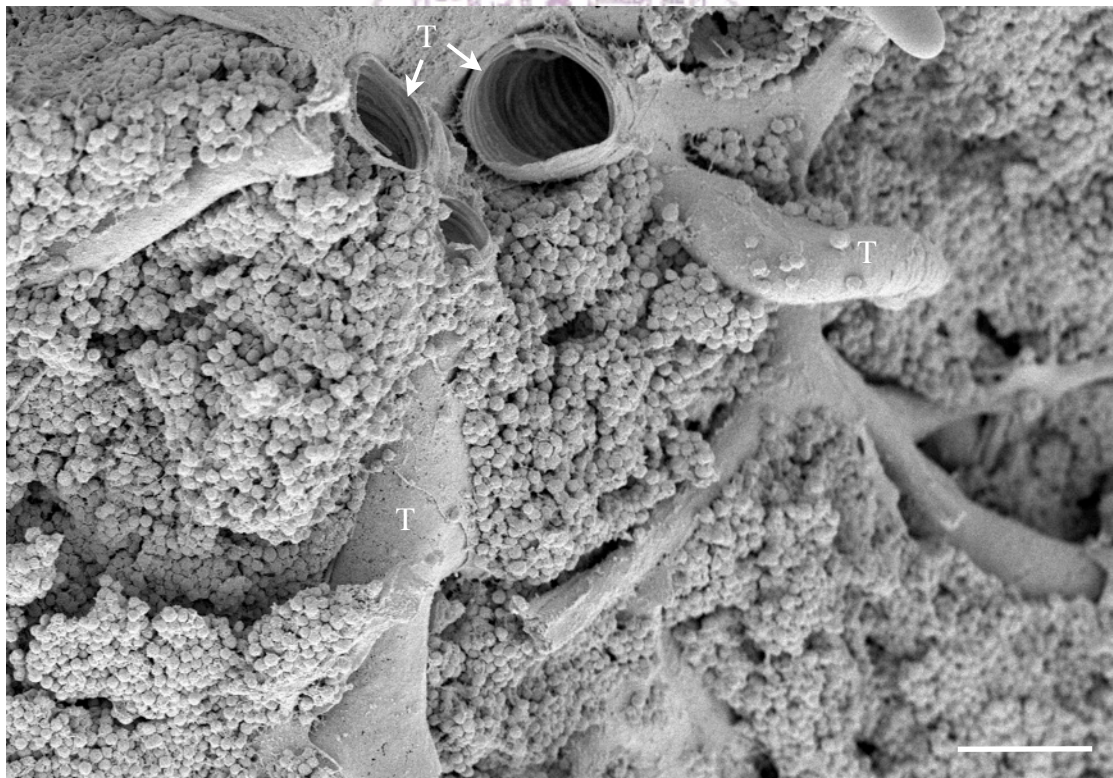
圖二十一、黑翅螢雄蟲腹部的縱切面，箭頭所指為兩節發光器，比例尺為 $200\mu\text{m}$ 。



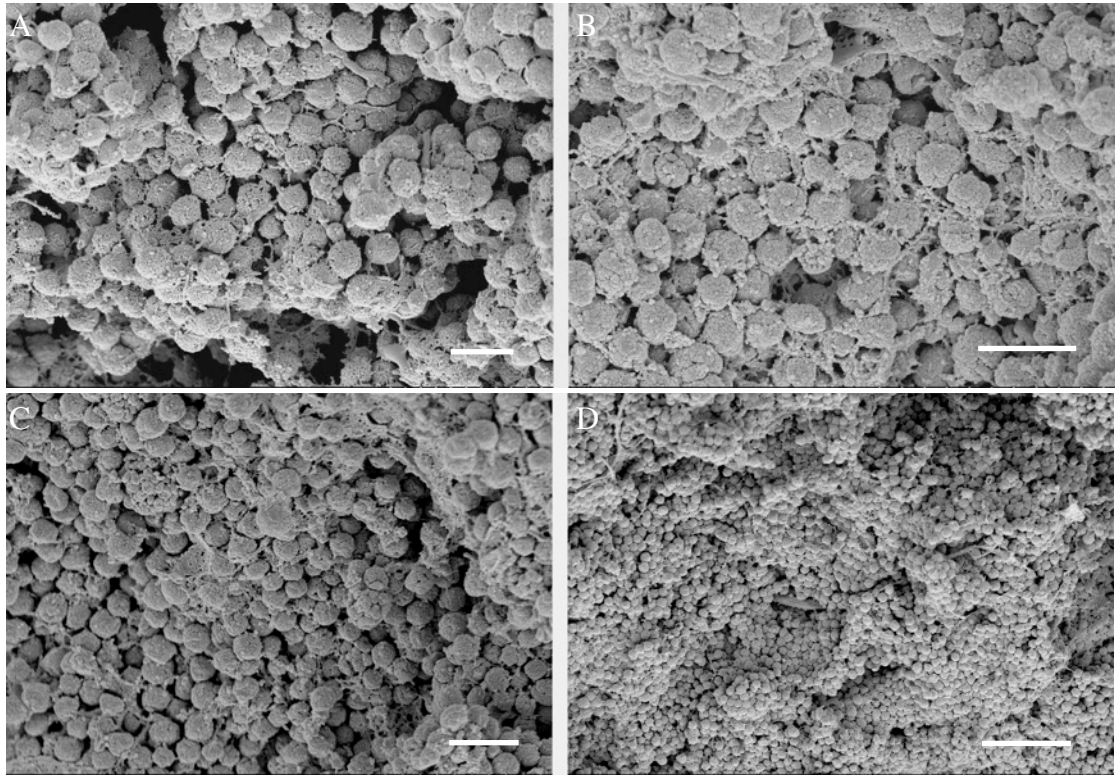
圖二十二、黑翅螢雄蟲發光器的縱切面放大圖，些許氣管裸露出來（箭頭處），比例尺為 $50\mu\text{m}$ 。



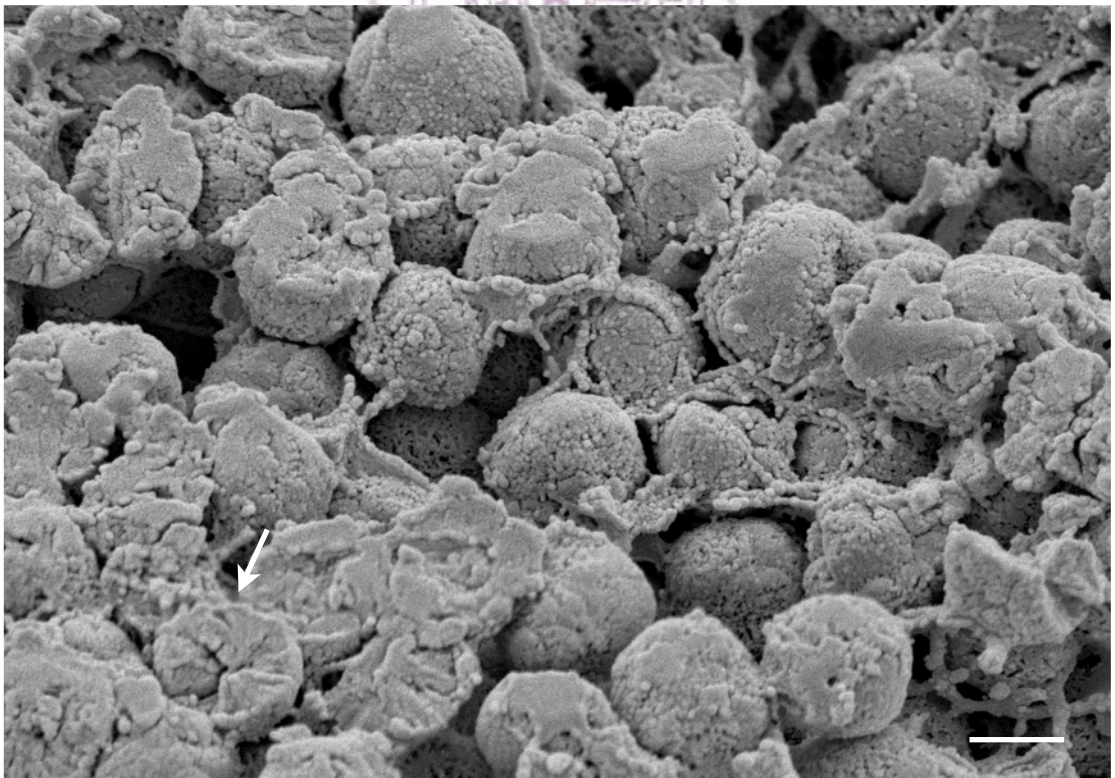
圖二十三、發光器橫切面，RL：反光層，PL：發光層，T：氣管，C：腹部表皮。比例尺為 $10\mu\text{m}$ 。反光層有較粗的氣管分布，組織中填滿大量的圓形顆粒；發光層則有較細且多的氣管分支。兩層結構的差異顯著，代表兩者功能也有所區隔。



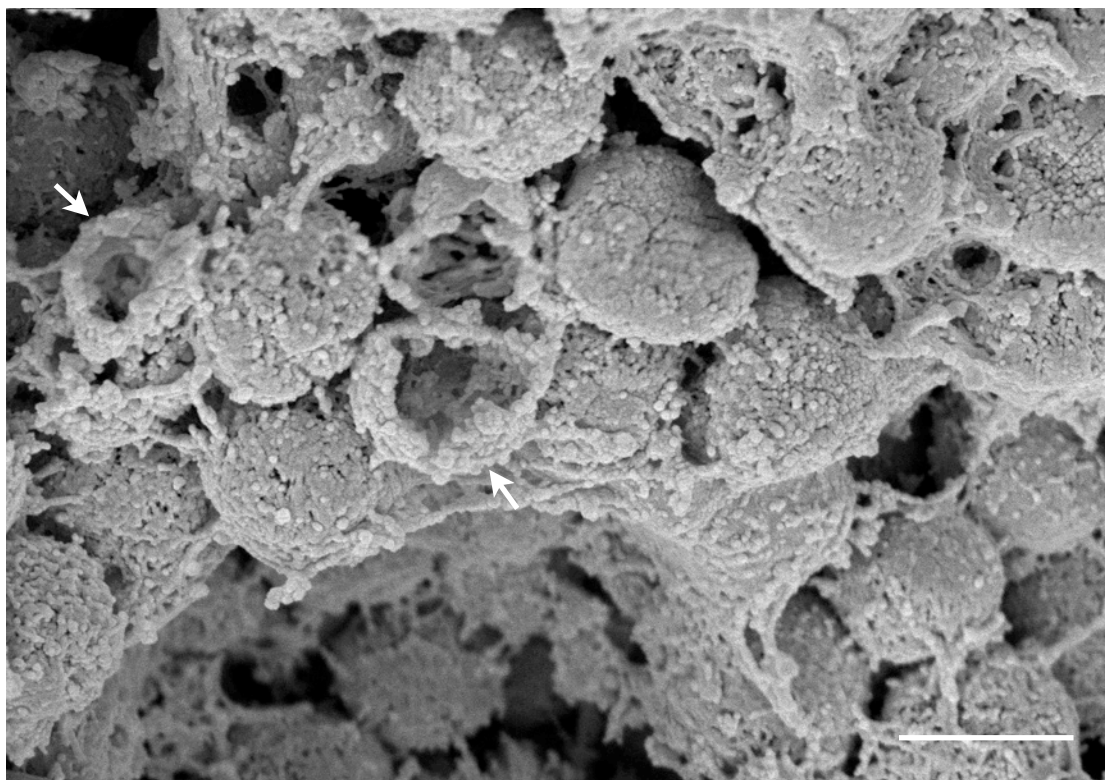
圖二十四、反光層的氣管（T）及尿酸顆粒。發光器富含密集的氣管，以提供發光所需的大量氧氣。比例尺為 $10\mu\text{m}$ 。



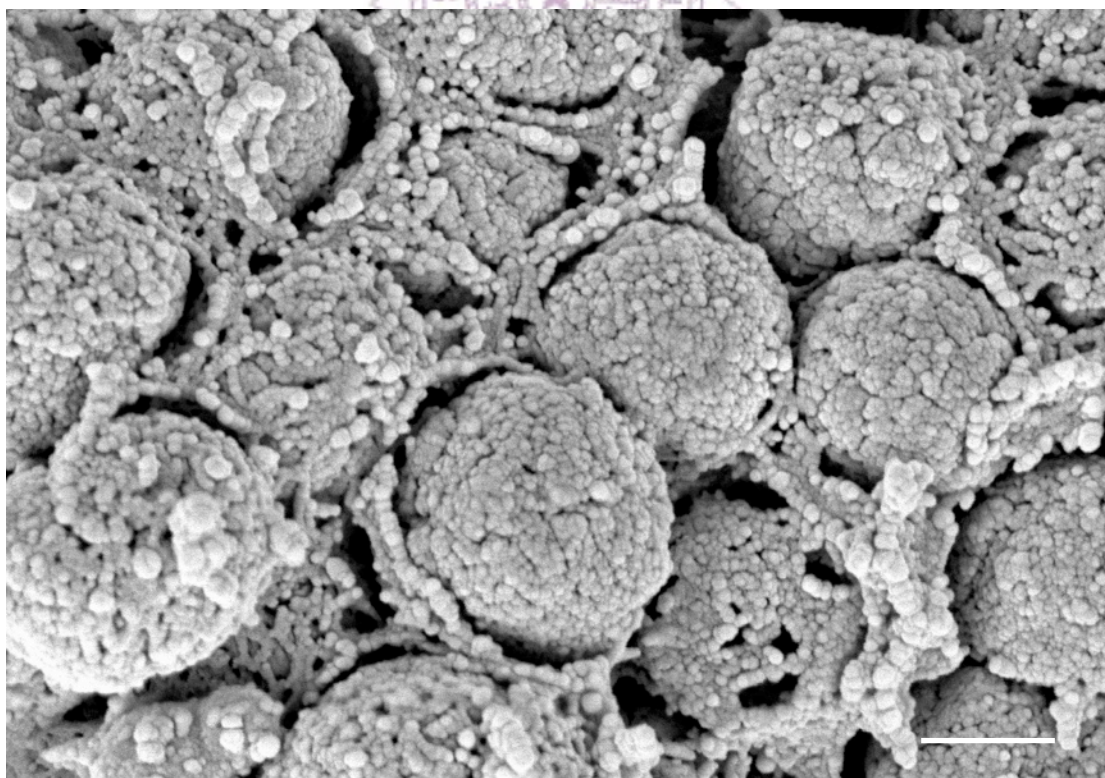
圖二十五、填滿反光層的尿酸顆粒，呈現大小均勻的球型。（比例尺分別為圖A、B和C：2 μ m；圖D：10 μ m。）



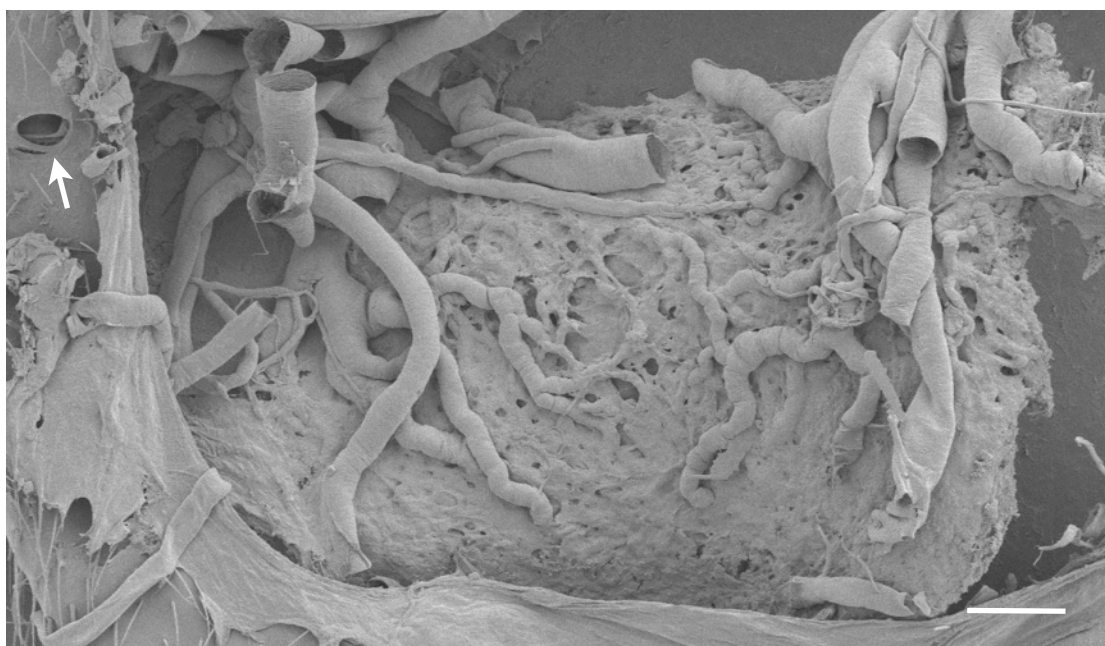
圖二十六、反光層中尿酸顆粒之剖面，內部呈輻射狀結晶。比例尺為1 μ m。



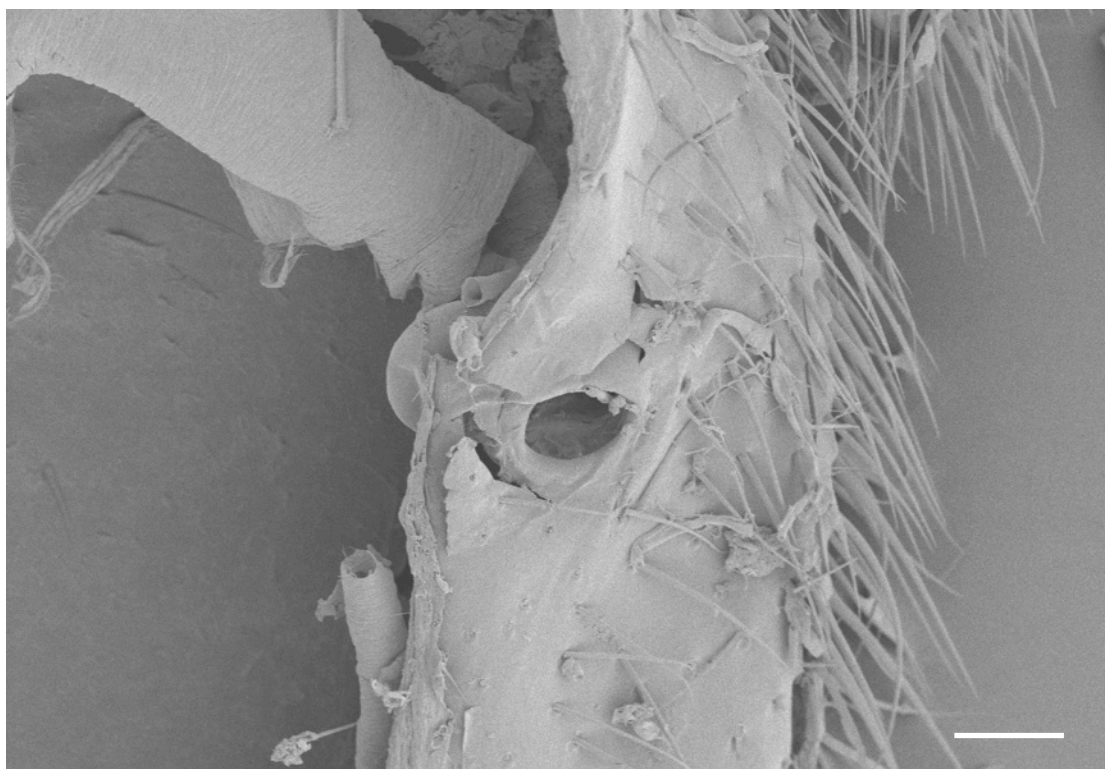
圖二十七、每個尿酸顆粒都包覆著單層膜，此為尿酸顆粒剝落後，遺留下的膜構造（箭頭處）。比例尺為 $1\mu\text{m}$ 。



圖二十八、尿酸顆粒排列緊密，外圍有單層膜包覆。比例尺為 500nm 。

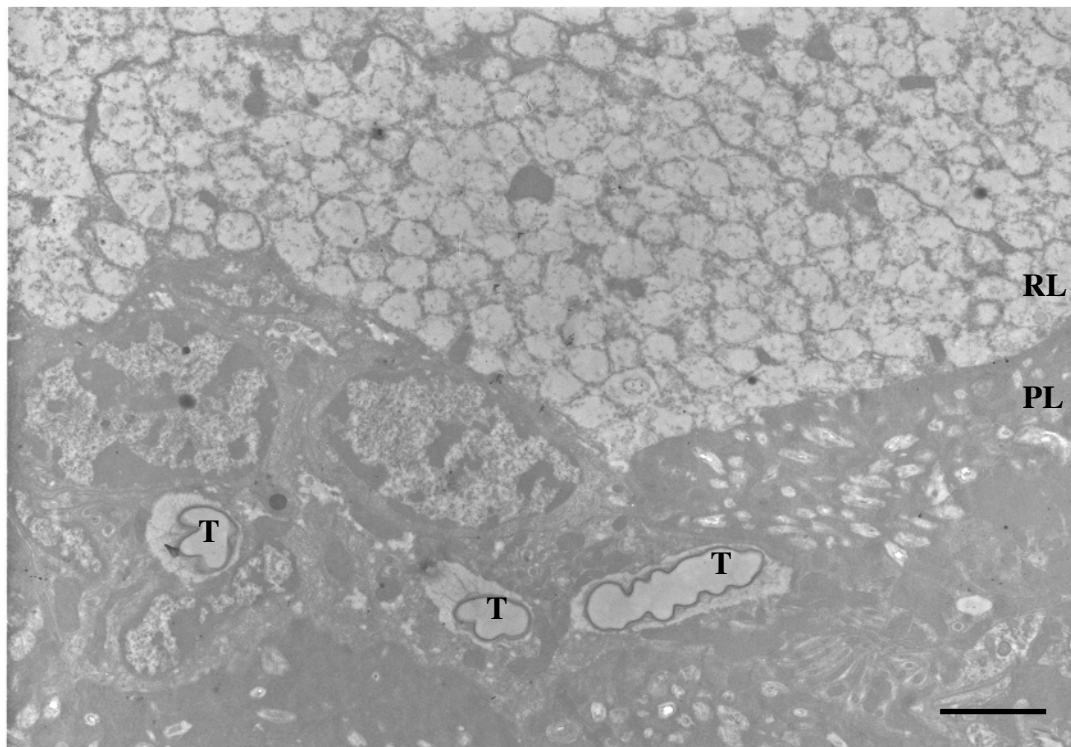


圖二十九、去除細胞所留下的氣管系統，左右對稱，箭頭處為表皮上的氣孔，開口約 $50\mu\text{m}$ 。比例尺為 $100\mu\text{m}$ 。

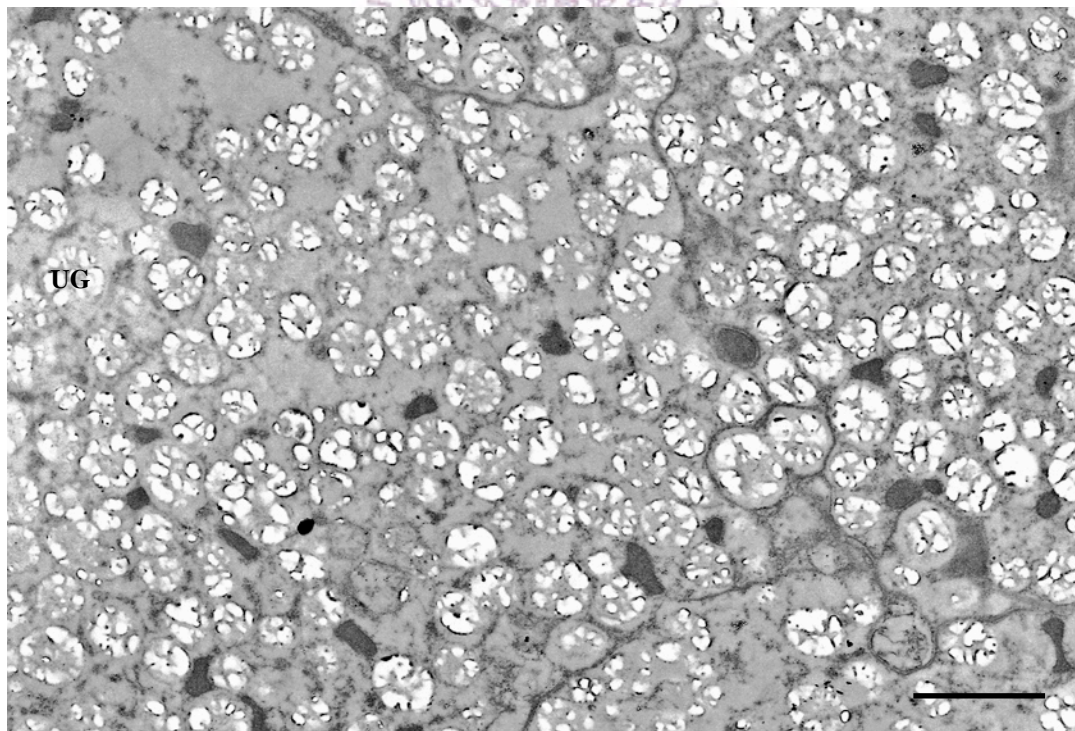


圖三十、表皮上的氣孔與連接的主氣管（連結處已剝落）。比例尺為 $50\mu\text{m}$ 。

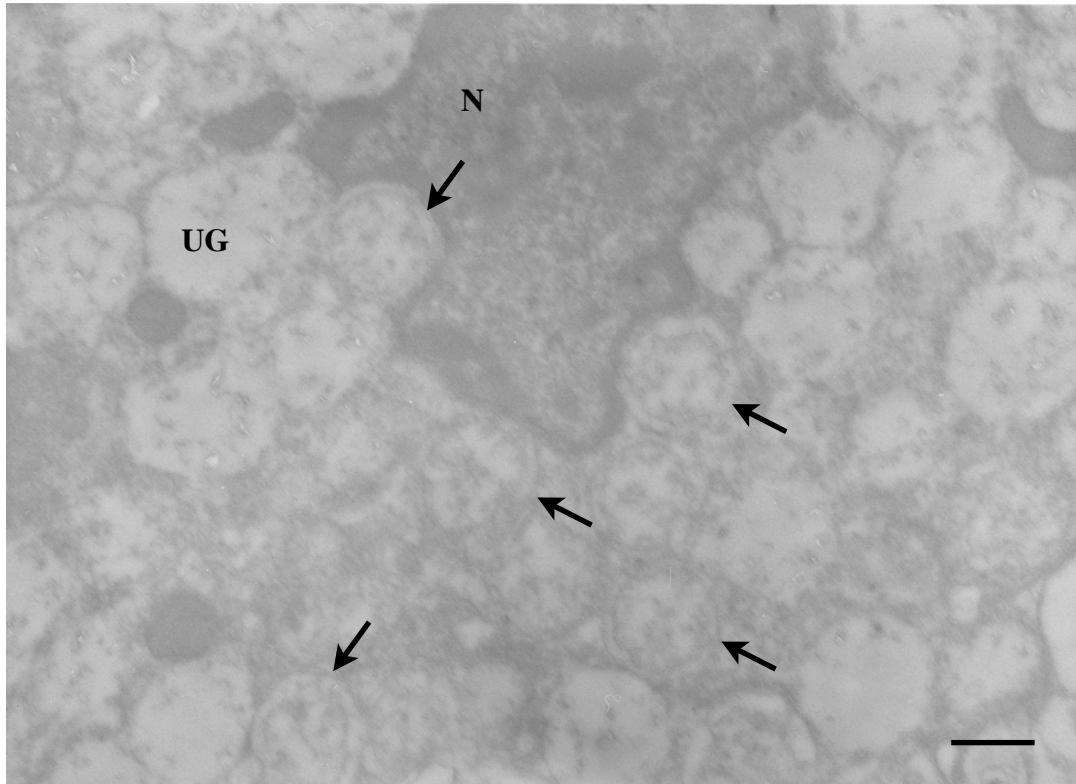
- 穿透式電子顯微鏡（此部份為華子恩博士拍攝）



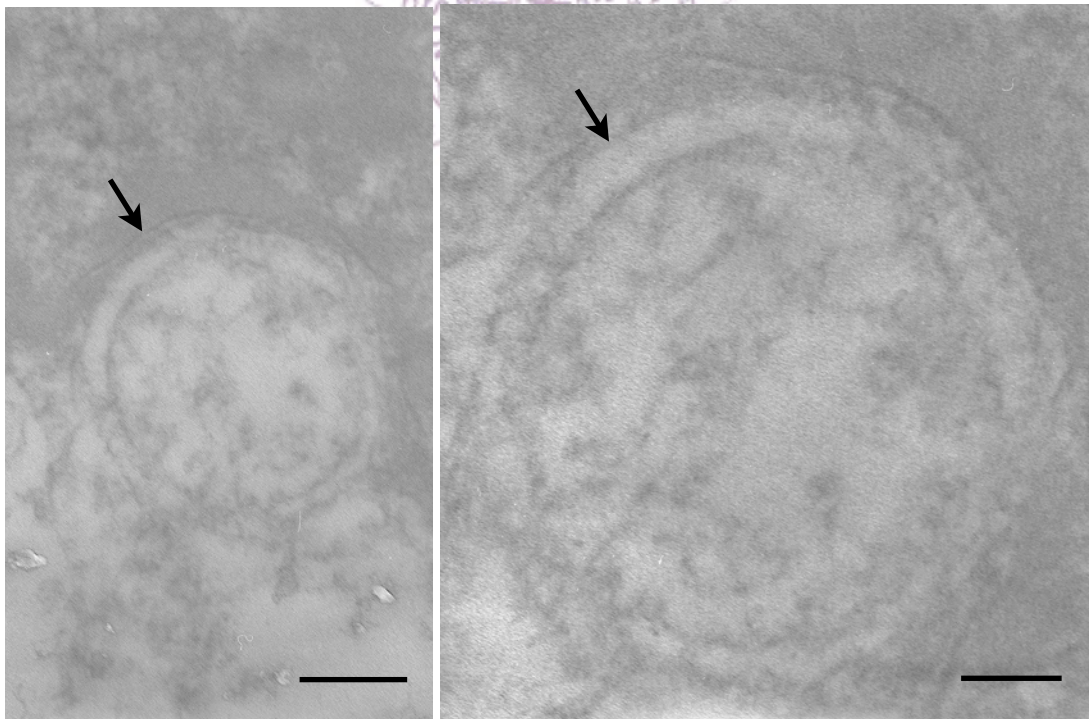
圖三十一、黑翅螢雄性成蟲的發光器。RL：反光層，PL：發光層，T：氣管，比例尺為 $2\mu\text{m}$ 。相較於發光層的成份，反光層由質量較低的尿酸組成，顏色較淡。在發光層中可以看到氣管內部的空腔。



圖三十二、發光器的反光層，UG：urate granules，尿酸顆粒，比例尺為 $2\mu\text{m}$ 。反光層佈滿尿酸顆粒，在切片過程中因為碰到水，產生些微溶解的狀況，使得尿酸顆粒內部出現不均勻的空洞。



圖三十三、發光器的反光層，UG：urate granules，尿酸顆粒；N：細胞核；比例尺為500nm。尿酸顆粒外圍有膜構造包覆（箭頭處）。



圖三十四、反光層的尿酸顆粒。左圖比例尺為500nm，右圖為120nm。尿酸顆粒外圍有膜構造包覆（箭頭處）。

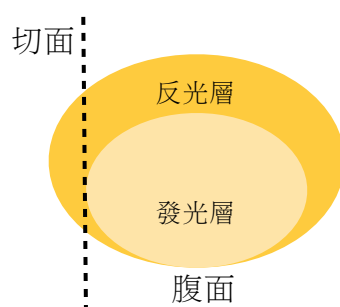
3.2. 幼蟲之發光器之電子顯微鏡觀察

位於倒數第二體節的兩側，左右對稱的位置上（圖三十八），各有一圓形小點為發光器（發光時較明顯），此體節的腹面表皮顏色較淡，白色帶半透明（圖三十六）。



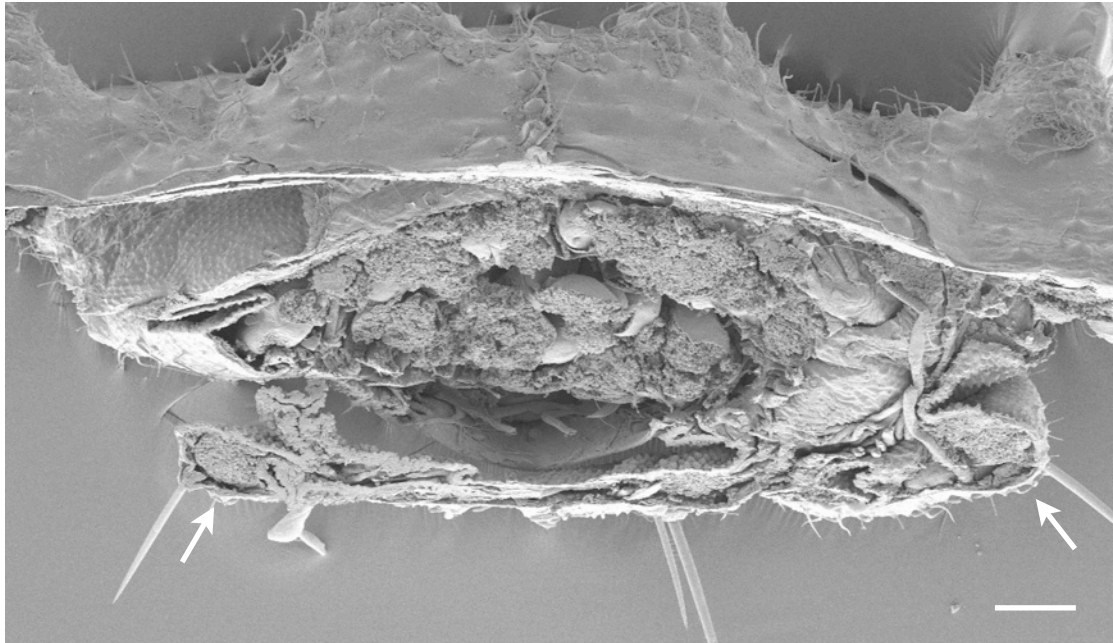
圖三十五、黑翅螢幼蟲。左圖：五齡幼蟲，展開體長約1.2公分，頭覆蓋在前胸背板下方，幼蟲的前胸背板兩側帶有橘黃色斑紋；右圖：幼蟲的倒數第二體節腹面，體色較其他體較淡，左右兩側各有一個發光器，從外型觀察並不明顯（箭頭處）。比例尺為1mm。

從發光器橫切面看不到兩層結構不同的組織（圖三十九），表示幼蟲的發光層和反光層並非整齊的上下交疊，根據文獻和剖面圖，反光層可能像是杯狀地覆蓋在發光層外圍，導致橫切時只有露出反光層（圖四十）。但以上只是初步推論，仍需要更多證據來證實。

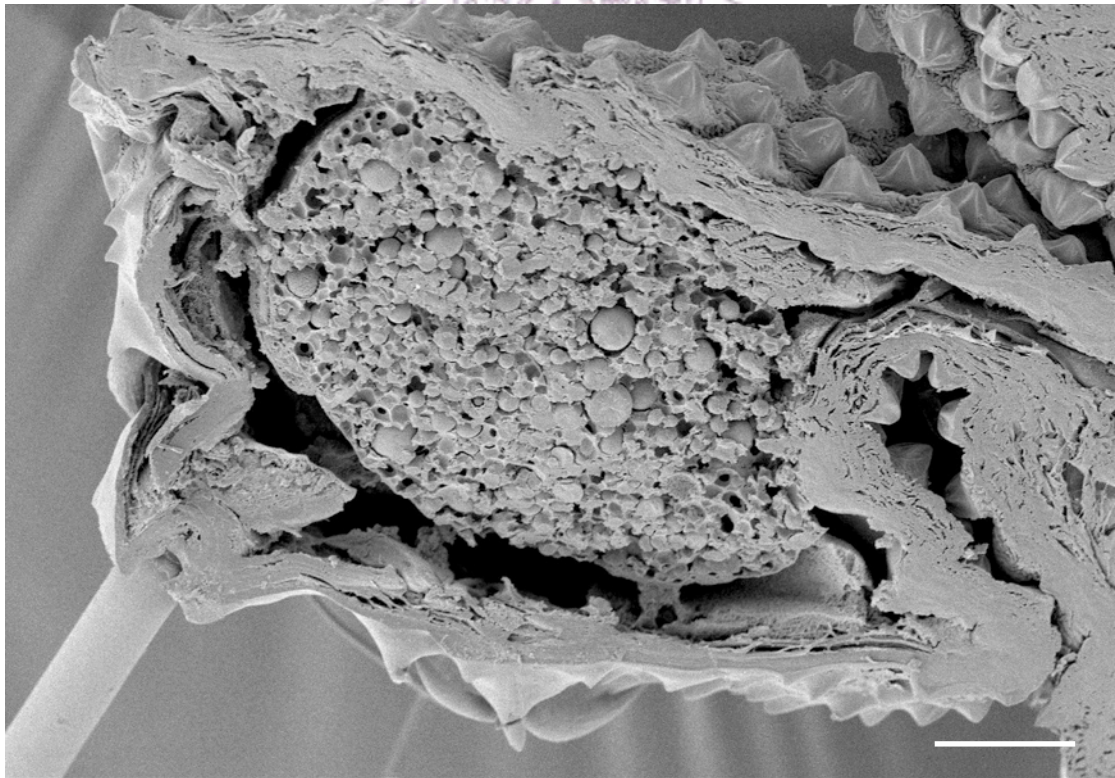


圖三十六、幼蟲發光器示意圖

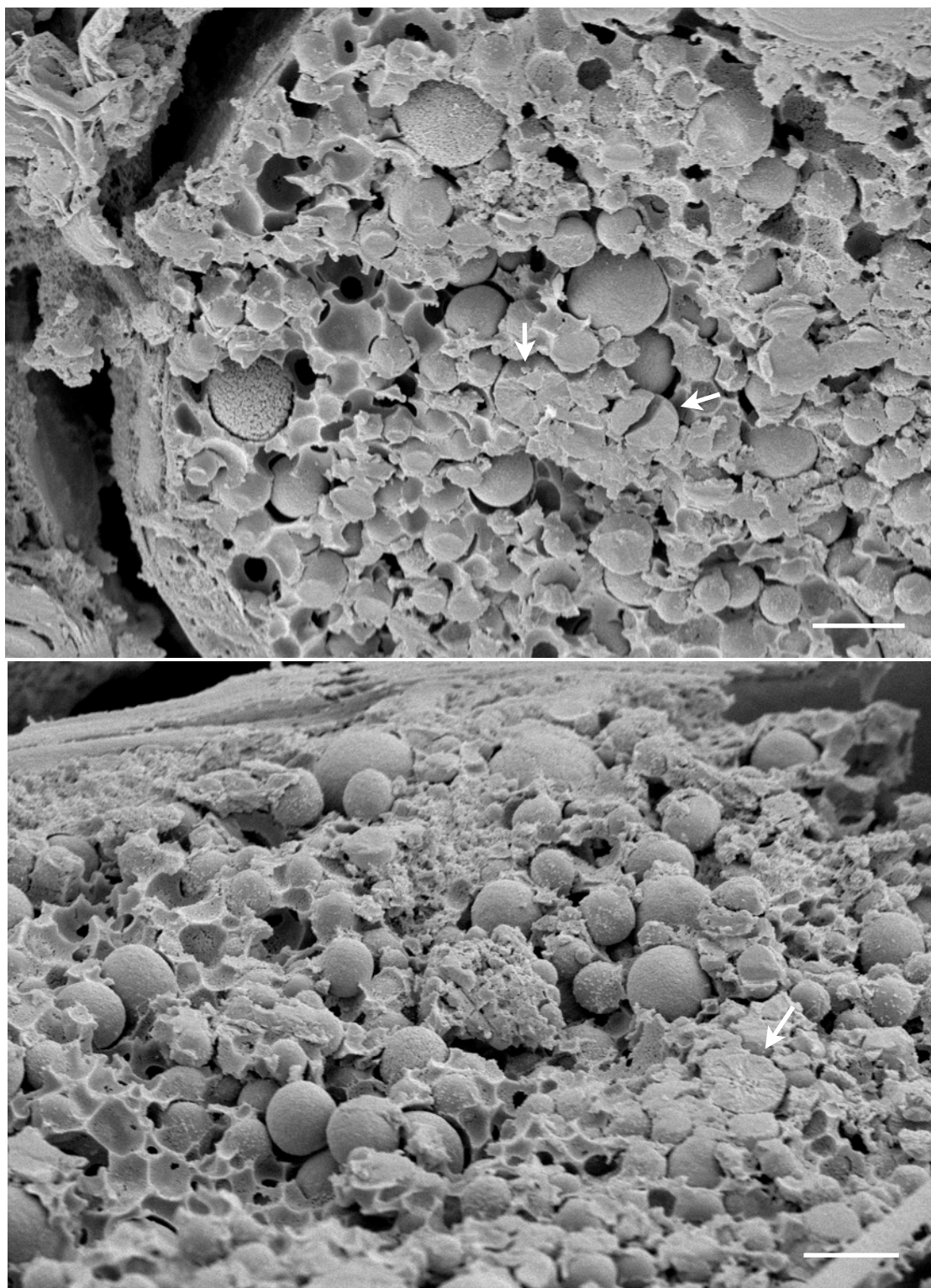
發光器中依舊遍佈著密集的顆粒（圖四十到四十四），但尺寸大小不如成蟲均勻。觀察尿酸顆粒的剖面，內部與成蟲相似，呈現輻射狀結晶（圖四十）。



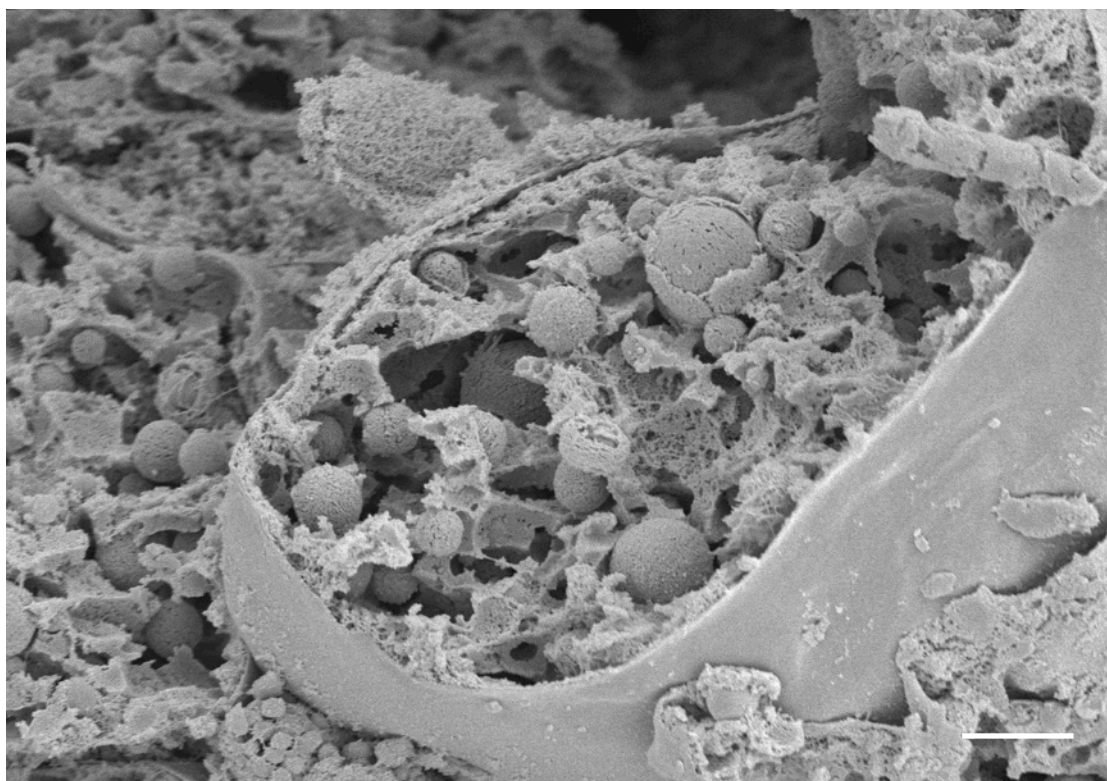
圖三十七、黑翅螢幼蟲的橫切面，發光器位於蟲體的左右兩側（箭頭處），靠近腹面的部位。比例尺為 $100\mu\text{m}$ 。



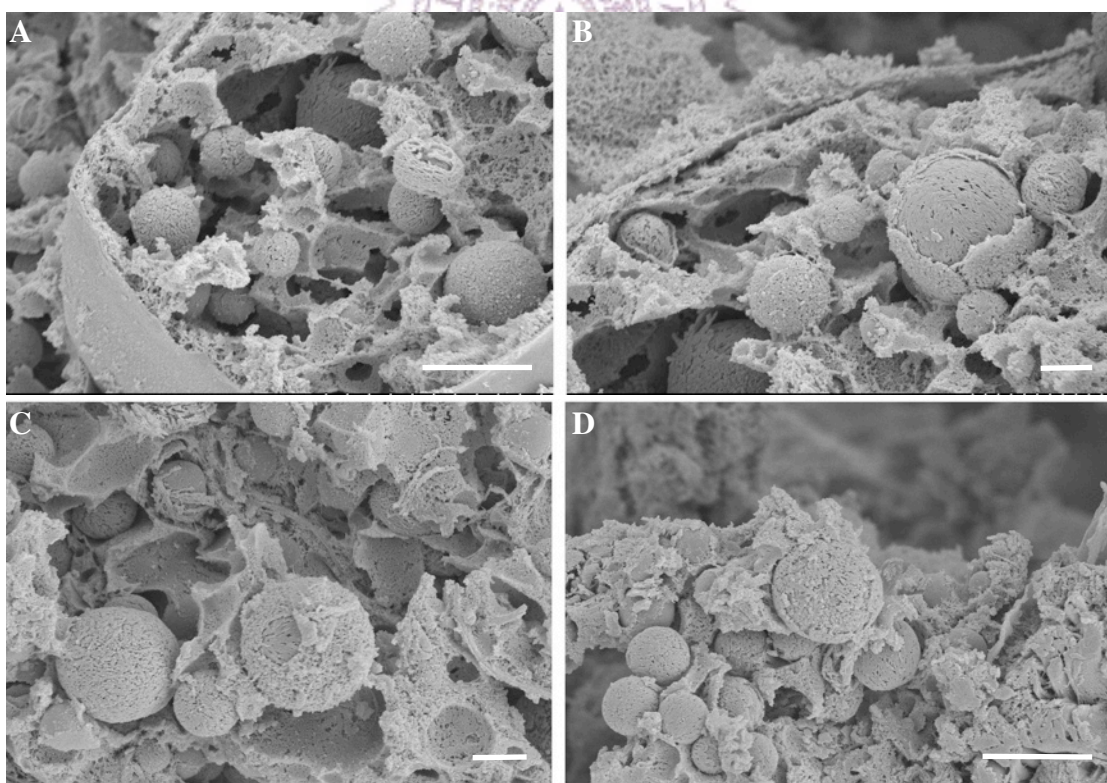
圖三十八、幼蟲發光器剖面。切面佈滿了大小不一的圓形顆粒，沒有觀察到如成蟲般明顯的兩層組織。比例尺為 $20\mu\text{m}$ 。



圖三十九、發光器裡的尿酸顆粒，大小不均，有些被切開（箭頭處）。尿酸顆粒的切面與成蟲相似，比例尺為 $5\mu\text{m}$ 。



圖四十、發光器之中細胞的尿酸顆粒。比例尺為 $5\mu\text{m}$ 。



圖四十一、幼蟲發光器中的尿酸顆粒，排列鬆散且大小不一。比例尺分別為圖A： $5\mu\text{m}$ ；圖B及C： $2\mu\text{m}$ ；圖D： $5\mu\text{m}$ 。

3.3. 發光器之尿酸含量、顆粒尺寸及顆粒數量密度的分析

利用螢光和尿酸含量的正比關係，計算出分離的發光器中，含有多少比重的尿酸。平均值為5.21%。

表一、發光器所含尿酸比重

黑翅螢	乾重 (mg)	尿酸重量 (μg)	尿酸/體重 (%)
A	4.95	276.52± 33.72	5.59
B	5.13	304.18± 41.77	5.93
C	4.92	201.53± 24.63	4.10

選定不同倍率的電顯圖片，用軟體Image J測量尿酸顆粒的直徑及比例尺的長度，求得尿酸顆粒的實際直徑以及單位面積的顆粒密度。

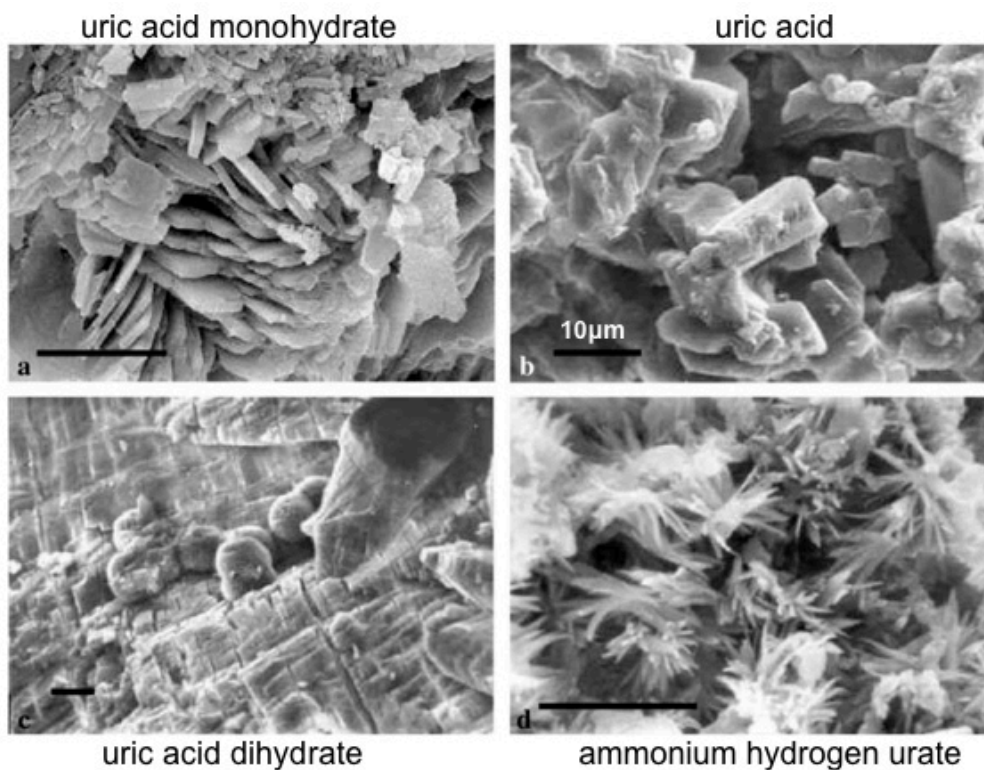
表二、發光器的尿酸顆粒直徑及顆粒密度

黑翅螢	尿酸顆粒直徑 (μm)	平均直徑 (μm)	顆粒密度 (顆/cm ²)
雄性成蟲	0.46-1.36	0.91± 0.20	3.25± 0.47×10 ⁷
五齡幼蟲	1.70-7.49	3.41± 1.28	4.56± 1.65×10 ⁶

第四章

4. 討論

從文獻回顧看來，百年的研究成果累積，將螢火蟲調控螢光的前因後果已描繪的相當完整。然而，對於反光層的構造和功能上，依舊缺乏系統性的研究。我們觀察到黑翅螢成蟲的反光層中，細胞90%以上的體積都被尿酸顆粒填滿，尿酸結晶形狀呈球型。然而，尿酸鹽自然結晶的狀態下，晶體形狀為板狀、塊狀及針狀（圖四十二），因此推論發光器高密度的尿酸是由細胞主動進行儲存，有特定運輸尿酸的因子存在，且在反光層的每一顆尿酸顆粒外



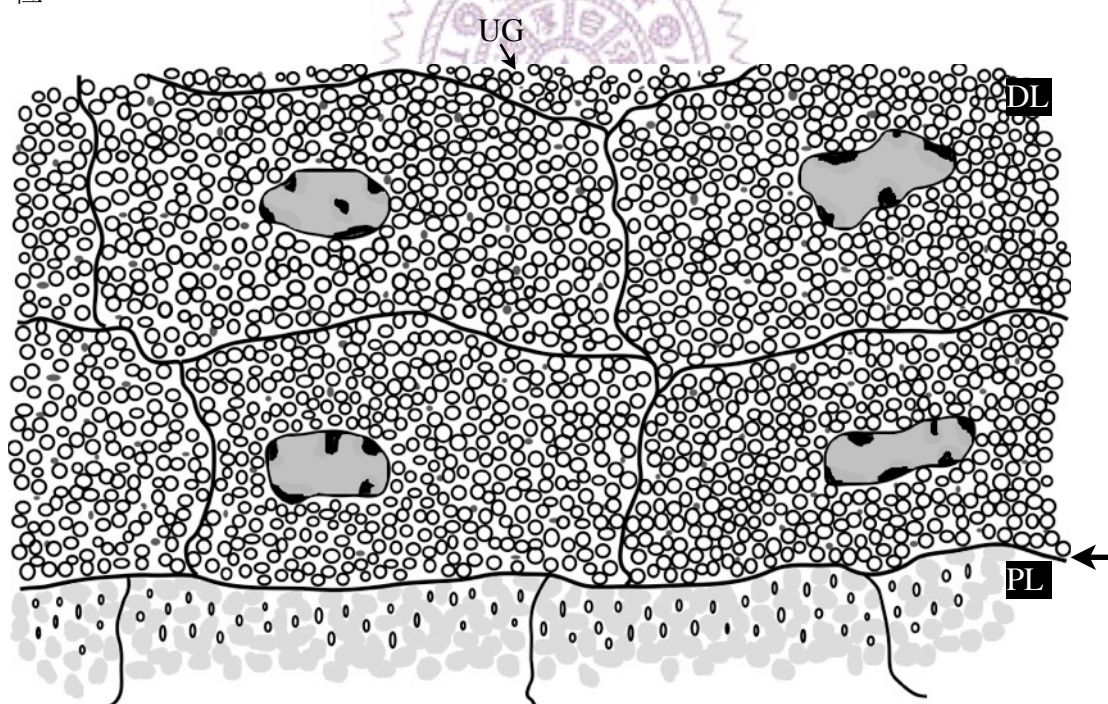
圖四十二、人類的尿酸結石，不同鹽類形成不同形狀的結晶。
(Schubert *et. al.*, 2005)

圍，包附著單層膜（圖二十八、三十四），運輸尿酸的蛋白質可能形成通道來濃縮顆粒的尿酸濃度，產生特別的球型結晶。但因黑翅螢發光器厚度僅有200µm，初步將發光器磨碎，用過濾的方式萃取出來的蛋白質純度和體積，還

需要一系列完整的方法來純化，方能作為鑑定之用。

幼蟲發光器從外觀看來不如成蟲可以明顯辨別，只能憑體節的位置來做剖面觀察，而且除了發光器之外，體內應含有大量的尿酸，以排泄幼蟲所攝取的高含氮食物，其他的尿酸以何種形式存在仍不詳。在發光器中的尿酸顆粒，尺寸變化極大，直徑從 $1.70-7.49\mu\text{m}$ 不等，顆粒之間的空間比成蟲來得大（圖二十四、三十八），顆粒密度也僅有成蟲反光層的14.03%（表二），如此一來，尿酸的反射作用也會變弱。肉眼即可辨別成蟲螢光比幼蟲亮許多，要瞭解排列鬆散的尿酸顆粒對於螢光亮度的影響程度，需要再更進一步的考量影響螢光強度的因素，如發光素、發光酵素、氧氣等等，做定量的分析。

從實驗的電子顯微鏡觀察，可得到黑翅螢雄性成蟲發光器反光層的結構模式圖（圖四十三），反光層細胞除了細胞核之外，充滿著圓形的尿酸顆粒。



圖四十三、黑翅螢雄性成蟲之發光器反光層細胞示意圖。箭頭處為反光層與發光層細胞的交界處，組成反光層（DL）的細胞內部填滿大量的尿酸顆粒（UG）；在發光層（PL）的發光細胞中並無出現此種尿酸顆粒。

雖然黑翅螢成蟲和幼蟲的發光模式與發光器構造有著差異，但是構造和功能上的連結依舊缺乏強而有力的證據，反光層的功能，到目前為止沒有研究詳細的取出例證。最直接的想法莫過於：觀察螢火蟲有無反光層的發光情形。然而，螢火蟲的基因序列未完全解開，反光層相關的基因也不明，暫時無法從這方面上著手。我們試著從發光器中分離反光層，想要透過光學分析來證明反光的功能，只是由顯微觀察可知兩層之間並無整齊且明顯的分界，對於分離反光層始終有技術上的困難。在兩片玻片中放入蓋玻片作為墊高的夾層，把略帶弧形的發光器夾入其中的空腔，泡在純的丙酮溶液中， -80°C 冷凍固定一週，包埋到組織切片用的石蠟，利用石蠟作為支撐，切出厚度均勻的反光層。然而反光層大部份為極小的尿酸顆粒組成，石蠟難以滲入每個顆粒之中，切開後發現尿酸顆粒容易風乾脫落。截至目前，還沒想到更好的方法來取得反光層組織，後續對於反光層的光學分析也暫時擱置。



第五章

5. 結論與未來展望

螢火蟲發光器的形態，在不同屬的種類中差異很大。黑翅螢雄性成蟲的發光器位於腹節最末兩節，緊鄰著下表皮，外觀為乳白色。從實驗的顯微觀察之中，黑翅螢雄性成蟲的發光器，背面及腹面分別由兩種差異甚大的結構組成，背面為反光層，佈滿直徑約 $0.91\mu\text{m}$ 、大小均勻的尿酸顆粒；腹面為發光層，組織的發光細胞中含有豐富的發光素和發光酵素。氧氣在螢光反應也是不可或缺的，氣管從體側對稱的氣孔開始，管壁有環狀的結構使得氣管不易受到擠壓而變形，粗大的氣管輸送氧氣至發光器中，分枝成許多的小氣管，從反光層往發光層、由背面至腹面持續延伸，越發密集。黑翅螢發光器裡的尿酸含量，佔了體重的5.21%，這樣的高比重，對昆蟲來說並不是特殊的例子。特別的是，螢火蟲成蟲不再攝取含氮食物，體內的尿酸是幼蟲時期儲存而來，一般昆蟲在化蛹後便會排出，而螢火蟲仍然保留如此高比例的尿酸，作為發光器的材料。

在夜晚時，幼蟲體側有兩個圓點會發出螢光，即為發光器所在。不發光的話，幼蟲的發光器外觀極不明顯，幼蟲的腹面體色為黑色，但是在發光器所在的體節卻是半透明的白色。發光器的剖面只觀察到許多圓形的尿酸顆粒，沒看到發光層和反光層的境界，顆粒大小不一，直徑 $1.70-7.49\mu\text{m}$ ，也不如成蟲密集。幼蟲的發光器與其它組織的交界並不明顯，因此難以單獨分析發光器的尿酸含量。

要釐清幼蟲和成蟲之間發光器的變異，從蛹來觀察是最清楚直接。一般野外採集螢火蟲，都是用所發出的螢光來找，蛹雖然會發光，但要尋找藏在泥地裡的蛹絕非易事，而人工飼養目前尚未建立出完善的環境，能夠完成黑翅螢的生活史。若能維持樣品數量的穩定，對於研究會更加有效率，成果也

會更令人信服。台灣的螢火蟲種類眾多，觀察收集各種螢火蟲的發光器構造，對應其發光行為，更有助於瞭解台灣的螢火蟲族群。另一個則是反光層的功能，能夠從發光器中分離出反光層，以光學分析證明，除了尿酸的特性之外，或許密集的排列有著光學元件的功能，使發光層釋出的螢光性質產生改變。

螢火蟲發光的生理機構，幾乎已有清楚的解答，不過在這片厚度 $200\mu\text{m}$ 的發光器裡，仍有許多謎題待解開。例如，發光器的反光層光學特性和螢火蟲從幼蟲到成蟲發光器的發育，都是十分有趣的研究題材。



參考文獻

- Aprille, J. R., Lagace, C. J., Modica-Napolitano, J. & Trimmer, B. A. (2004) Role of nitric oxide and mitochondria in control of firefly flash. *Integr. Comp. Biol.* **44**, 213-219
- Babu, B. G. & Kannan, M. (2002). Lightning Bugs. *Resonance* **7**, 49–55.
- Barua, A. G., Hazarika, S., Saikia, N. M. & Baruah, G.D. (2009) Bioluminescence emissions of the firefly *Luciola praeusta* Kiesenwetter 1874 (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae). *J. Biosci.* **34**, 287-292.
- Beams, H. W. & Anderson, E. (1955) Light and electron microscope studies on the light organ of the firefly (*Photinus pyralis*). *Biol. Bull.* **109**, 375-393
- Branchini, B. R., Southworth, T. L., Murtiashaw, M. H., Magyar, R. A., Gonzalez, S. A., Ruggiero, M. C. & Stroh, J. G. (2004) An Alternative Mechanism of Bioluminescence Color Determination in Firefly Luciferase. *Biochemistry* **43**, 7255-7262.
- Branham, M. A. & Wenzel, J. W. (2003) The origin of photic behavior and the evolution of sexual communication in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Cladistics* **19**, 1-22.
- BugGuide, <http://bugguide.net/>, hosted by Iowa State University Entomology.
- Buck, J. B. (1948) The anatomy and physiology of the light organ in fireflies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **49**, 397-470.
- Cock, R. D. (2004) Larval and adult emission spectra of bioluminescence in three European firefly species. *Photochem. Photobiol.* **79**, 339-342.
- Dudzinski, D. M. (2006) Nitric oxide and the control of firefly flashing. (Harvard Medical School & Massachusetts Institute of Technology).
- Ehresmann, D. D., Buckner, J. S., Graf, G. (1990) Uric acid translocation from the fat body of *Manduca sexta* during the pupal-adult transformation: effects of 20-hydroxyecdysone. *J. Insect Physiol.* **36**, 173-180.
- Eisner, T., Goetz, M. & Hill, D. E., Smedley, S.R. & Meinwald, J. (1997) Firefly

- “femmes fatales” acquire defensive steroids (lucibufagins) from their firefly prey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9723-9728.
- Garfield, E. (1982). William D. McElroy and the Illuminating Story of Bioluminescence. *Essays of an Information Scientist* **5**, 737–741.
- Ghiradella, H. (1977) Fine structure of the tracheoles of the lantern of a photurid firefly. *J. Morphol.* **153**, 187-203.
- Ghiradella, H. (1983) Permeable sites in the firefly lantern tracheal system: Use of osmium tetroxide vapor as a tracer. *J. Morphol.* **177**, 145-156.
- Ghiradella, H. (1998) The Anatomy of Light Production: The Fine Structure of the Firefly Lantern, in MICROSCOPIC ANATOMY OF INVERTEBRATES, vol. 11A: INSECTA, pp. 363– 381 (Harrison, F.W. & Locke, M., eds.). Wiley-Liss, New York.
- Ghiradella, H. & Schmidt, J. T. (2004) Fireflies at one hundred plus: a new look at flash control. *Integr. Comp. Biol.* **44**, 203-212.
- Goldstein, D. H. (2006) Polarization properties of Scarabaeidae. *Appl. Opt.* **45**, 7944-7950.
- Gomi, K. & Kajiyama, N. (2001) Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regenerated into luciferin. *J. Biol. Chem.* **276**, 36508–36513
- Greenfield, M. D. (2001) Missing link in firefly bioluminescence revealed: NO regulation of photocyte respiration. *BioEssays* **23**, 992-995.
- Gronquist, M., Schroeder, F. C., Ghiradella, H., Hill, D., McCoy, E. M., Meinwald J. & Eisner, T. (2006) Shunning the night to elude the hunter: diurnal fireflies and the “femmes fatales”. *Chemoecology* **16**, 39-43.
- Hanna, C. H., Hopkins, T. A., & Buck, J. (1976) Peroxisomes of the firefly lantern. *J. Ultrastructure Res.* **57**, 150-162.
- Hastings, J. W. & Johnson, C. H. (2003). Bioluminescence and Chemiluminescence. *Methods Enzymol.* **360**, 75–104.
- Harvey, E. N. (1980) A HISTORY OF LUMINESCENCE FROM THE

- EARLIEST TIMES UNTIL 1900. American Philosophical Society,
Philadelphia, Pennsylvania.
- Hegedüs, R., Szél, G., & Horváth, G. (2006) Imaging polarimetry of the circularly polarizing cuticle of scarab beetles (Coleoptera: Rutelidae, Cetoniidae). *Vision Res.* **46**, 2786-2797.
- Herring, P. J. (2000) Bioluminescent signals and the role of reflectors. *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* **2**, 29-38.
- Holladay, A. (2005). A Glowing Sea, Courtesy of Algae. USA TODAY.
- Kashima, T., Nakamura, T. & Tojo, S. (2006) Uric acid recycling in the shield bug, *Parastrachia japonensis* (Hemiptera: Parastrachiidae), during diapause. *J. Insect Physiol.* **52**, 816-825.
- Klowden, M. J. (2007) Physiological systems in insects, Academic Press, New York.
- Kluss, B. C. (1958) Light and electron microscope observations on the photogenic organ of the firefly *Photuris Pennsylvanica* with special reference to the innervation. *J. Morphol.* **103**, 159-185.
- Kuhnt, P. (1970) Das Leuchten der Lampyriden. *Entomol. Wochenblatt* **24**, 3-4.
- Lloyd, J. (1965) Aggressive mimicry in Photuris: firefly femmes fatales. *Science* **149**, 653-654.
- Lund, E. J. (1911) On the Structure, Physiology and Use of Photogenic Organs, with Special Reference to the Lampyridae. *J. exp. Zool.* **11**, 415-468.
- Meyer-Rochow, V. B. (2007) Glowworms: a review of *Arachnocampa* spp. and kin. *Luminescence* **22**, 251-265.
- Nakatsu, T., Ichiyama S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobashi, N., Sakata, K. & Katoet, H. (2006) Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature* **440**, 372-376.
- Oertel, D. & Case, J. F. (1976) Neural excitation of the larval firefly photocyte: Slow depolarization possibly mediated by a cyclic nucleotide. *J. Exp. Biol.* **65**, 213-327.

- Oertel, D., Linberg, K. A. & Case, J. F. (1975) Ultrastructure of the larval firefly light organ as related to control of light emission. *Cell Tissue Res.* **164**, 27-44.
- Ohba, N. (2004) Flash communication systems of Japanese fireflies. *Integr. Comp. Biol.* **44**, 225–233.
- Peterson, M. K. (1970) The fine structure of the larval firefly light organ. *J. Morphol.* **131**, 103-115.
- Richards, A. (1960) Observations on the New Zealand glow-worm *Arachnocampa luminosa* (Skuse) 1890. *Transactions of the Royal Society of New Zealand* **88**, 433-436.
- Roth, L. & Dateo Jr, G. (1965) Uric acid storage and excretion by accessory sex glands of male cockroaches. *J. Insect Physiol.* **11**, 1023-1026.
- Schubert, G., Reck, G., Jancke, H., Kraus, W., & Patzelt, C. (2005) Uric acid monohydrate—a new urinary calculus phase. *Urological research.* **33**, 231–238.
- Shidham, V. & Shidham, G. (2000) Staining method to demonstrate urate crystals in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *Journal Information* **124**, 774-776.
- Shimomura, O. (2006) Bioluminescence: chemical principles and methods, World Scientific, New York.
- Smalley, K. N., Tarwater, D. E. & Davidson, T. L. (1980) Localization of fluorescent compounds in the firefly light organ. *J. Histochem. Cytochem.* **28**, 323-329.
- Smith, D. S. (1963) The organization and innervation of the luminescent organ in a firefly, *Photuris pennsylvanica* (Coleoptera). *J. Cell Biol.* **16**, 323-359.
- Stolz, U., Velez, S. & Wood, K. (2003) Darwinian natural selection for orange bioluminescent color in a Jamaican click beetle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 14955–14959.
- Strause, L. G., DeLuca, M. & Case, J. F. (1979) Biochemical and morphological

- changes accompanying light organ development in the firefly, *Photuris pennsylvanica*. *J. Insect Physiol.* **25**, 339-347.
- Suzuki, H. & Hayashi, F. (2003) Fireflies with or without prespermatophores: Evolutionary origins and life-history consequences. *Entomol. Sci.* **6**, 3-10.
- Timmins, G. S., Jackson, S. K. & Swartz, H. M. (2000). The Evolution of Bioluminescent Oxygen Consumption as an Ancient Oxygen Detoxification Mechanism. *J. Mol. Evol.* **52**, 321-332.
- Timmins, G. S., Robb F. J., Wilmot C. M., Jackson S. K. & Swartz H. M. (2001). Firefly Flashing is Controlled by Gating Oxygen to Light-Emitting Cells. *J. Exp. Biol.* **204**, 2795-2801.
- Trimmer, B. A., Aprille, J. R., Dudzinski, D. M., Lagace, C. J., Lewis, S. M., Michel, T., Qazi, S. & Zayas, R. M. (2001) Nitric oxide and the control of firefly flashing. *Science* **292**, 2486-2488.
- Viviani, V. R. (2002) The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1833-1850.
- Viviani, V. R., Okawachi, F. M., Scorsato, V., & Abdalla, F. C. (2008) CCD imaging of basal bioluminescence in larval fireflies: clues on the anatomic origin and evolution of bioluminescence. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 448-452.
- Weitz, H. J., Ballard, A. L., Campbell, C. D. & Kilham, K. (2001). The Effect of Culture Conditions on the Mycelial Growth and Luminescence of Naturally Bioluminescent Fungi. *FEBS Microbiol. Lett.* **202**, 165-170.
- Zhao, Y., Yang, X., Lu, W., Liao, H., & Liao, F. (2009) Uricase based methods for determination of uric acid in serum. *Microchimica Acta* **164**, 1-6.
- 行政院農業委員會屏東林區管理處（2007），高屏地區賞螢手冊，行政院農業委員會林務局。
- 陳燦榮（2003），台灣螢火蟲，田園影像出版社，台北市。