



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Chemical Defense of Aquatic Larvae of the Firefly (*Aquatica ficta*): Microanatomy of Eversible Organs, Chemicals of Glandular Secretion, and Effectiveness to Different Predators 【Research report】

水生之黃緣螢幼蟲的化學防禦：翻縮腺之顯微結構、分泌物成分與對不同掠食者的效能 【研究報告】

Chun-Tai Chen¹, Chia-Hsiung Wu¹, Ming-Luen Jeng², and Ping-Shih Yang^{1*}
陳君玳¹、吳加雄¹、鄭明倫²、楊平世^{1*}

*通訊作者E-mail: psyang@ntu.edu.tw

Received: 2011/12/12 Accepted: 2012/03/14 Available online: 2012/03/01

Abstract

The larval chemical defenses of the Yellow-rimmed Aquatic Firefly, *Aquatica ficta* (Olivier), were studied. The larvae, when simulated by touch, would curl up their body into a ball and stretch their forked-shape eversible organs accompanied with a pine-odor. Ten pairs of eversible organs are located bilaterally on meso- and metathoracies, as well as on the first 8 abdominal segments, just above the abdominal tracheal gills. The external surface of the eversible organs of the fifth-instar larvae bears many bud-like micro-protuberances, each with 3-6 spines radially arranged on the top. No significant ultrastructure was found within the micro-protuberance. On the internal surface of the eversible organs there are many hemispherical structures, which have rich mitochondria inside, each of which is connected to a micro-protuberance on the external surface with a tubule. These hemispherical structures are believed to be the secretion glands. Four kinds of predators were used to test the effectiveness of the chemical defense of the firefly larvae. The larvae successfully defended against attacks by Dojo Loaches (*Misgurnus anguillicaudatus*), and were unharmed ejected out of the mouth of the loach. The larvae were hunted and partially consumed by damselfly naiads (of *Coenagrionidae*). Freshwater prawns (*Palaemonidae*, *Macrobrachium* lar) were able to mechanically neutralize the chemical defense of the firefly larvae and consumed the whole larval body. This suggests that the larval chemical defense is less effective against invertebrate predators, although the predator may eventually abandon the dead prey. Using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), we identified nine chemical components, plus another three unknown substances, that were extracted from the larval eversible organs. The identified components are largely monoterpene compounds, such as terpinolene, L-(-)-verbenone, (-)-sabinene, limonene, and γ -terpinene, etc. Among them terpinolene has the richest content (20.87%) and was chosen for a bioassay test. Agar-based pellets containing commercial fish food and three different concentrations of terpinolene (0.0425, 0.425 and 4.25%) were fed to the Dojo loaches and freshwater prawns (*Macrobrachium* lar) to determine their deterrence. Pellets of each of the three concentrations showed a deterrent effect of different degrees to the subject predators in relation to non-terpinolene pellets. The higher the concentration, the stronger the deterrence. Dojo loaches showed a 30-95% deterrent efficiency. Freshwater prawns were less sensitive to terpinolene than loaches, and showed a 20-80% deterrent efficiency. The terpinolene secreted by the larval eversible organs was confirmed to be a repellent against predators.

摘要

本研究報導黃緣螢 (*Aquatica ficta* (Olivier)) 的水棲幼蟲的化學防禦。幼蟲受到接觸性的刺激後，會蜷縮身體，並伸出分叉狀之翻縮腺。翻縮腺共10對，分佈於中、後胸及腹部第1~8節之體側氣管腮與背板間。第五齡幼蟲之翻縮腺外部表面具有眾多的花苞狀小突起，端部有對稱或放射狀排列的小刺，可分為3~6瓣四型，小突起內部無其他構造；翻縮腺內部表面具有為半圓球狀的腔室，內具粒線體，以小管和外表面的花苞狀小突起相連，應為防禦物質之分泌腺體。質化觀察黃緣螢幼蟲的化學防禦是否對不同的共域掠食者都有效，發現對於魚類的效果最好，實驗的泥鰍吞食幼蟲後會將其無傷地吐出，最終拒絕取食；細蟴科的水蠶攫捕黃緣螢幼蟲後並未完全取食，但已使幼蟲死亡；貪食沼蝦則不僅攫捕黃緣螢幼蟲，並以第一螯肢剪開幼蟲表皮，不斷扭轉幼蟲，最終將幼蟲取食殆盡。利用氣相層析質譜儀分析翻縮腺之分泌物成分，共發現12種化合物，有3種為未知，其餘為單萜類衍生物，其中terpinolene、L-(-)-verbenone、(-)-sabinene等為主要成份，相對含量9.81~20.87%；以市售之terpinolene，以不同劑量混入市售魚飼料後倒入2%洋菜基內調製為0.0425、0.425與4.25%三種濃度的人工食餌，餵食泥鰍與貪食沼蝦，測試terpinolene對不同掠食者的忌避性。泥鰍及貪食沼蝦對三種terpinolene濃度之人工食餌塊呈現不同程度的排拒性，濃度越高，排拒性越強；對泥鰍之忌避率為30~95%，對貪食沼蝦為20~80%。生物活性測試證實黃緣螢幼蟲翻縮腺所分泌的terpinolene對天敵的確具有忌避效果。

Key words: *Aquatica ficta*, larvae chemical defense, predators, terpinolene, bioassay

關鍵詞: 黃緣螢、幼蟲化學防禦、掠食者、生物活性檢定。

Full Text: [PDF \(7.11 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

水生之黃緣螢幼蟲的化學防禦：翻縮腺之顯微結構、分泌物成分與對不同掠食者的效能

陳君玳¹、吳加雄¹、鄭明倫²、楊平世^{1*}

¹ 國立臺灣大學生物資源暨農學院昆蟲學系 10617 台北市羅斯福路四段 1 號

² 國立自然科學博物館動物學組 40453 台中市館前路 1 號

摘要

本研究報導黃緣螢 (*Aquatica ficta* (Olivier)) 的水棲幼蟲的化學防禦。幼蟲受到接觸性的刺激後，會蜷縮身體，並伸出分叉狀之翻縮腺。翻縮腺共 10 對，分佈於中、後胸及腹部第 1~8 節之體側氣管腮與背板間。第五齡幼蟲之翻縮腺外部表面具有眾多的花苞狀小突起，端部有對稱或放射狀排列的小刺，可分為 3~6 瓣四型，小突起內部無其他構造；翻縮腺內部表面具有為半圓球狀的腔室，內具粒線體，以小管和外表面的花苞狀小突起相連，應為防禦物質之分泌腺體。質化觀察黃緣螢幼蟲的化學防禦是否對不同的共域掠食者都有效，發現對於魚類的效果最好，實驗的泥鰍吞食幼蟲後會將其無傷地吐出，最終拒絕取食；細蟪科的水蠶攫捕黃緣螢幼蟲後並未完全取食，但已使幼蟲死亡；貪食沼蝦則不僅攫捕黃緣螢幼蟲，並以第一螯肢剪開幼蟲表皮，不斷扭轉幼蟲，最終將幼蟲取食殆盡。利用氣相層析質譜儀分析翻縮腺之分泌物成分，共發現 12 種化合物，有 3 種為未知，其餘為單萜類衍生物，其中 terpinolene、L(-)-verbenone、(-)-sabinene 等為主要成份，相對含量 9.81~20.87%；以市售之 terpinolene，以不同劑量混入市售魚飼料後倒入 2% 洋菜基內調製為 0.0425、0.425 與 4.25% 三種濃度的人工食餌，餵食泥鰍與貪食沼蝦，測試 terpinolene 對不同掠食者的忌避性。泥鰍及貪食沼蝦對三種 terpinolene 濃度之人工食餌塊呈現不同程度的排拒性，濃度越高，排拒性越強；對泥鰍之忌避率為 30~95%，對貪食沼蝦為 20~80%。生物活性測試證實黃緣螢幼蟲翻縮腺所分泌的 terpinolene 對天敵的確具有忌避效果。

關鍵詞：黃緣螢、幼蟲化學防禦、掠食者、生物活性檢定。

*論文聯繫人

Corresponding email: psyang@ntu.edu.tw

前 言

許多動物能以自身分泌的化學物質作為攻擊或防禦用途。據 Esinger *et al.* (2005) 統計，至少有 9 目 53 科昆蟲具有這樣的能力，範圍涵括陸生與水生、不完全變態與完全變態之類群，並可見於幼蟲期、蛹期或成蟲期，而分泌的部位在頭、胸、腹部以及足皆有實例。以防禦來說，昆蟲的化學防禦可分成兩大類，一類是分泌或保有對天敵具有內毒性或外毒性的物質，如植物鹼 (alkaloids)、固醇類 (steroids)、斑蝥素 (cantharidin)、強心類固醇 (cardenolides) 等，能造成天敵產生強烈的痛苦經驗，如疼痛、灼傷起泡、心悸、或是嘔吐、中毒等症狀，迫使天敵放棄捕食或取食；另一類是釋放對天敵無真正傷害，但具有刺激性、臭味或黏性的驅退物質，如醛類 (aldehydes)、醌類 (quinines)、烯類 (terpenes) 等，以化學或物理的方式阻止天敵攻擊，或使之知難而退，或失去胃口。同一種昆蟲可能同時具有這兩類的物質，或是同一種物質對於不同的天敵有不同的功能，由毒性和氣味等構成多重的化學防禦 (Gullan and Cranston, 2005)。這些昆蟲中不少具有高反差的明顯體色或能發出明顯的訊號或行為，對一般性的捕食者具有警示性 (aposematism)。

雖然化學防禦在昆蟲中尚屬常見，但在分類群的分布上並不平均，主要集中在鞘翅目、膜翅目、鱗翅目和半翅目。鞘翅目中至少有 380 屬 900 種甲蟲被記錄到具有化學防禦，其中又以步行蟲 (Carabidae)、芫青 (Meloidae)、螢火蟲 (Lampyridae)、瓢蟲 (Coccinellidae)、金花蟲 (Chrysomelidae) 等被研究得較透徹 (Dettner, 1997)。以螢火蟲為例，成蟲具有反射性出血 (reflex bleeding) 的防禦行為，能從翅鞘或足部分泌具有刺激性氣味的體液

(Ohba and Hidaka, 2002; Sagegami-Oba *et al.*, 2007)。北美的螢火蟲如夜行性的 *Photinus* 或日行性的 *Lucidota* 等屬，其成蟲體液中含有具毒性之獨特固醇類 lucibufagins (LBGs)，結構略似蟾蜍所帶之致毒物 bufadienolides，效果則如強心類固醇類 (Eisner *et al.*, 1978; Eisner, 2005)。脊椎動物如鳥類、蝙蝠、兩爬類等在捕食吞咬時會螢火蟲吐出，或在食後出現嘔吐現象，甚至導致死亡 (Lloyd, 1973; Sydow and Lloyd, 1975; Eisner *et al.*, 1978; Eisner *et al.*, 1997; Knight *et al.*, 1999)。研究也發現 LBG 對跳蛛有忌避性，而跳蛛能從氣味分辨螢火蟲體內是否含有 LBG，決定攻擊與否 (Eisner *et al.*, 1978)。北美的 *Photuris* 屬螢火蟲無法自行合成 LBG，卻藉由捕食其他類群的螢火蟲來獲取 LBG (Eisner, 1997)。但 Gonzalez *et al.* (1999) 則發現 *Photuris* 螢火蟲體內含有甜菜鹼類 (betaines) 化學防禦物質。

螢火蟲幼蟲也具有化學防禦 (Underwood *et al.*, 1997; De Cock and Matthysen, 1999, 2001, 2003; Tyler, 2001a)。但不同於成蟲的反射性出血，幼蟲身體兩側具有可外翻 (eversible) 的忌避腺體 (Okada and Naba, 1928; Tyler 2001b, Tyler and Trice 2001; Trice *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2007, 2009)。這些腺體平時縮於體內，遇刺激或攻擊時才會外翻露出，並釋放出類似「松香」的氣味。其形態和分佈在陸棲性幼蟲與水棲性幼蟲間有所差異，水棲幼蟲的腺體多為二叉狀，分佈在中胸到第 8 腹部，陸生者則多為柱狀，分佈在中胸到第 7 腹節 (Fu *et al.*, 2009)。水棲幼蟲能從這些腺體分泌出 terpinolene 和 terpene 等萜類化合物，對魚類和螞蟻是有效的忌避物質。水棲幼蟲蜷縮身體、發光、外翻忌避腺和釋放忌避物質構成複合 (multi-modal) 的警

示防禦行爲 (Fu *et al.*, 2007)。

本研究目的在了解黃綠螢 (*Aquatica ficta* (Olivier)) 幼蟲的化學防禦, 包含其腺體結構、化學成分與對掠食者的忌避效果。黃綠螢為臺灣三種具有水棲幼蟲的螢火蟲之一, 分布在臺灣和中國長江流域及以南地區。在臺灣, 本種常見於水澤、水田與水流較緩的灌溉溝渠內, 底質以泥或土為主的棲地 (Ho and Jiang, 1997, 2002; Ho and Chu, 2002; Chen, 2003)。這類棲地中同時存在許多不同類型的捕食者, 包含日行性或夜行性的脊椎與無脊椎動物, 因此不禁令人好奇幼蟲的化學防禦是否能排拒所有掠食者的攻擊。我們鑑定出黃綠螢幼蟲化學防禦物的組成, 取其中一種主要成分製備成不同濃度的人工食餌進行生物活性檢定, 以驗證翻縮腺分泌物質是否確實為其化學防禦之來源, 並測試其忌避性對不同類型之掠食者是否有所差異。

材料與方法

一、試驗動物來源及飼養方式

本實驗於 2009 年 3~4 月及同年 9~10 月, 自陽明山竹子湖海芋田內採集黃綠螢雌雄個體數隻, 交尾後將雌蟲放入含有海棉之採卵容器內, 保持海綿濕潤, 並提供糖水給雌蟲進食。雌蟲死亡後, 將含有卵之海綿放入盛水容器中, 讓海綿漂浮在 3 公分高之水面上, 使孵化的初齡幼蟲自然進入水中, 之後依據 Ho *et al.* (2006) 之黃綠螢幼蟲改良飼育法飼養。2010 年 1 月另由臺北市立木柵動物園後山採集黃綠螢幼蟲補充試驗所需之幼蟲數量。量化實驗用之捕食性動物共有兩類, 包含由傳統市場購入之人工養殖泥鰱 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 與自臺北市虎山溪、外雙溪夜間採捕之長臂蝦科 (Palaemonidae) 貪

食沼蝦 (*Macrobrachium lar*), 此二者皆為黃綠螢天然棲息環境中可見之夜行性一般掠食者。泥鰱單隻飼養, 每日餵食 1 顆市售魚飼料 (Nutrafin max), 每 3 日更換水體 1 次; 貪食沼蝦單隻放置於通透容器中亦每 3 日更換水體 1 次, 並以適量市售魚飼料泡軟後餵食。

除了量化實驗的掠食動物, 我們也測試水棲昆蟲是否捕食黃綠螢幼蟲, 對象有自臺灣大學農場以水撈網撈捕之細蟴科 (Coenagrionidae) 水蠶, 在實驗室中觀察掠食性昆蟲對黃綠螢幼蟲的攻擊和取食行爲。

二、翻縮腺之形態與顯微結構

(一) 外部形態攝影

目的在觀察翻縮腺之分佈, 以鑷子戳觸五齡幼蟲, 刺激其翻出翻縮腺後, 迅速投入液態氮內使其瞬間死亡。隨後將幼蟲取出, 浸泡於 pH 值 7.2、濃度 2.5%、4°C 之 glutaraldehyde 固定液中固定 20 分鐘, 以數位單眼相機 Canon 350D 搭配微距鏡頭直接拍攝。

(二) 光學顯微鏡樣本

置備玻片樣本以觀察翻縮腺橫剖面結構。自液態氮取出露出翻縮腺的幼蟲後, 放入以 pH 值 7.2、濃度 2.5% 之 glutaraldehyde 及 2% 之 paraformaldehyde 溶於磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffer solution, PBS) 製備的前固定液中, 置於 4°C 冰箱固定 24 小時。之後切下翻縮腺體, 以磷酸鹽緩衝液潤洗 3 次, 每次 10 分鐘。將樣本移至抽風櫥內加入 1% 鉻酸 (osmium tetroxide) 做後固定, 浸泡 2 小時, 全程置於冰上。再以磷酸鹽緩衝液潤洗 3 次, 每次 10 分鐘。樣本以 50、70、80、90、95、100% 乙醇 (ethanol) 進行序列脫水, 每種濃度各 3 次, 每次 10 分鐘。最後置換為丙酮 (acetone), 每次浸泡 20 分鐘, 共 3 次。包埋劑使用 Electron Microscopy

Sciences 之 EMBED 812 KIT 中硬度樹脂 (20 ml Embed 812、16 ml DDSA、8 ml NMA 以及 0.66~0.88 ml DMP-30)，將樣本放入丙酮比樹脂體積比為 1:1 之溶液中持續搖晃 2 小時，再移入丙酮比樹脂體積比為 1:3 之溶液中持續搖晃過夜。隔日將樣本移入 100% 樹脂中持續搖晃 2 小時，最後移置於模具中，放置於 80°C 烘箱烘烤 2 天。樹脂樣本以 1 μm 切片製作玻片樣本，將玻片放置於 55~60°C 加熱板上待其乾燥。以 1 g Toluidine Blue O 與 2 g sodium borate 加入 100 ml 二次水中，做為染劑，滴加於切片樣本上，加熱約 30 sec，再洗去過多染劑，乾燥後於以封片膠封片，最後以光學顯微鏡 (Olympus BX51) 搭配攜帶型顯微影像攝影系統 (Bresser PMS 3.0) 觀察。

(三) 掃描式電子顯微鏡樣本

目的為觀察翻縮腺內、外表面顯微形態。同外部形態攝影步驟，將露出翻縮腺的幼蟲以固定液固定 20 分鐘，以觀察翻縮腺之外表面，並縱切腹板，小心移除腸道、氣管及脂肪等內部器官，以觀察翻縮腺內表面。掃描式電子顯微鏡樣本依照 Fu *et al.* (2009) 之流程，使用 pH 值 7.2、濃度 2.5% 之 glutaraldehyde 做為前固定液，放入 4°C 冰箱固定 24 小時。隨後以磷酸鹽緩衝液潤洗 2 次，每次 10 分鐘。將樣本移至抽風櫥內加入 1% 鉻酸做後固定，浸泡 3 小時，全程置於冰上，再以磷酸鹽緩衝液潤洗 2 次，每次各 10 分鐘。樣本以 30、50、70、80、90、100% 乙醇進行序列脫水，每次各 12 小時，最後置換為丙酮，每次浸泡 12 小時，共 2 次。隨後將樣本轉移至臨界點乾燥儀器內乾燥，並且將乾燥後之標本鍍上金膜，於掃描式電子顯微鏡 (JEOL JSM-5600) 下觀察。

(四) 穿透式電子顯微鏡樣本

目的為觀察翻縮腺內部顯微構造，製備步驟同光學顯微鏡樣本。樹脂樣本以 70~90 nm 切片製作樣本，並放置於銅網上。樣本以 2.5% 醋酸鈾 (uranyl acetate) 與 0.4% 檸檬酸鉛 (lead citrate) 染色，最後以 0.01 N 氫氧化鈉潤洗，並以二次水清洗後，放置於 37°C 烘箱中過夜烘乾，於穿透式電子顯微鏡 (JEOL JEM-1010) 下觀察記錄。

(五) 不同水生掠食者對黃綠螢幼蟲的捕食行為
夜行性脊椎動物以泥鰍 ($n = 5$) 為代表，進行單隻飼養試驗。飢餓處理 3 天後，放入平均重量為 7.2 ± 0.5 mg ($n = 30$)，顆粒形之市售魚飼料 (Nutrafin max) 1 顆，以測試其取食意願，於 5 分鐘後未取食則再行飢餓處理 1 天，隔日同樣投入魚飼料檢測泥鰍取食意願；若於 5 分鐘內取食，立即放入黃綠螢幼蟲，於 5 分鐘內取食或未取食幼蟲，皆放入魚飼料並依此循環，直至捕食者未取食魚飼料而結束。未取食魚飼料之前一次幼蟲取食實驗因無法確認泥鰍之飽食狀態而不併入實驗結果。

日行性無脊椎動物以細蟪科之水蠶 ($n = 20$) 為代表。採用均翅亞目之豆娘水蠶而非不均翅亞目之蜻蜓水蠶，乃因蜻蜓水蠶於前試驗時展現其耐餓程度較佳，且個體差異較大，無法固定飢餓處理天數，因此採用豆娘水蠶。

夜行性無脊椎動物則為貪食沼蝦 ($n = 5$)。將上述捕食者飢餓處理一天後，進行單隻飼養試驗，放入黃綠螢幼蟲一天，觀察並記錄取食狀況。

(六) 翻縮腺分泌物質之化學成份分析

每次取 2 隻五齡黃綠螢幼蟲放入加蓋玻璃瓶中，充入氮氣後使用震盪器震盪 1 分鐘，移置乾浴機加熱至 30°C，持溫 5 分鐘，靜置 30 分鐘待用。化學成分分析儀器使用固相微萃取儀 (solid phase microextraction, SPME) 配合氣相層析質譜儀 (gas chromatography-

mass spectrometry, GC-MS)。氣相層析質譜儀為 Focus GC-Polaris Q (Thermo)，毛細層析管柱為 DB-5MS (Agilent, ID = 0.25 mm, Length = 30 m, Film = 0.25 μ m)，搭載 Wiley 7.0 資料庫；固相微萃取儀前端吸附纖維為 75 μ m CarboxenTM-PDMS，將其伸入玻璃瓶中，吸附氣體 30 分鐘。注射口溫度條件為 250°C，注射不分流，載流氣體為氦氣，固定流速 0.8 ml/min，氣相層析儀設定條件為起溫 40°C，持溫 3 分鐘，隨後以每分鐘 8°C 升溫至 250°C，再持溫 3 分鐘。與質譜儀連結之 Transfer line 設定為 300°C，質譜儀之離子源溫度則為 200°C，質譜掃描範圍為 40~500 amu。分析共重複 5 次。

(七) 翻縮腺主要化學成份之生物活性試驗

由 GC-MS 分析所得的黃緣螢翻縮腺分泌物主要成份有數種，但是除了 terpinolene 的化工產品 (松節油成分之一) 容易取得外，其餘成分之人工產品都非常昂貴，因此選定以 terpinolene 做實驗。參考 Gerhart (1991) 測試龍蝨 (Dytiscidae) 化學防禦物對藍鰓太陽魚 (*Lepomis macrochirus*) 之忌避試驗，將訂購之化工 terpinolene 溶於乙醇，並混入市售魚飼料 (Nutrafin max) 1 g 後，加入 2% 菜基中攪拌均勻，調製成 0.0425、0.425、4.25% terpinolene 3 種不同濃度之人工飼料，切割為 5 × 5 × 5 mm 之塊狀備用。

terpinolene 人工食餌對於泥鰍之忌避效果試驗，是以 5 條泥鰍，每次試驗取 1 隻，先飢餓處理 3 天，之後放入 1 顆魚飼料以檢測泥鰍之取食意願，如放入魚飼料後，5 分鐘內未取食，則再行飢餓處理 1 天，隔日同樣投入魚飼料檢測泥鰍取食意願；若於泥鰍於 5 分鐘內取食，則立即放入添加含 terpinolene 之塊狀人工食餌，觀察並記錄泥鰍取食人工食餌情形，5 分鐘後不論泥鰍取食或未取食人工食

餌，皆放入魚飼料，若泥鰍未再取食魚飼料，因無法確定泥鰍不取食人工食餌是 terpinolene 之忌避效果或第一次投入之魚飼料已讓泥鰍飽足，故視為無效試驗，該次結果不記，如泥鰍再次取食魚飼料，則泥鰍仍視為處於飢餓狀態，不取食人工食餌之情況可歸因於 terpinolene，則該次試驗視為有效試驗。另以未添加 terpinolene 之人工食餌做為控制組測試泥鰍取食情形。另外進行貪食沼蝦取食試驗，每次取 1 隻 (n = 5)，將其飢餓處理一天後，放入含 terpinolene 之人工食餌，1 天後觀察並記錄其取食情形，同時以未添加 terpinolene 之人工食餌做為控制組；由於如果泥鰍拒食人工食餌，會在吞入人工食餌後吐出，貪食沼蝦則會將已食入之人工食餌吐出，故以此情況判斷不同濃度 terpinolene 人工食餌的忌避效果。忌避率=拒食次數/總有效試驗數 × 100%。

結 果

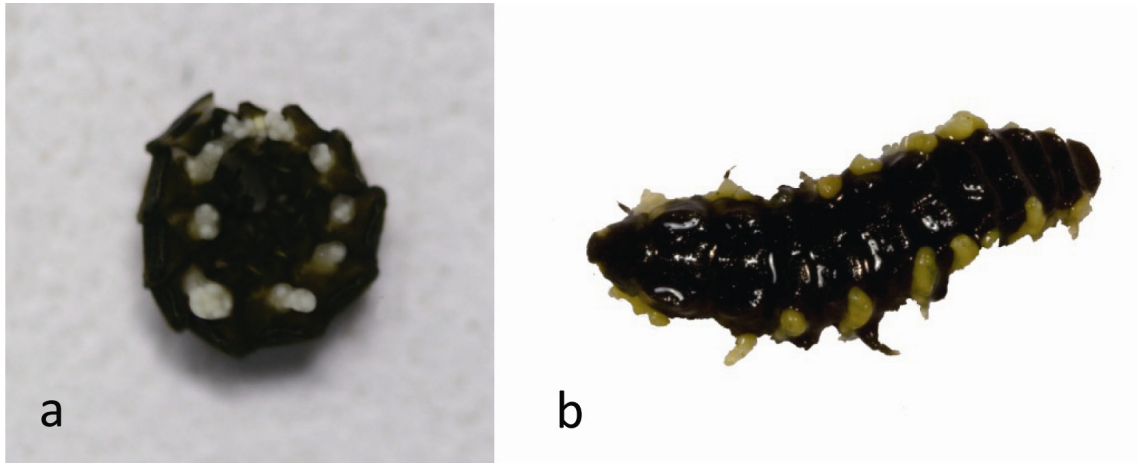
黃緣螢翻縮腺之形態與顯微結構

1. 外部形態攝影

黃緣螢受干擾後，會蜷曲體節，從中胸、後胸及腹部前 8 節側邊、氣管鰓上方伸出翻縮腺 (圖一)。翻縮腺內充滿體液及脂肪，多為白色，亦會因內部脂肪顏色不同而稍有差異，翻縮腺前端為二叉狀，但因投入液態氮冷凍後，會使翻縮腺前端縮回，故圖一中之翻縮腺僅呈現囊狀。

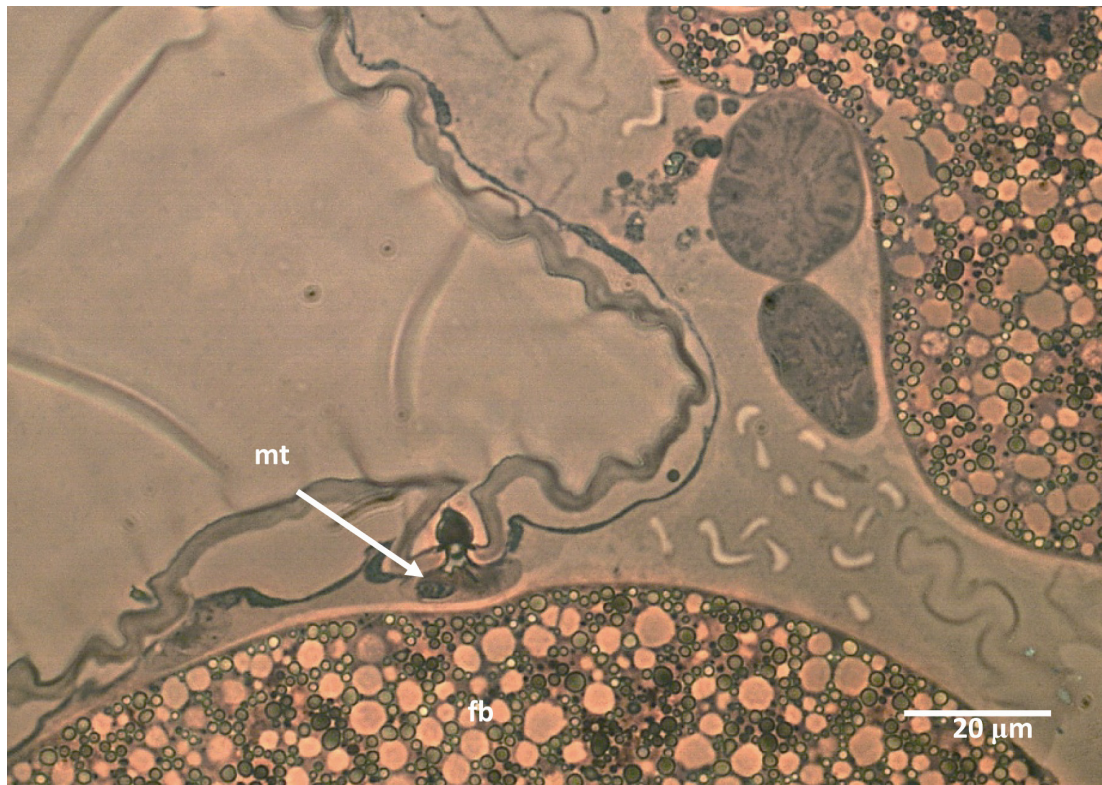
2. 光學顯微鏡

翻縮腺外表面具有小型花苞狀突起物，以小管連通至內部之囊狀物，而囊內可見粒線體於其中，推測囊狀物應為防禦物質之分泌腺體，而管狀通道應為輸送分泌物質之用 (圖二)。翻縮腺內部亦可見脂肪分佈。當幼蟲受干



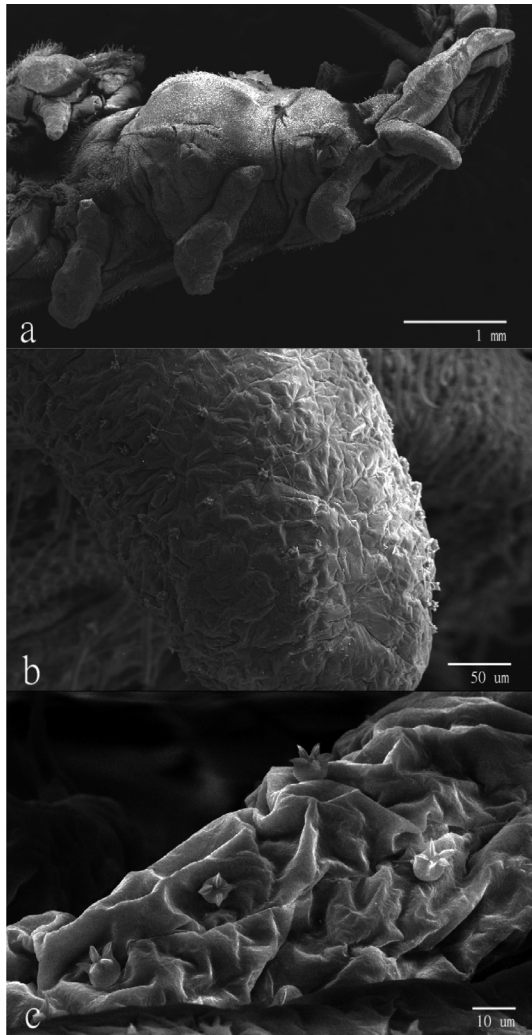
圖一 五齡黃緣螢幼蟲翻縮腺，為分叉之囊狀物。(a) 受干擾刺激後，幼蟲蜷曲並伸出翻縮腺；(b) 固定液固定 20 分鐘後攝影。

Fig. 1. Eversible organs of fifth instar larva of *Aquatica ficta*, which is sack-like and fork-shaped. (a) After stimulation, the larvae curl their body and extend the eversible organs; (b) Fixed after 20 mins.



圖二 五齡幼蟲翻縮腺橫剖面於光學顯微鏡下觀察。fb：脂肪；mt：粒線體。

Fig. 2. Transection of the eversible organs of fifth instar larva, observed by light microscope. fb: fat body; mt: mitochondria.



圖三 五齡幼蟲翻縮腺外部表面形態於掃描式電子顯微鏡下觀察。(a) 黃緣螢腹部第五節至第八節翻縮腺外部形態；(b) 翻縮腺一側，密布花狀突起；(c) 不同瓣數之突起共同存在於翻縮腺上。

Fig. 3. Scanning electron microscope images of the outer surface of the eversible organs of fifth-instar larva of *Aqatica ficta*. (a) Outer surface of eversible organs on the fifth to the eighth abdominal segments of *Aqatica ficta*; (b) Covered with flower-shaped protuberances; (c) Different spine numbers of protuberance coexist.

擾而蜷曲體節時，推測乃將體液及脂肪充入翻縮腺內使之外翻，同時由翻縮腺上眾多分泌腺體分泌釋放防禦物質以禦敵。

3. 掃描式電子顯微鏡

外翻之翻縮腺外部表面纏折，上面分佈眾多花苞狀突起（圖三），但是形態不一，依端部之突起數目可分為三、四、五、六瓣型，各類型混雜地排列於翻縮腺上（圖四）。內部表面上密佈半圓形分泌腺體，腺體與囊表皮相接處周圍凹陷（圖五）。

4. 穿透式電子顯微鏡

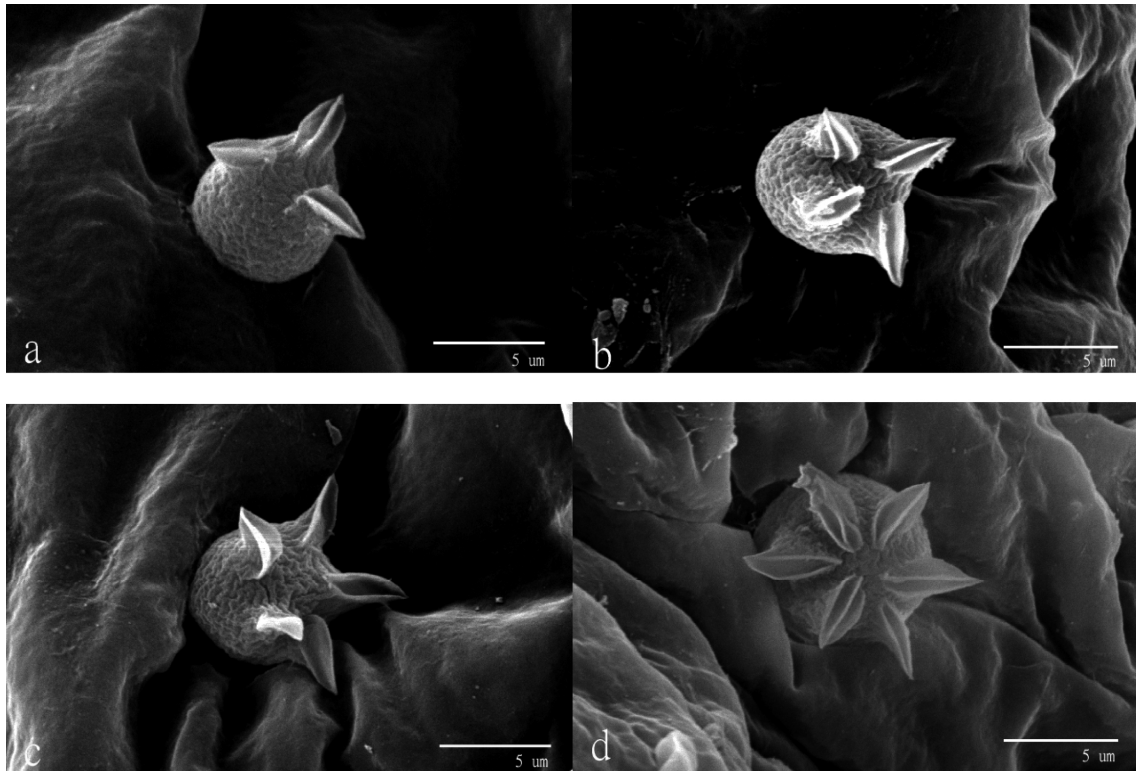
針對五齡黃緣螢幼蟲之翻縮腺突起之樣本觀察，與光學顯微鏡觀察相同，且花苞型突起之縱剖面內並無其餘構造（圖六）。

5. 不同掠食者對黃緣螢幼蟲的捕食行為

捕食者捕食黃緣螢情形各有不同（表二），日行性之無脊椎動物—細蟪科水蠶取食黃緣螢幼蟲，會造成幼蟲受傷或死亡，但不會將幼蟲全部食入。夜行性之脊椎動物—泥鰱於試驗時間 5 分鐘內，會出現 1~5 次攻擊，將黃緣螢幼蟲完全食入後立即吐出，而幼蟲則無受傷或死亡情形發生，夜行性無脊椎動物—長臂蝦科之貪食沼蝦皆會捕食黃緣螢幼蟲，捕食時先以第一對螯肢捕捉並攻擊幼蟲，接著以取食用附肢固定幼蟲並不停翻轉，將幼蟲體內物質不斷以附肢洗水方式，最後取食殆盡。由以上試驗得知，所有試驗生物皆有捕食黃緣螢幼蟲之情況，而泥鰱與細蟪科水蠶於取食後有拒食之行為發生，因此黃緣螢幼蟲遭受捕食始啟動防禦機制，更可了解其防禦力為味覺防禦大過於視覺防禦。至於貪食沼蝦之捕食可能因其撥出幼蟲體內物質之行為，增加自身捕食能力。

6. 黃緣螢翻縮腺分泌物之化學成份分析

利用氣相層析質譜儀分析翻縮腺之分泌物成分，共測得 82 個吸收峰（圖七），去除確定為雜質，以及相對含量低於 0.05% 之吸



圖四 五齡幼蟲翻縮腺外部表面突起形態於掃描式電子顯微鏡下觀察。(a) 三瓣突起；(b) 四瓣突起；(c) 五瓣突起；(d) 六瓣突起。

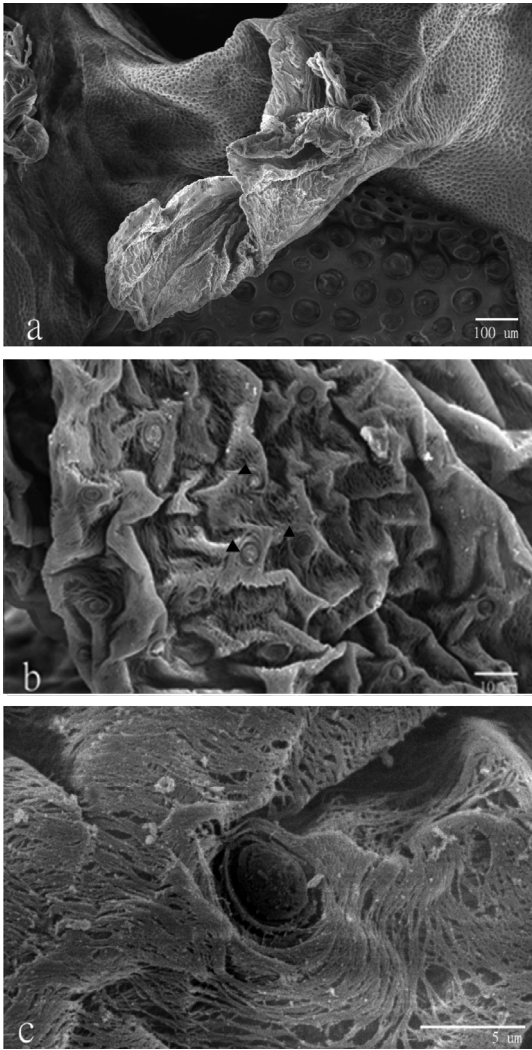
Fig. 4. Variation of the protuberances on the outer surface of the eversible organs of the fifth-instar larva of *Aquatica ficta*. (a) three-spined protuberance; (b) four-spined protuberance; (c) five-spined protuberance; (b) six-spined protuberance.

收峰後，僅餘 12 個吸收峰，剩餘成份含量約佔 85%，且各主要吸收峰峰型完整，皆無延滯情形，顯示氣味分析純淨。此外，因氣相層析質譜儀分析共重複 5 次，各吸收峰之成份分析穩定，確保其為黃緣螢幼蟲分泌物之可信度。將氣相層析質譜儀分析結果之各吸收峰資料如表一。翻縮腺分泌物共有 12 個化學成分，包含 3 個未知成份，其中有 2 個未知成份的含量超過 15%。扣除未知成分後，其餘 9 個成分中只有 3 個含量超過 5%，分別為 *terpinolene*、*L(-)-verbenonem* 與 *(-)-sabinene*，以 *terpinolene* 含量最高，達 20.87%，應於黃緣螢幼蟲防禦中扮演重要角色，加上其容易取

得，故選擇其做為生物活性試驗的藥劑。

7. 翻縮腺主要化學成份之生物活性試驗

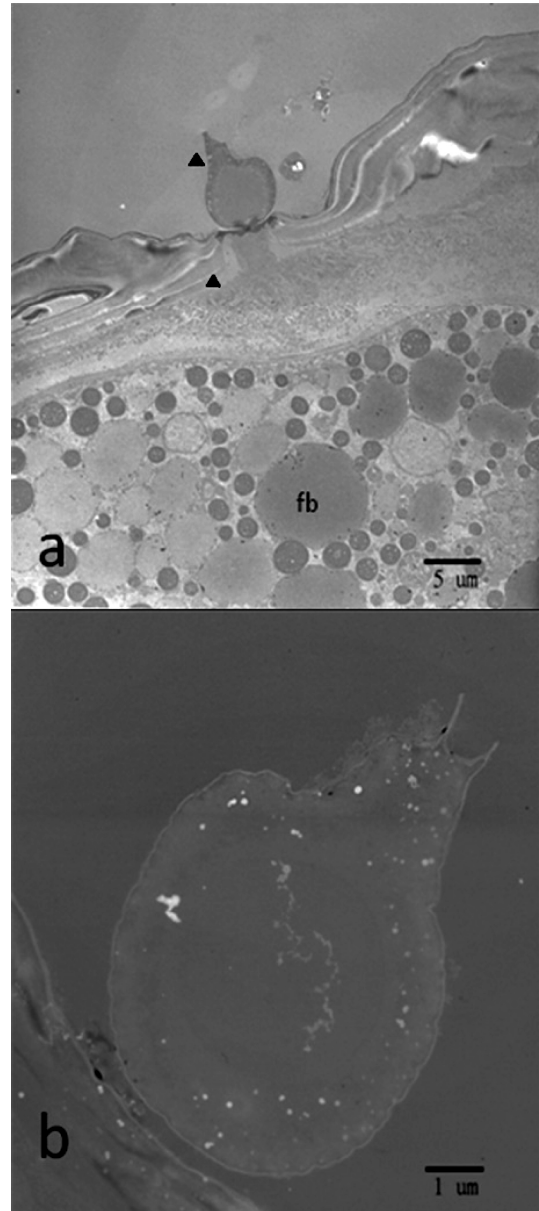
將添加不同濃度 *terpinolene* 的人工飼料塊餵食實驗之掠食動物，結果皆呈現出忌避效果，且與濃度呈現正相關（圖八）。泥鰱會取食未添加 *terpinolene* 之人工食餌，忌避率為 0%；而 0.0425% *terpinolene* 之忌避率為 30%；添加 0.425% *terpinolene* 之人工食餌之忌避率為 60%；添加 4.25% *terpinolene* 之人工食餌忌避率為 95%。夜行性無脊椎動物—長臂蝦科貪食沼蝦，亦會取食未添加 *terpinolene* 之人工食餌，忌避率為 0%；而 0.0425% *terpinolene* 之忌避率為 20%；添加



圖五 五齡幼蟲翻縮腺內部表面形態於掃描式電子顯微鏡下觀察。(a) 翻縮腺於體內之形態；(b) 分泌腺體密佈於翻縮腺；(c) 半圓形分泌腺體。

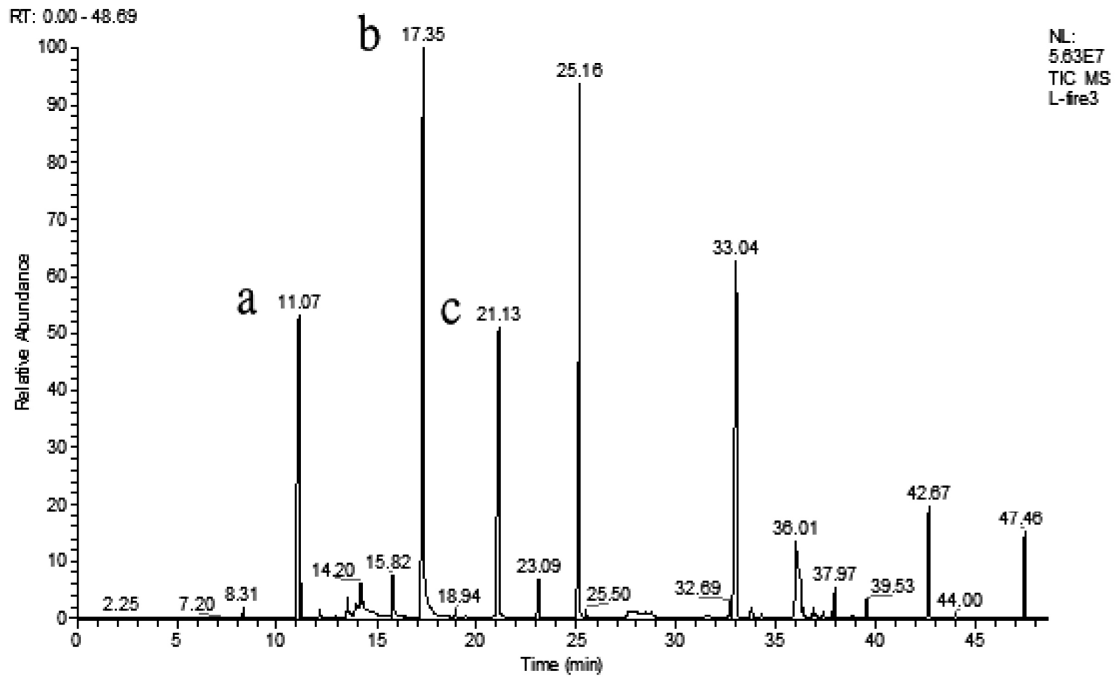
Fig. 5. Inner surface of the eversible organs of the fifth instar larva, observed by transmission electron microscope. (a) Inner surface of the eversible organs in the body; (b) Inner surface of the eversible organs covered with secretion glands; (c) Hemi-sphere secretion gland.

0.425% terpinolene 之人工食餌之忌避率為 70%；添加 4.25% terpinolene 之人工食餌忌避率為 80%。



圖六 五齡幼蟲翻縮腺橫剖面於穿透式電子顯微鏡下觀察。(a) 翻縮腺上之突起與分泌腺體相連接(三角標示處)。(b) 突起內部無其餘構造。fb：脂肪。

Fig. 6. Transmission electron microscopic images of the eversible organs of fifth-instar larva of *Aquatica ficta*. (a) protuberance connected with hemisphere secretion gland; (b) transection of the protuberance. fb: fat body.



圖七 黃緣螢幼蟲翻縮腺分泌物之氣相層析質譜儀分析結果。(a) (-)-sabinene, 9.31%, 滯留時間 = 11.07 分；(b) terpinolene, 20.87%, 滯留時間 = 17.35 分；(c) L-(-)-verbenone, 12.23%, 滯留時間 = 21.13 分。

Fig. 7. Result of GC-MS of the glandular secretion of the eversible organs of *Aquatica ficta* larvae. (a) (-)-sabinene, 9.31%, RT = 11.07 mins; (b) terpinolene, 20.87%, RT = 17.35 mins; (c) L-(-)-verbenone, 12.23%, RT = 21.13 mins.

表一 氣相層析質譜儀分析結果

Table 1. Identified compounds of chemical results of gas chromatography-mass spectrometry

RT ¹ (mins)	Chemical compounds	Molecular formula	Relative area (%)	Identification
11.07	(-)-sabinene	C ₁₀ H ₁₆	9.31	MS, KI
11.21	(1S)-(-)-β-pinene	C ₁₀ H ₁₆	0.69	MS
13.52	α-terpinene	C ₁₀ H ₁₆	0.73	MS
13.97	p-cymene	C ₁₀ H ₁₄	0.52	MS
14.20	(+)-limonene	C ₁₀ H ₁₆	1.28	MS
	(-)-limonene			
15.82	γ-terpinene	C ₁₀ H ₁₆	1.22	MS
17.35	terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	20.87	MS, KI
21.13	L-(-)-verbenone	C ₁₀ H ₁₄ O	12.23	MS
23.09	Unknown		1.02	MS
25.16	Unknown		16.95	MS
33.04	Unknown		18.26	MS
37.97	(+)-β-gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	0.78	MS

¹ Retention time

表二 黃緣螢幼蟲化學防禦機制對於不同捕食者獵食影響結果

Table 2. The results of the chemical defense of *Aquatica ficta* larvae to different predators

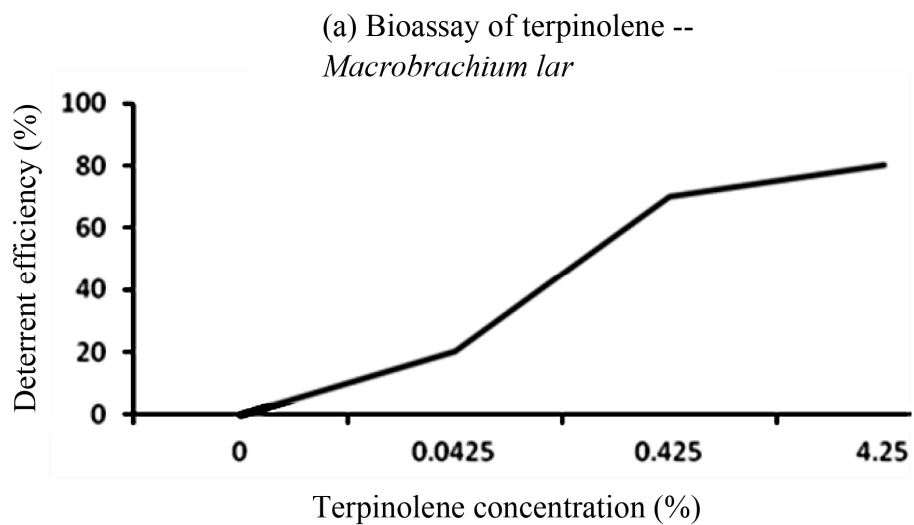
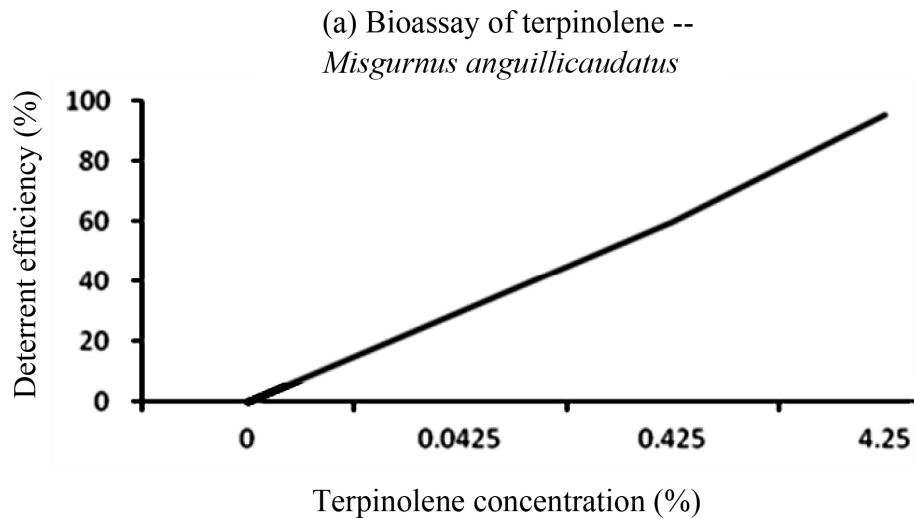
Predator	Predator numbers	<i>Aquatica ficta</i> larvae numbers	Attracted larvae numbers	Ate larvae numbers
Coenagrionidae	20	100	16	0
<i>Macrobrachium lar</i>	5	15	15	15
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	5	33	33	0

討 論

比較黃緣螢和其他具有水棲幼蟲的螢火蟲種類的翻縮腺 (Okada and Nada, 1928; Fu *et al.*, 2007, 2009), 其間的形態差異並不大, 翻縮腺的位置、數量和巨觀的外部形態都相同。黃緣螢與中國的雷氏螢 (*Luciola leii* Fu & Ballantyne)、日本的平家螢 (*Luciola lateralis* Motschulsky) 與其他一些種類最近被轉入水生螢屬 (*Aquatica*, 見 Fu *et al.*, 2010), 這三個種的翻縮腺顯微構造尤其相像, 在外表皮都具有花苞狀的小突起, 內表皮都有盤狀或球狀的分泌腺體。外表皮花苞狀小突起的端部小刺從 2~7 枚不等, 其中平家螢的除了周緣呈對稱或放射狀排列的小刺, 中央還有一枚小刺, 是黃緣螢和雷氏所沒有的。但是具有不同小刺數量的花苞狀小突起的比例會隨齡期而逐漸改變 (Fu *et al.*, 2009)。至於同是水棲的日本源氏螢 (*Luciola cruciata* Motschulsky), 目前尚未移出熠螢屬 (*Luciola*), 但是其翻縮腺也和水棲螢屬非常類似, 唯其花苞狀小突起的端部具有更多小刺, 排列有如皇冠 (Fu *et al.*, 2009)。未來可檢視被移入水棲螢屬的黃胸黑翅螢 (*A. hydrophila* Jeng, Lai and Yang, 臺灣產) 具有何種的花苞型小突起形態, 也可比較這些水棲性類群和同屬於熠螢亞科 (*Luciolinae*) 的

其他屬的陸棲性幼蟲的翻縮腺差異, 並可擴大與螢亞科 (*Lampyrinae*) 種類比對 (Fu *et al.* (2009) 研究之陸棲種類皆屬螢亞科者), 追溯翻縮腺構造在螢科內的演化。

在人工飼養條件下, 以黃緣螢幼蟲餵食饑餓處理過的蓋斑鬥魚 (*Macropodus opercularis*), 蓋斑鬥魚會很快地吞食後又很快地吐出蜷縮成球狀的幼蟲, 同一條魚可能會吞吐兩三次, 之後放棄; 蜷縮的幼蟲落到底質上後, 會將身體伸展開, 然後無傷地爬離; 將之放入飼養泥鰱或黃鱔 (*Monopterus albus*) 的水箱中, 幼蟲也能安然存活數月而未被捕食 (陳燦榮, 私人通訊)。這些都直接或間接印證黃緣螢幼蟲的化學防禦對魚類相當有效, 也和本研究與 Fu *et al.* (2007) 的結果相符。不少淡水魚類在取食前會將物體吸入口中測試是否可食, 若出現不適口性 (*unpalatability*) 則吐出 (Webster and Lim, 2002; Gillbert, 2008), 因此具有化學防禦的獵物即使被攻擊也多能無傷地脫逃。但是對於其他類型的掠食者, 化學防禦則未必有效。本研究觀察的水蠶是依靠視覺獵食的埋伏性掠食者, 會對可能的獵物發動侵入性 (*invasive*) 的致命攻擊, 即便黃緣螢的化學防禦物質最終仍使天敵產生嫌惡反應而放棄進食, 但只要掠食者攻擊得逞, 不論獵物被吃、不被吃或被部份取食, 最終都難逃死亡, 因此黃緣螢幼蟲的化學防禦並



圖八 不同濃度之 terpinolene 對於不同捕食者之忌避率。(a) 泥鰱試驗結果；(b) 貪食沼蝦試驗結果。

Fig. 8. Deterrent effectiveness of artificial food pellets with different concentrations of terpinolene for different predators. (a) bioassay of Dojo Loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, and of (b) freshwater prawn, *Macrobrachium lar*.

無法發揮保命的功能。貪食沼蝦是雜食性的機會取食者 (opportunistic)，不專門獵取特定獵物。由於具有兩對螯肢，獵食黃緣螢時能用大螯固定幼蟲，並用第一對螯肢剪開幼蟲身體，在水中不斷翻轉獵物，再在用第一對螯肢一點

一點地取食，最終將整隻螢火蟲幼蟲取食殆盡。沼蝦在第一螯肢上有化學感受器，能偵知獵物抽取物、鹽分、胺基酸、季銨化合物 (quaternary ammonium compounds)、氨水等物質 (Derby and Harpaz, 1988)。有可能

在取食過程中，貪食沼蝦的第一螯肢偵知螢火蟲幼蟲的防禦物質，進而引發在水中不斷翻轉獵物的動作，目的可能為清洗防禦物質，稀釋其味道或濃度。可說貪食沼蝦是用機械的方式 (mechanically) 瓦解黃緣螢幼蟲的化學防禦。

黃緣螢幼蟲的抽出物中，*terpinolene* 所佔相對含量最高，也含有 γ -*terpinene* 等物質，與 Fu *et al.* (2007) 從雷氏螢萃取所得的成分相同。值得一提的是，從 GC-MS 分析所發現的成分如 *limonene*、*pinene*、*sabinene*、*terpinene* 及 *terpinolene* 等皆為單萜類 (monoterpene，含 10 個碳基) 衍生物，只有 (+)- β -*gurjunene* 是倍半萜類 (sesquiterpene，含 15 個碳基)。單萜類油性物質常存在於植物萃取物中，能防範植食者或疾病侵略，具干擾昆蟲之基礎生理、增加幼蟲死亡率及忌避昆蟲之功能，目前已廣泛應用於殺蟲劑上；其中 *limonene* 已被證實具抗菌、抗蟎、防治寄生昆蟲……等等功能 (Ibrahim *et al.*, 2001)，因此這些化合物皆為忌避物質的可能性極大。單萜類雖然在植物中含量最高，但也常見於昆蟲身上，做為費洛蒙、防禦分泌物乃至荷爾蒙 (Morgan, 2010)。由於螢火蟲幼蟲為肉食性，並將消化液注入獵物體內，在體外先行消化分解後才食入，理論上無法自植物或獵物取得這些物質轉為防禦之用，因此可能為自身合成。至於我們的生物活性實驗則證實 *terpinolene* 對泥鰍與貪食沼蝦都能發生忌避效果，且忌避性隨濃度增加而增強。貪食沼蝦對 *terpinolene* 的耐受程度較泥鰍為高，可能也部份解釋了貪食沼蝦能捕食黃緣螢幼蟲的原因。

已知的螢火蟲成蟲並無翻縮腺的構造，親緣近似的類群中，只有菊虎科 (Cantharidae) 成蟲和幼蟲在腹部都具有翻縮腺。Poinar *et al.* (2007) 從緬甸琥珀 (Burmese amber) 中

發現了一件翻縮腺外翻的菊虎化石，可追溯到 1 億年前白堊紀時期，是昆蟲演化出化學防禦目前最古老的證據。這意味著菊虎、螢、紅螢 (Lycidae)、捕蜈螢 (Phengodidae)、雌光螢 (Rhagophthalmidae) 等相近類群可能很早便已演化出化學防禦能力，而翻縮腺體是原始型式之一，但是在後續的演化中各個類群逐漸走向不同的防禦機制途徑，只剩菊虎科成蟲依舊保有翻縮腺，其他類群多半演化出反射性出血，伴隨鮮明的警戒色 (如紅螢科)、發光訊號 (如螢科) 或分泌氣味強烈的物質 (如雌光螢) (Sagegami-Oba *et al.*, 2007)。菊虎、螢、紅螢等甲蟲的成蟲化學防禦忌避物質組成差異頗大 (Eisner *et al.*, 1978; Moore and Brown, 1981; Brown *et al.*, 1988; González *et al.*, 1999)，推測可能是獨立演化而來 (Sagegami-Oba *et al.*, 2007)。

螢火蟲幼蟲的發光長久以來被認為是一種警示訊號 (Crowson, 1972; Lloyd, 1973; Sivinski, 1981)，但直到最近 20 年才有學者以實驗來測試這個假說 (Underwood *et al.*, 1997; De Cock and Matthysen, 1999, 2001, 2003; Tyler, 2001a)。這些作者發現實驗對象的鳥類、鼠類、蟾蜍都對歐洲的 *Lampyrus noctiluca* 螢火蟲幼蟲顯現程度不一的嫌惡反應，且能學習將發光訊號與不適口性的連結。但是本研究利用水蠹與沼蝦測試水棲螢火蟲幼蟲化學防禦的有效性則是第一次。黃緣螢幼蟲白天大都藏匿於底質中或隱蔽處，主要在夜間到天剛亮時活動，爬行時一般都會自腹部末端發出兩點光 (陳燦榮，私人通訊)。因此主要為日行性、攻擊會移動目標的水蠹可暫時自天敵名單中排除。其餘如黃鱧、泥鰍、沼蝦等俱為夜行性，是黃緣螢幼蟲天然棲地中可能的天敵。魚類有較佳的學習記憶能力，且排斥取食黃緣螢幼蟲，因此幼蟲的發光訊號可能發揮警

戒的功能。但幼蟲的化學防禦並無法對無脊椎掠食動物發揮效用，則發光訊號的作用便大有疑問。研究這些無脊椎動物的視覺能力以及其是否具有學習記憶能力是一大關鍵，亦即幼蟲的發光訊號是否反而招來更多的掠食天敵，變成危害自己的訊號。這將是本研究未來重要的發展課題。

引用文獻

- Brown WV, Lacey MJ, Moore BP.** 1988. Dihydromatricariate-based triglycerides, glyceride ethers and waxes in the Australian soldier beetle, *Chauliognathus lugubris* (Coleoptera: Cantharidae). *J Chem Ecol* 14: 411-423.
- Chen TR.** 2003. The fireflies of Taiwan. Taipei: Field Images Press. 255 pp.
- Crowson RA.** 1972. A review of the classification of Cantharoidea (Coleoptera), with the definition of two new families, Cneoglossidae and Omethidae. *Revista de la Universidad de Madrid* 21 (82): 35-77.
- De Cock R, Matthysen E.** 1999. Aposematism and bioluminescence: experimental evidence from glow-worm larvae (Coleoptera: Lampyridae). *Evol Ecol* 13: 619-639.
- De Cock R, Matthysen E.** 2001. Do glow-worm larvae (Coleoptera: Lampyridae) use warning coloration? *Ethology* 107: 1019-1033.
- Derby CD, Harpaz S.** 1998. Physiology of chemoreceptor cells in the legs of the freshwater prawn, *Macrobrachium Rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol A* 90: 85-91.
- Dettner K.** 1987. *Chemosystematics and evolution of beetle chemical defenses*. *Annu Rev Entomol* 32: 17-48.
- Eisner T.** 2005. *For love of insects*. Cambridge (MA): Harvard University Press. 448 pp.
- Eisner T, Eisner M, Siegler M.** 2005. *Secret weapons: defenses of insects, spiders, scorpions, and other many-legged creatures*. Cambridge (MA): Belknap Press of Harvard Uni. Press. 372 pp.
- Eisner T, Wiemer DF, Haynes LW, Meinwald J.** 1978. Lucibufagins: defensive steroids from the fireflies *Photinus ignites* and *P. marginellus* (Coleoptera: Lampyridae). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 75: 905-908.
- Eisner T, Goetz MA, Hill DE, Smedley SR, Meinwald J.** 1997. Firefly 'femmes fatales' acquire defensive steroids (lucibufagins) from their firefly prey. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94: 9723-9728.
- Fu XH, Ballantyne L, Lambkin CL.** 2010. *Aquatica* gen. nov. from mainland China with a description of *Aquatica wuhana* sp. nov. (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae). *Zootaxa* 2530: 1-18.
- Fu XH, Meyer-Rochow VB, Tyler J, Suzuki H, De Cock R.** 2009. Structure and function of the eversible organs of several genera of larval firefly (Coleoptera: Lampyridae). *Chemoecology* 19: 155-168.

- Fu XH, VencI FV, Ohba N, Meyer-Rochow VB, Lei C, Zhang Z.** 2007. Structure and function of eversible glands of the aquatic firefly *Luciola leii* (Coleoptera: Lampyridae). *Chemoecology* 17: 117-124.
- Gilbert W.** 2008. A walk around the pond: insects in and over the water. Cambridge (MA): Harvard Univ. Press. 286 pp.
- González A, Schroeder F, Meinwald J, Eisner T.** 1999. N-methylquinolinium 2-carboxylate, a defensive betaine from *Photuris versicolor* fireflies. *J Nat Prod* 62: 378-380.
- Gullan PJ, Cranston PS.** 2005. The insects: an outline of entomology (3 ed). Malden (MA): Blackwell Publishing. 528 pp.
- Ho JZ, Jiang BH.** 1997. Two firefly species with aquatic larvae in Taiwan. *Nat Conser Quart* 17: 42-46.
- Ho JZ, Jiang BH.** 2002. Shadows of firefly glowing on the water-the conservation and recovery of aquatic firefly. Jiji Township (Nantou): Taiwan Endemic Species Research Institute. 156 pp.
- Ho JZ, Chu JS.** 2002. Firefly-watching map in Taiwan. Taichung: Morning Star Publ. 320 pp.
- Ho JZ, Chiang PH, Yang PS.** 2006. A new rearing method for an aquatic firefly, *Luciola ficta* (Coleoptera: Lampyridae). *Formosan Entomol* 26: 77-85. (in Chinese)
- Knight M, Glor R, Smedley SR, Gonzalez A, Adler K, Eisner T.** 1999. Two cases of firefly toxicosis in lizards. *J Chem Ecol* 25: 1981-1986.
- Lloyd JE.** 1973. Firefly parasites and predators. *Coleopt Bull* 27: 91-106.
- Lovell T.** 1998. Nutrition and feeding of fish. Norwell (MA): Kluwer Academic Publisher. 271 pp.
- Moore BP, Brown WV.** 1981. Identification of warning odour components, bitter principles and antifeedants in an aposematic beetle: *Metriorrhynchus rhipidius* (Coleoptera: Lycidae). *Insect Biochem* 11: 493-499.
- Morgan ED.** 2010. Biosynthesis in insects, advance edition. Cambridge, UK: RSC Publ. 362 pp.
- Ohba N, Hidaka T.** 2002. Reflex bleeding of fireflies and prey-predator relationship. *Sci Rep Yokosuka City Mus* 49: 1-12.
- Okada YK, Naba HK.** 1928. Two Japanese aquatic glowworm. *Trans Entomol Soc London* 76: 101-107.
- Poinar GO, Marshall CJ, Buckley R.** 2007. One hundred million years of chemical warfare by insects. *J Chem Ecol* 33: 1663-1669.
- Sagegami-Oba R, Takahashi N, Oba Y.** 2007. The evolutionary process of bioluminescence and aposematism in cantharoid beetles (Coleoptera: Elateroidea) inferred by the analysis of 18S ribosomal DNA. *Gene* 400: 104-113.
- Sivinski J.** 1981. The nature and possible functions of luminescence in

- Coleoptera larvae. *Coleopt Bull* 35: 167-179.
- Sydow H, Lloyd JE.** 1975. Distasteful fireflies sometimes emetic, but not lethal. *Fla Entomol* 58: 312.
- Trice E, Tyler J, Day JC.** 2004. Description of pleural defensive organs in three species of firefly larvae (Coleoptera: Lampyridae). *Zootaxa* 768: 1-11.
- Tyler J.** 2001a. Are glow-worms *Lampyris noctiluca* (Linnaeus) (Lampyridae) distasteful? *The Coleopterist* 9: 148.
- Tyler J.** 2001b. A previously undescribed defence mechanism in the larval glow-worm *Lampyris noctiluca* (Linnaeus) (Lampyridae). *The Coleopterist* 10: 38.
- Tyler J, Trice E.** 2001. A description of a possible defensive organ in the larva of the European glow-worm *Lampyris noctiluca* (Linnaeus) (Lampyridae). *The Coleopterist* 10: 75-78.
- Underwood TJ, Tallamy DW, Pesek JD.** 1997. Bioluminescence in firefly larvae: a test of the aposematic display hypothesis (Coleoptera: Lampyridae). *J Insect Behav* 10: 365-370.
- Webster CD, Lim C.** 2002. Nutrition requirements and feeding of finfish for aquaculture. Wallingford (Oxton): CABI Publ. 418 pp.

收件日期：2011年12月12日

接受日期：2012年3月14日

Chemical Defense of Aquatic Larvae of the Firefly (*Aquatica ficta*): Microanatomy of Eversible Organs, Chemicals of Glandular Secretion, and Effectiveness to Different Predators

Chun-Tai Chen¹, Chia-Hsiung Wu¹, Ming-Luen Jeng², and Ping-Shih Yang^{1*}

¹ Department of Entomology, College of Bio-Resources and Agriculture, National Taiwan University, 10617 No. 1, Sec. 4, Roosevelt road, Taipei city, Taiwan

² Department of zoology, National museum of natural science, 40453, No. 1 Guacian road, Taichung city, Taiwan

ABSTRACT

The larval chemical defenses of the Yellow-rimmed Aquatic Firefly, *Aquatica ficta* (Olivier), were studied. The larvae, when simulated by touch, would curl up their body into a ball and stretch their forked-shape eversible organs accompanied with a pine-odor. Ten pairs of eversible organs are located bilaterally on meso- and metathoracies, as well as on the first 8 abdominal segments, just above the abdominal tracheal gills. The external surface of the eversible organs of the fifth-instar larvae bears many bud-like micro-protuberances, each with 3-6 spines radially arranged on the top. No significant ultrastructure was found within the micro-protuberance. On the internal surface of the eversible organs there are many hemispherical structures, which have rich mitochondria inside, each of which is connected to a micro-protuberance on the external surface with a tubule. These hemispherical structures are believed to be the secretion glands. Four kinds of predators were used to test the effectiveness of the chemical defense of the firefly larvae. The larvae successfully defended against attacks by Dojo Loaches (*Misgurnus anguillicaudatus*), and were unharmed ejected out of the mouth of the loach. The larvae were hunted and partially consumed by damselfly naiads (of Coenagrionidae). Freshwater prawns (Palaemonidae, *Macrobrachium lar*) were able to mechanically neutralize the chemical defense of the firefly larvae and consumed the whole larval body. This suggests that the larval chemical defense is less effective against invertebrate predators, although the predator may eventually abandon the dead prey. Using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), we identified nine chemical components, plus another three unknown substances, that were extracted from the larval eversible organs. The identified components are largely monoterpene compounds, such as terpinolene, L-(-)-verbenone, (-)-sabinene, limonene, and γ -terpinene, etc. Among them terpinolene has the richest content (20.87%) and was chosen for a bioassay test. Agar-based pellets containing commercial fish food and three different concentrations of terpinolene (0.0425, 0.425 and 4.25%) were fed to the Dojo loaches and freshwater prawns (*Macrobrachium lar*) to determine their deterrence. Pellets of each of the three concentrations showed a deterrent effect of different degrees to the subject predators in relation to non-terpinolened pellets. The higher the concentration, the stronger the deterrence. Dojo loaches showed a 30-95% deterrent efficiency. Freshwater prawns were less sensitive to terpinolene than loaches, and showed a 20-80% deterrent efficiency. The terpinolene secreted by the larval eversible organs was confirmed to be a repellent against predators.

Key words: *Aquatica ficta*, larvae chemical defense, predators, terpinolene, bioassay

* Corresponding email: psyang@ntu.edu.tw