



人工光源對黃緣螢幼蟲基因表現之影響

陳韻如^{1†}、曾德維^{2†}、姜安蓉¹、吳加雄³、蕭忠義⁴、唐欣潔⁴、鍾思林²、楊恩誠^{1*}

¹ 國立臺灣大學生物資源暨農學院昆蟲學系

² 香港中文大學生命科學院

³ 國立臺北護理健康大學通識教育中心

⁴ 臺北市立動物園保育研究中心

† 共同第一作者

* 通訊作者 email: ecyang@ntu.edu.tw

收件日期：2018 年 7 月 11 日 接受日期：2018 年 9 月 7 日 線上刊登日期：2018 年 10 月 10 日

摘 要

近年來人工光源對螢火蟲族群維持帶來的衝擊與影響引起重視，雖有研究指出夜間人工照明會中斷螢火蟲交尾行為，但人工光源對螢火蟲幼蟲是否會造成影響仍待探討。本研究利用次世代定序技術，從分子層次探討黃緣螢 (*Aquatica ficta* Olivier) 幼蟲夜間暴露在人工光源下的基因表現。定序總共生成約 532.8M RNA-seq reads，組裝出 208,672 條轉錄子，其中 60,410 條轉錄子完成功能註釋。差異性表現基因分析結果顯示，在夜間光照處理 14 天後，檢測到 1,450 個差異性表現基因，其中 58 條轉錄子表現被啟動 / 表現量上升，1,392 條轉錄子停止表現 / 表現量下降。我們進一步分析差異性表現基因的生理功能分析，發現表現被啟動 / 表現量上升的轉錄子功能群與「內分泌調節」、「青春激素代謝」、「氧化還原途徑」等相關；而停止表現 / 表現量下降的轉錄子功能則與「生物合成核糖核蛋白複合物」、「初級代謝途徑大分子代謝途徑」、「細胞生物合成途徑」、「有機物質生物合成途徑」以及「滲透壓反應」相關。目前證據顯示短期夜間光照對螢火蟲幼蟲基因表現確實造成影響，但光照後對於螢火蟲幼蟲發育是否造成長期的影響仍待更多證據釐清。

關鍵詞：黃緣螢、夜間照明、轉錄組、差異性表現基因。

前 言

螢火蟲以其夜間的發光行為而廣為人所喜愛，其以產生不同頻率的生物螢光 (bioluminescence) 進行溝通以及求偶。然而過去數十年來，隨著人類活動、農地開發與棲地破壞、人為噪音、甚至化學藥劑的使用，導致螢火蟲的數量越來越少 (Yang, 1998; Ho *et al.*, 2010; Picchi *et al.*, 2013)，除了以上因素

之外，近年來越來越多研究指出，夜間的人工光源 (artificial light at night, ALAN) 造成的光害也是造成螢火蟲數量減少的元兇之一 (Yang, 1998; Hagen *et al.*, 2015; Costin and Boulton, 2016; Firebaugh and Haynes, 2016)。

光害在此泛指人造燈具等人工產品所溢散出的光源，全世界超過 80% 的地方暴露在有光害的環境底下 (Falchi *et al.*, 2016)，目前已知夜間的人工光

害會影響生物活動包括生物生理、生物行為、生物繁殖、甚至延伸到族群結構等，確切的影響程度目前仍缺乏系統性的調查，但可確認的是影響層面深遠 (Longcore and Rich, 2004; Gaston and Bennie, 2014)。螢火蟲利用發光進行溝通與求偶的特別習性，受限於環境光度影響。由於螢火蟲所發的光與日光相比微弱許多而在白天無法辨識，螢火蟲發光的時間和求偶行為與環境光亮度和日光週期緊密相關 (Lall *et al.*, 1980; Firebaugh and Haynes, 2016)。雖然短時間觀察顯示夜間的人工光源對螢火蟲族群數量不會造成影響，但是會改變甚至中斷螢火蟲的發光 / 求偶行為 (Costin and Boulton, 2016; Firebaugh and Haynes, 2016; Owens *et al.*, 2018)。暴露在夜晚有光害的環境下，螢火蟲的發光行為會減少至少 69.69% (Firebaugh and Haynes, 2016)，而螢火蟲的活動頻率會減少約 47~87% (Hagen *et al.*, 2015)；以黃緣螢 (*Aquatica ficta*) 為例，在波長小於 533 nm 人工光源干擾時，雄蟲所發出的閃光亮度會隨著人工光源光度增加而增加，但頻率會隨著光度增加而減低甚至不再發光 (Owens *et al.*, 2018)。增加發光強度會造成額外能量消耗增加，為了補償過度消耗的能量，螢火蟲會轉而使用體內所儲存的其他能源，如生殖系統 (Lloyd, 2006)。以北美螢火蟲 (*Photinus collustrans*) 為例，如果成蟲在羽化一周內無法完成交尾產卵，平均每日可能消耗約 7 顆卵來補償額外消耗的能量 (Wing, 1989; Lloyd, 2006)。因此，除了干擾交尾行為外，夜間光害甚至會導致螢火蟲後代數量大量下降。

已經有越來越多的證據顯示，夜間光害會影響螢火蟲成蟲的發光行為、中斷交尾，進而減少後代數量，但夜間光害對於螢火蟲幼蟲是否會產生影響仍待釐清。目前針對螢火蟲幼蟲野外的行為研究很少，因此除了存活率以外，缺乏衡量螢火蟲幼蟲健康與否的生長指標。為了釐清光害對螢火蟲幼蟲是否會造成影響，本研究以人工飼養系統完善建立、台灣最常見的水生螢火蟲黃緣螢作為研究對象，利用次世代定序技術，從分子生物學層面剖析暴露在夜間光害的環境下，螢火蟲幼蟲基因表現是否會受到影響，此研究的結果除了能剖析光害對螢火蟲幼蟲的影響外，其中所建立的轉錄組，亦可作為篩選指標基因提供未來判斷黃緣螢幼蟲生長指標使用。

材料與方法

一、黃緣螢幼蟲

黃緣螢三齡幼蟲採集自臺北市木柵區木柵路一段 290 號之永建生態園區 (經度 24.9880999, 緯度 121.55532500000004) 與台北市立動物園飼養的群落，兩群幼蟲混合飼養，並採用 Ho *et al.* (2006) 之人工飼育方式，於室內人工環境飼養，採用此方式飼育之幼蟲，能完成其生活史羽化至成蟲。幼蟲飼養環境室內有對外窗戶，確保室內有自然光源照入室內，螢火蟲幼蟲共 32 隻隨機分成兩組飼養於水盆內，水高維持約 2~3 公分，飼養盆大小長 × 寬 × 高為 21 × 18 × 8 公分。黃緣螢幼蟲飼育水源，採用自來水，但飼育前曝氣七天確保水中餘氯能充分揮發，再用於飼育幼蟲，飼養盆內放置打氣幫浦，維持水中溶氧量。每兩天提供新鮮田螺 (*Sinotaia quadrata quadrata*) 之腹足餵食，並於餵食後第二天移除幼蟲未食畢之螺肉，同時清洗飼養盆，避免剩餘螺肉污染水質，水中溶氧下降，造成幼蟲大量死亡。

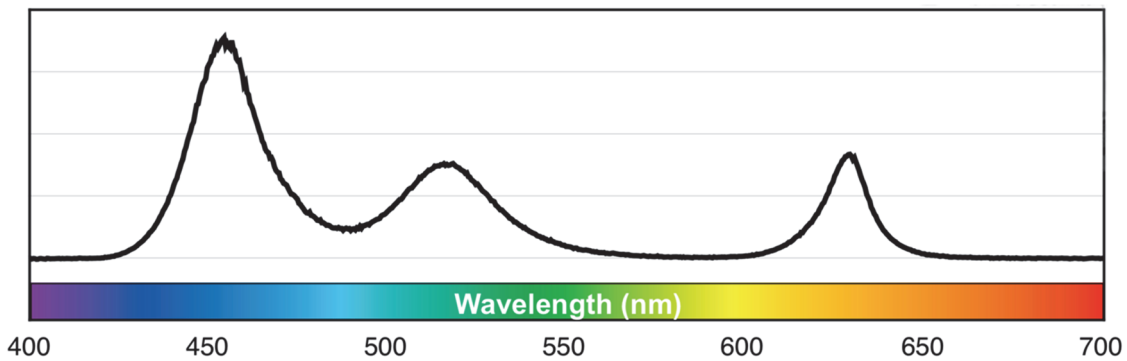
二、光害處理試驗

四條 LED 白光燈條 (30 cm, 每條 18 個燈源，燈光為紅 / 藍 / 綠三色組合而成的白光) (溢散光譜見圖一) 占空比 (duty cycle) 小於 100%，燈源上覆蓋十張 A4 白紙以達到彌散的效果，最終釋放出來的光度約為 0.001 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。光照時間由 LED MAX STAR OTM407 機械式定時器操控，於傍晚 18:00 開始亮燈直到隔天早上 06:00，對照組在日落後沒有提供人工光源做為基準，14 天後，幼蟲隨機分成 3 組，每組 4~5 隻幼蟲，進行 RNA 萃取。

三、RNA 萃取與 RNA-seq 資料庫建構

黃緣螢幼蟲在 RLT 緩衝液內磨碎後 (Qiagen 試劑組提供) 快速震盪 15 秒，並放置於冰上 10 分鐘待組織細胞分解釋出核酸，隨後以 14,000 rpm 高速離心沈澱組織碎片，上清液移入新的 1.5 ml 微量離心管，依據 RNAeasy® Mini Kit (Qiagen) 使用者手冊進行 total RNA 萃取。RNA 量利用 Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer 進行測定，RNA 以膠體電泳確認沒有降解後，取約 20 μg total RNA 進行 RNA-seq 資料庫製備。

鏈特异性 (strand-specific) RNA-seq 資料庫建構流程依據 Zhong *et al.* (2011) 方法製備，簡介如下：polyA RNA 以 Dynabeads® oligo dT25



圖一 實驗使用之 LED 燈條溢散光譜。

Fig. 1. Emission spectrum of LED used in this assay.

(ThermoFisher Scientific) 分離出來，隨後以含有 random hexamer 和 oligo dTVN (NEB) 的 2 × 反轉錄緩衝液加熱至 94°C 處理 6 分鐘，回溶並且打斷 polyA RNA，第一股 cDNA 以 ProtoScript II First Strand cDNA synthesis kit (NEB) 合成，於 45°C 下進行反應 45 分鐘，第二股 cDNA 使用 DNA polymerase I (NEB) 和 RNase H (NEB) 合成，並以 dNTP mix (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP mix, 和 4 mM dUTP, ThermoFisher) 作為合成材料，反應條件為 16°C 作用三個小時。雙股 cDNA 隨後使用 NEBNext® Ultra™ End Repair/dA-Tailing Module (NEB) 進行末端修復與 dATP 添加，再與 Y-shape Illumina adapter 接合，產物隨後以 uracil DNA glycosylase (NEB) 於 37°C 處理 15 分鐘，產物最終以帶有標碼的引子對增幅，定序在 Illumina HiSeq 定序平台以 paired-end 150 bp 定序完成。

四、轉錄組組裝

定序後得到的 raw reads 在使用 ShortRead package (Morgan *et al.*, 2009) 移除品質不好、或是可比對上 ribosomal RNA、adapter、和 PCR 引子對的產物後，以 Trinity package (Grabherr *et al.*, 2011) 進行轉錄組組裝 (k-mer= 17)，轉錄子長度長於 200 nt 者判定為有效轉錄子並保留，組裝完成後的轉錄組與 NCBI nr (NCBI non-redundant protein sequences, updated 2016/10/26) 數據庫進行比對 (NCBI nr 數據庫包含所有物種的功能性基因)，預測轉錄子的可能功能。

轉錄子表現量計算與差異性表現基因分析

樣本所得到的 raw read 以 Bowtie2

(Langmead and Salzberg, 2012) 比對回組裝好的轉錄組，計算每個轉錄子所產生的 raw read 數量，再以 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads; Trapnell *et al.*, 2010) 方法計算相對表現量。差異性表現基因 (differentially expressed genes, DEGs) 使用 edgeR (Robinson *et al.*, 2010) 進行計算，以對照組 (無光照組) 作為比對基準，尋找實驗組 (光照組) 中表現量改變的轉錄子，統計計算後以 FDR (false discovery rate)，即 q value 小於 0.05 判定有顯著差異，判定該基因為差異性表現基因。

差異性表現基因的功能分群分析

為了釐清功能分群 (Gene Ontology, GO)，差異性表現基因再以 GSEABase (Morgan *et al.*, 2007) 從 1. Biological Process、2. Cellular Components、和 3. Molecular Functions 三個層面進行功能分群分析，得到的結果以 Quick GO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) 預測功能群分佈，並探討功能註釋較為詳盡的第 4 到第 6 分層者。

結 果

黃緣螢幼蟲轉錄組組裝與轉錄子表現量推測

黃緣螢幼蟲光照試驗並完成取樣與定序，總共產出 266,605,866 條 RNA-seq paired-end reads，移除可比對回 16S 和 adapter 及 PCR 引子對的序列後，其餘 266,457,671 條 paired-end reads 使用於轉錄組組裝 (附表一)。組裝完成得到共 208,672 條轉錄子 (表一)，其中 60,410 條轉錄子 (約 28.95%) 與 NCBI nr 資料庫比對後有完功能預測 (表一)，raw reads 已上傳至 NCBI (Accession

表一 黃緣螢幼蟲轉錄組統計結果

Table 1. Assembly statistics for the transcriptome of *A. ficta* larvae

N25 (nt)	N50 (nt)	N75 (nt)	Longest (nt)	Mean (nt)	Median (nt)	Shortest (nt)	N_Contigs	Annotated
1320	468	289	26285	456.29	298	201	208672	60410

number: PRJNA479555)。我們隨後進行轉錄子表現量計算，FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 值 ≥ 3 者判定為「有表現」，小於 3 FPKM 者則判定為「沒有表現」，以此條件篩選下，在對照組與實驗組內的有表現轉錄子數量分別為 13,895 (佔總轉錄子數目的 6.66%) 和 10,731 (佔總轉錄子數目的 5.14%)，兩組合計包含重複部分有表現的轉錄子總共為 15047 個。

光照後差異性表現基因分析

差異性表現基因分析以在實驗組或對照組內有表現的轉錄子進行，並以表現量改變大於兩倍 (FPKM fold change ≥ 2 或 ≤ 0.5) 做進一步篩選，分析後總共得到 1450 DEGs (differentially expressed genes)，各個轉錄子表現量見附表二、附表三；佔 0.69% 總轉錄子數，9.6% 有表現轉錄子數。總 DEGs 再以「啟動」(activated)、「表現量上升」(up-regulated)、「表現量下降」(down-regulated) 與「關閉」(repressed) 分類，轉錄子在對照組內沒有表現但在實驗組表現者分類為「啟動」，轉錄子在對照組內有表現但在實驗組沒有表現者分類為「關閉」，轉錄子在對照組內與實驗組均有表現者僅表現量上升或下降大於兩倍以上 (FPKM fold change > 2 或 ≤ 0.5) 則分類為「表現量上升」與「表現量下降」，以此標準分群後，總共有 23 與 35 轉錄子表現量上升或啟動，26 與 1366 個轉錄子表現量下降或關閉。

我們針對差異性表現基因分析其功能分群，並依據 1. Biological Process、2. Cellular Components 和 3. Molecular Functions 三個層面進行分析，所得到的結果用 Quick GO 生成功能群分佈圖 (附圖一至附圖六)，GO 分佈中以分佈在第 4 層到第 6 層的功能群者功能註釋較為詳盡又不會太狹隘，因此取該層面 GO 做進一步討論 (結果如表二)。在 Biological Process 層面，表現量上升 / 啟動的轉錄子功能與 digestion, oxidation-reduction, hormone regulation 和 phototaxis

relative process 相關 (表二)，出乎意料的，我們在 regulation of hormone levels (Level 4) 和 hormone metabolism process (level 5) 下第 9 與第 10 階層的功能群內，發現青春激素代謝途徑 (juvenile hormone metabolism relative processes) (圖二)，顯示青春激素代謝途徑相關轉錄子在光照後表現量上升。而在光照後，超過一千個轉錄子表現量下降或關閉，其功能分群則座落在與 protein metabolism, macromolecule metabolism, gene expression 和 several stress responses 相關途徑 (表二)。在 Cellular Component 層面，表現量上升 / 啟動的轉錄子功能與 respiratory chain, non-membrane-bounded organelle 和 pseudopodium 相關，而表現量下降或關閉的轉錄子功能分群則與 plasmodesma, intracellular process 和 organelle 相關 (表二)。在 Molecular Function 層面，表現量上升 / 啟動的轉錄子功能與 tetrapyrrole binding, heme binding 和 transferase activity 相關，表現量下降或關閉的轉錄子功能分群則與 pheromone binding, RNA and ribosome binding, protein phosphorylate amino acid binding, gene expression 及 poly(A) RNA binding 相關 (表二)。

討 論

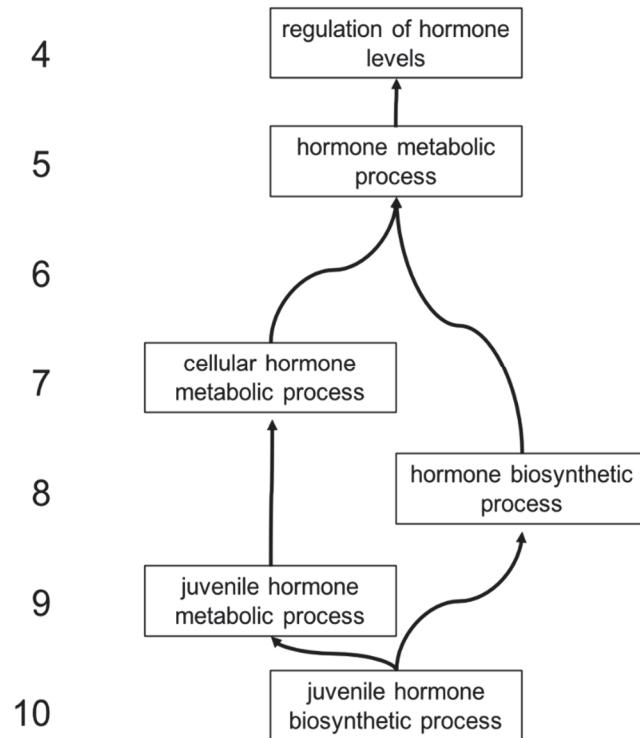
在過去數十年來，螢火蟲的數量隨著人類活動而減少，除了棲地破壞、農藥使用等因素外，光害干擾成蟲的活動與交尾行為亦是主因之一 (Wing, 1989; Costin and Boulton, 2016; Firebaugh and Haynes, 2016)。目前大部分的研究均針對光害對螢火蟲成蟲行為的影響，鮮少有針對幼蟲受到的影響進行探討，也因此本研究利用次世代定序技術大規模的檢測暴露在夜間光害環境下螢火蟲幼蟲基因表現的改變，並檢測到約 9.64% (1450 差異性表現者 / 15047 有表現者) 有表現的轉錄子在光害環境下表現量改變，也間接顯示出光害會影響螢火蟲幼蟲的生理平衡。

表二 黃緣螢幼蟲在夜間光照兩週後差異性表現基因功能分群分析結果

Table 2. GO terms from levels 4 to 6 of upregulated/activated and downregulated/repressed unigenes in *A. ficta* larvae exposed to low levels of artificial night lighting over 2 weeks

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

*黑體字為本次研究著重的功能群。



圖二 青春激素相關途徑的簡化分佈圖。圖由附圖一 Biological process 功能分群圖紅框標記處簡化繪製。功能群之座落分層如左邊標示，圖中僅顯示第四到第十層。

Fig. 2. Distribution of terms related to juvenile hormone metabolism. The figure is derived and refined from the region of the red box, GO tree of biological process, sFig. 1. The levels of terms are labeled at the left panel. Only terms from levels 4 to 10 are shown.

本研究主要著重在夜間光害對螢火蟲幼蟲生理上的影響，因此以下討論主要針對 **Biological process** 分群結果陳述。我們檢測到功能與青春激素相關的轉錄子表現量上升，顯示出光照對於幼蟲發育可能會有影響。青春激素為調控昆蟲發育、變態、生殖等各種恆定行為的重要激素，以家蠶 (*Bombyx mori*) 為例，青春激素會調控前胸線 (prothoracic gland) 與促前胸線激素 (prothoracicotropic hormone, PTTH) 的量，進而影響褪皮激素 (ecdysone) 的生成，在青春激素缺乏的狀態下，家蠶會提早變態發育為成蟲 (Williams *et al.*, 1976; Daimon *et al.*, 2012)，而促前胸線激素不正常的表現會造成家蠶蛻皮及變態異常甚至失敗 (Sakurai *et al.*, 1988; Uchibori-Asano *et al.*, 2017)。果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 研究中指出，青春激素缺乏雖然不會影響幼蟲蛻皮時間，但是會影響幼蟲體型 (Mirth *et al.*, 2013)，而果蠅幼蟲暴露在青春激素類似物的環境中，會導致成蟲發育不全、成蟲畸形、羽化率降低等情形 (Riddiford and Ashburner, 1991)。此外，餵食甜菜夜蛾

(*Spodotera exigua*) 幼蟲青春激素的同構物時，會讓幼蟲體型增大，甚至發育出第六齡超齡幼蟲 (supernumerary larvae) (Lasa *et al.*, 2007)。因此，如果螢火蟲幼蟲長期處在青春激素表現量上升的狀況下，蛻皮失敗、幼蟲快速生長、或是成蟲器官發育異常等現象很有可能會發生。此推測需要進一步實驗加以證實。

除了青春激素相關途徑外，我們在表現量上升的功能群內檢測到了趨光性 (phototaxis)。趨光性可分為正趨光性或負趨光性 (Jékely, 2009)，而螢火蟲成蟲的趨光性會因為配偶發出訊號而啟動 (Booth *et al.*, 2004)。在此分群內我們無法確認檢測到的為正趨光性或負趨光性，且螢火蟲幼蟲的發光器主要作為警戒訊號，而非與同類互動溝通 (Lewis and Cratsley, 2008)，因此本實驗中所檢測到的趨光性推測可能受到夜間光源啟動，讓幼蟲尋找遮蔽處躲藏或是其他對光所產生的反應。

超過一千個轉錄子 (約 9.3% 有表現轉錄子) 在夜間光害環境下表現量下降或是被關閉，從 **Biological Process** 層面檢測，發現其功能群與

primary metabolism process, cellular biosynthesis process 和 gene expression 相關，我們在 Molecular Function 層面更確認 polyA RNA binding 和 rRNA binding 相關功能群表現量下降。其下降原因可能與其他 9%有表現轉錄子表現量下降有關，但概括而言，暴露在光害環境兩週後，部份的轉錄子表現量即受到影響，如在棲地長期暴露在光害下的影響可能更為嚴重。

在此次試驗檢測到的差異性表現基因中，並無檢視到與生物時鐘 (circadian rhythm) 相關的基因有表現差異，推測可能原因是實驗提供的光強度不夠刺激生物時鐘相關基因的表現改變，抑或是螢火蟲的生物時鐘相關基因與其他模式物種不同，因此無法在現有的資料庫中找到相關線索，不論何者，仍不能排除光害影響螢火蟲幼蟲生物時鐘的可能性。

總結，此研究利用次世代定序技術，檢測黃緣螢幼蟲暴露在夜間光害下基因表現的改變，我們檢測到超過一千個轉錄子在光害環境下表現量改變，其中與青春激素代謝 (juvenile hormone metabolism relative process) 和趨光性 (phototaxis) 相關途徑的轉錄子表現量上升，而與蛋白質代謝 (protein metabolism)、大分子代謝 (macromolecule metabolism)、基因表現 (gene expression) 和數個與緊迫反應相關途徑表現量下降，顯示短期夜間光害即可對黃緣螢幼蟲造成顯著的影響，長期光照所造成的影響待進一步研究探討。

數據

黃緣螢幼蟲 RNA-seq raw reads 已上傳至 NCBI，Accession number: PRJNA479555，連結如下：<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/study/?acc=SRP151967>。

致謝

本研究感謝樹花園高士弼與王億傑協助黃緣螢幼蟲採集以及飼養。

參考文獻

- Booth D, Stewart AJA, Osorio D. 2004. Colour vision in the glow-worm *Lampyrus noctiluca* (L.) (Coleoptera: Lampyridae): evidence for a green-blue chromatic mechanism. *J Exp Biol* 207: 2373-2378.
- Costin KJ and Boulton AM. 2016. A field experiment on the effect of introduced light pollution on fireflies (Coleoptera: Lampyridae) in the piedmont region of Maryland. *Coleopt Bull.* 70(1): 84-86.
- Daimon T, Kozaki T, Niwa R, Kobayashi I, Furuta K, Namiki T, Uchino K, Banno Y, Katsuma S, Tamura T, Mita K, Sezutsu H, Nakayama M, Itoyama K, Shimada T. 2012. Precocious metamorphosis in the juvenile hormone-deficient mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS Genet* 8: e1002486.
- Falchi F, Cinzano P, Duriscoe Dan, Kyba CCM, Elvidge CD, Baugh K, Portnov BA, Rybnikova NA, Furgoni R. 2016. The new world atlas of artificial night sky brightness. *Sci Adv* 2: e1600377.
- Firebaugh A, Haynes KJ. 2016. Experimental tests of light-pollution impacts on nocturnal insect courtship and dispersal. *Oecologia* 182: 1203-1211.
- Gaston KJ, Bennie J. 2014. Demographic effects of artificial nighttime lighting on animal populations. *Environ Rev* 22: 323-330.
- 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.
- Hagen O, Santos RM, Schlindwein MN, Viviani VR. 2015. Artificial night lighting reduces firefly (Coleoptera: Lampyridae) Occurrence in Sorocaba, Brazil. *Adv. Entomol* 3: 24-43.
- 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)
- Ho JZ, Chiang PH, Wu CH, Yang PS. 2010. Life cycle of the aquatic firefly *Luciola ficta*

- (Coleoptera: Lympyridae). *J Asia-Pacific Entomol* 13: 189-196.
- Jékely G.** 2009. Evolution of phototaxis. *Phil Trans R Soc B* 364: 2795-2808.
- Lall AB, Seliger HH, Biggley WH, Lloyd JE.** 1980. Ecology of colors of firefly bioluminescence. *Science* 210: 560-562.
- Langmead B, Salzberg S.** 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9: 357-359.
- Lewis SM, Cratsley CK.** 2008. Flash signal evolution, mate choice, and predation in fireflies. *Annu Rev Entomol* 53: 293-321.
- Lloyd JE.** 2006. Stray light, fireflies, and fireflyers. pp. 345-364. In: Rich C, Longcore T. (eds) *Ecological Consequences of Artificial Night Lighting*. Island Press, Washington DC.
- Longcore T, Rich C.** 2004. Ecological light pollution. *Front Ecol Environ* 2: 191-198.
- Mirth CK, Tang HY, Makohon-Moore SC, Salhadar S, Gokhale RH, Warner RD, Koyama T, Riddiford LM, Shingleton AW.** 2013. Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila*. *PNAS* 111: 7018-7023.
- Morgan M, Falcon S, Gentleman R.** 2007. GSEABase: Gene set enrichment data structures and methods. R package version 1.12.2.
- Morgan M, Anders S, Lawrence M, Aboyoun P, Pagès H, Gentleman R.** 2009. Short-Read: a bioconductor package for input, quality assessment and exploration of high-throughput sequence data. *Bioinformatics* 25: 2607-2608.
- Owens CSA, Meyer-Rochow VB, Yang EC.** 2018. Short and mid-wavelength artificial light influences the flash signals of *Aquatica ficta* fireflies (Coleoptera: Lympyridae). *PLoS ONE* 13: e0191576
- Picchi MS, Avolio L, Azzani L, Brombin O, Camerini G.** 2013. Fireflies and land use in an urban landscape: the case of *Luciola italica* L. (Coleoptera: Lampyridae) in the city of Turin. *J Insect Conserv* 17: 797-805.
- Riddiford LM, Ashburner M.** 1991. Effects of juvenile hormone mimics on larval development and metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Gen Comp Endocrinol* 82: 172-183.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK.** 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139-140.
- Lasa R, Caballero P, Williams T.** 2007. Juvenile hormone analogs greatly increase the production of a nucleopolyhedrovirus. *Biol Cont* 41: 389-396.
- Sakurai S, Okuda M, Ohtaki T.** 1988. Juvenile hormone inhibits ecdysone secretion and responsiveness to prothoracicotrophic hormone in prothoracic glands of *Bombyx mori*. *Gen Comp Endocrinol* 75: 222-230.
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L.** 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotech* 28: 511-515.
- Uchibori-Asano M, Kayukawa T, Sezutsu H, Shinoda T, Daimon T.** 2017. Severe developmental timing defects in the prothoracicotrophic hormone (PTTH)-deficient silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 87: 14-25.
- Williams SB, Ohta T, Cleere JS, Marsella PA.** 1976. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. *Science* 193: 542-547.
- Wing SR.** 1989. Energetic costs of mating in a flightless female firefly, *Photinus collustrans* (Coleoptera: Lampyridae). *J Insect Behav* 2: 841-847.
- Yang PS.** 1998. The study of the fireflies in Taiwan in the past and future. *The Ecology and Conservation of the Fireflies Symposium*. p. 1-9. (in Chinese).
- Zhong S, Joung JG, Zheng Y, Chen YR, Liu B,**

Shao Y, Xiang JZ, Fei Z, Giovannoni JJ.
2011. High-throughput Illumina strand-
specific RNA sequencing library

preparation. Cold Spring Harb. Protoc.
2011: 940-949.

The Impact of Artificial Light on *Aquatica ficta* Larvae Transcriptome

Yun-Ru Chen¹, David, Tzeng², Avalon Celeste Stevahn Owens¹, Chia-Hsiung Wu³, Chung-Yi Hsiao⁴, Hsin-Chieh Tang⁴, Silin Zhong², and En-Cheng Yang^{1*}

¹ Department of Entomology, National Taiwan University

² School of Life Science, The Chinese University of Hong Kong

³ National Taipei University of Nursing and Health Science, General Education Center

⁴ Taipei Zoo, Conservation and Research Center

* Corresponding email: ecyang@ntu.edu.tw

Received: 11 July 2018

Accepted: 7 September 2018

Available online: 10 October 2018

ABSTRACT

Artificial light at night (ALAN) is considered one of the factors causing a decline in the firefly population. Although several studies have evaluated mechanisms through which ALAN interferes with the courtship of fireflies, the effect of ALAN on firefly larvae remains unknown. To investigate the effect of light pollution on firefly larvae from the molecular perspective, we used the next-generation sequencing method to profile the transcriptome of the larvae of yellow-rimmed firefly, *Aquatica ficta* Olivier, under artificial light treatment during the night time. A total of 532.8 million RNA-seq reads were generated for the transcriptome assembly from the firefly larvae exposed to artificial light as well as from those exposed to a regular light-dark cycle. Approximately 208,672 transcripts (unigenes) were obtained, and 60,410 unigenes were annotated. Compared with the control, we identified 1,450 differentially expressed genes (DEGs) from the larvae that underwent ALAN treatment during the dark cycle. From the 1,450 DEGs, 58 and 1,392 unigenes were found to be activated/upregulated and inactivated/downregulated, respectively. Subsequently, we performed gene ontology analysis and found that activated/upregulated unigenes are enriched in terms related to hormone level regulation, juvenile hormone metabolism, and oxidation-reduction process, whereas inactivated/downregulated unigenes are enriched in terms related to ribonucleoprotein complex biogenesis, primary metabolic process, macromolecule metabolic process, cellular biosynthetic process, organic substance biosynthetic process, and response to osmotic stress. Additional evidence is still required to demonstrate the long-term effects of ALAN on the transcriptome profile and development of fireflies.

Key words: *Aquatica ficta*, artificial light at night, transcriptome, Differentially Expressed Genes