



## 溫度改變增加大白斑蝶 (*Idea leuconoe clara* Butler) (Lepidoptera: Nymphalidae) 翅黑化面積

朱清麟、華真、吳立心\*

國立屏東科技大學植物醫學系 91201 屏東縣內埔鄉學府路 1 號

\* 通訊作者 email: lihsinwuu@mail.npust.edu.tw

收件日期：2020 年 5 月 14 日 接受日期：2020 年 7 月 24 日 線上刊登日期：2020 年 8 月 20 日

### 摘 要

大白斑蝶 (*Idea leuconoe clara* Butler) 因為體型大且飛行緩慢，是亞洲蝴蝶園飼養的明星種。大白斑蝶除了原有的黑斑，原本白色的部位也可能出現暗色的黑化情形。同種蝴蝶在不同的緯度會呈現不同的色素沉澱；在台灣與鄰近產地的標本與文獻中，有數筆大白斑蝶黑化的個體紀錄。為了測試飼養溫度是否會產生翅黑化，我們分別在 6 種溫度 15、20、25、30、35、40°C 飼養共 600 隻大白斑蝶，並發現在 35 及 40°C 共有 2 隻黑化的個體，黑化程度佔翅面積為 67~80%，個體黑化的比率僅 0.3%；同時高溫處理下死亡率高達 99%。我們繼續針對 100 隻前蛹停滯期的個體，進行低溫 10°C 持續 12 天與高溫 35、40°C 持續 4 天高溫的衝擊試驗，發現在冷衝擊 12 天的翅黑化程度為 59~69%；然而在 35°C 熱衝擊 4 天的翅黑化程度為 66~75%，40°C 熱衝擊 2 天的試驗黑化程度可達 79~82%，熱衝擊處理後蝴蝶死亡率仍高達 33%，而試驗中總共測試 70 隻大白斑蝶，黑化比率為 12.9%，僅有 9 隻個體。綜上所述，本試驗得知在極端溫度調節下，大白斑蝶翅黑色素沈澱會被調控，造成翅白色部位的黑化呈色，蛹期前期這個特定時間的溫度對黑化部位的黑色素沈澱有重要的影響。

**關鍵詞：**大白斑蝶、極端溫度、黑色素沉澱。

### 前 言

表型可塑性 (phenotypic plasticity) 所指的是所有生物在相同的基因下，表現出不同的生活史、形態等特性。其中溫度對表型可塑性的影響是最重要的環境因子，近年來一直受到科學家廣泛的關注 (Franke *et al.*, 2019)。在許多鱗翅目的昆蟲中，溫度等因子會影響發育並同時導致相同基因型的物種，產生不同的表現型 (Beldade *et al.*, 2011)；特別是動態的溫度調節，會導致蝴蝶產生不同的表現

型 (Roskam and Brakefield, 1999)。季節溫度也能調控很多蝴蝶，使其產生不同表現型的例子，例如熱帶蝴蝶，偏瞳蔽眼蝶 (*Bicyclus anynana*) 在寒冷的季節腹面翅眼紋很小，眼紋周邊的黑色素沉澱較少；然而在高溫的季節，腹面翅的眼紋明顯較大，組成眼紋的黑色素沉澱較多 (Hartfelder and Emlen, 2012)。此外亦有不少蝴蝶隨著海拔、緯度的不同有表型可塑性的現象 (Ellers and Boggs, 2002；Zheng *et al.*, 2015)。在這些例子中，溫度改變了黑色素沉澱的過程，修飾了蝴蝶翅上的斑紋、體色，而

導致有上述不同的翅呈色。黑色素 (melanin) 是一種廣泛的色素，它可以形成於昆蟲體上深色的部分，達到調節體溫及角質硬化等保護目的 (Ture, 2003; Stelbrink *et al.*, 2019)。蝴蝶的翅顏色是在終齡幼蟲後期和蛹期前期被確定的，當前蛹開始蛻皮成蛹時，蛹還是呈現透明/半透明狀態時蛹內部會發送強烈的色素訊號到相對應的呈色位子上。當蛹逐漸變的堅硬，在接近羽化的後期這些色素才會顯示出來，表現出蝴蝶羽化後的翅實際顏色 (Koch *et al.*, 2003; Iwata *et al.*, 2018)。Mateus *et al.* (2014) 也指出在終齡幼蟲化蛹前的徘徊階段，模擬高溫和低溫可以使偏瞳蔽眼蝶 (*Bicyclus anynana*) 有不同的翅眼紋差異。

極端溫度對蝴蝶的影響最嚴重可能會導致死亡，但程度若輕微，則可能對蝴蝶產生翅斑紋上的修飾 (Otaki, 2017)。蝴蝶是變溫動物，對於溫度的壓力可以產生一定的適應性 (Fischer and Karl, 2010)。在長期處於較低溫下飼養的蝴蝶可以減少從冷昏迷恢復的時間，在較高溫下飼養的蝴蝶可以相對增加對熱衝擊的抗性 (Karl *et al.*, 2008)。將青眼蛺蝶 (*Junonia orithya*) 的蛹期前期放置於 (42~44°C) 1~2 天，可以誘導翅出現顏色、翅後翅邊緣斑紋、眼紋出現不同的形態 (Mahdi *et al.*, 2011)。另外將普藍眼灰蝶 (*Polyommatus icarus*) 模擬北蘇格蘭和瑞典秋季均溫 5°C 飼養 40~62 天，可以導致翅的顏色改變及斑紋缺失，同時鱗片亦會出現不規則排列甚至是結構變形的情形 (Kertész *et al.*, 2017)。

大白斑蝶 (*Idea leuconoe clara* Butler) 廣泛分布在亞洲的熱帶及亞熱帶海島地區 (Morishita, 1985)。因為體型大且飛行緩慢，幾乎全台灣的蝴蝶園都有飼養。大白斑蝶翅斑紋主要是白底黑斑相襯出獨具一格的斑紋，除了原始黑斑，在文獻中還有出現黑化型的大白斑蝶標本收藏於台中國立自然科學博物館 (Morishita, 1974)；此外南投埔里的木生昆蟲館及宜蘭的綺麗昆蟲博物館亦都收藏有大白斑蝶的黑化型標本。然而出現黑化型大白斑蝶的具體原因，目前還未有明確的方向；因此提供了一個能夠探究蝴蝶翅的表型可塑性，受到溫度影響的機會。15~30°C 的溫度範圍為大白斑蝶的主要適存溫度，但 Chen *et al.* (2003) 的研究中顯示 30°C 的飼養下，幼蟲的存活率僅有 18%，而 35°C 的處理中，甚至沒有任何卵孵化。為了探討高溫對於翅黑化的影響，本試驗利用 6 種不同發育溫度及短期的溫度衝擊試驗來初步檢視高溫、低溫不同的處理方式，最終

增加大白斑蝶翅黑化面積增加的關聯性。

## 材料與方法

### 試驗方法

本試驗於 2019 年 6 月由木生昆蟲館提供大白斑蝶雌成蝶 5 隻，於屏東科技大學植物醫學系病蟲害溫室建立室內族群。為了增加其高溫適應性同時穩定試驗族群，我們將較抗熱的品系繼代 2 代，前測中同時記錄 6 種定溫下的生活史，確認大白斑蝶在 40°C 還能有存活的個體。試驗首先，完成 6 種溫度 (15、20、25、30、35、40°C) 下的大白斑蝶生活史，接著縮小試驗範圍，針對前蛹階段的蛹期進行極端溫度衝擊試驗，參考 Mahdi *et al.* (2011) 的實驗方法將試驗後的成蟲做成標本，將標本攝影後使用 Image J 軟體計算翅黑色面積的比率。

### 生活史試驗

大白斑蝶的成蝶飼養環境於網室內放置 12 盆葉子數量充足的爬藤，蜜源植物為馬利筋及馬蘭，放置浸過米酒的香蕉數根懸掛在網室內。累代至第 2 代將 10 隻交尾過的雌蝶進行產卵，於每日的下午 3 點在網室內進行取卵。第 1、2 次處理置入 33 顆 1 日卵，第 3 次處理置入 34 顆卵於透氣的透明壓克力箱內，飼養在 6 個恆溫 (15、20、25、30、35、40 ± 0.5°C) 生長箱中，相對濕度為 70 ± 10%RH，12 小時光照處理，於每日下午 3 點紀錄齡期及死亡率，共重複 3 次試驗 (n = 100)。

### 溫度衝擊試驗

生活史試驗表明出 35 與 40°C 已不利大白斑蝶生長，在 15°C 有發育趨緩的現象，故將衝擊試驗溫度使用 10、35、40°C。而在試驗之前，我們先將野生的大白斑蝶標本先進行翅的黑色面積測量，達到 36.44 ± 1.5% (n = 9) 與 25°C 樣本最為相近，故以 25°C 作為對照組。於 25°C 環境下將幼蟲飼養至終齡幼蟲，將幼蟲單獨移至透氣環保透明盒 (尺寸：15 × 11 × 7 cm、PP 材質) 中飼養，並放置充足的食草，2 天更換 1 次食草。幼蟲化蛹前會進入不再進食的徘徊尋找化蛹位置的階段。此階段時將 10 隻個體分別移入 10°C 生長箱，分別以冷衝擊 10、11、12 天；35°C 生長箱，分別以熱衝擊 1、2、3、4 天；40°C 生長箱，分別以熱衝擊 1、2、3 天，對照組固定於 25°C。所有生長箱的相對濕度皆為 70 ± 10%RH，12 小時光照處理。處理完的個體則移回 25°C 生長箱中

飼養至蟲體羽化後記錄其死亡率及黑化誘導的個體數與黑化程度，每個處理重複 10 次 ( $n = 100$ )。

### 影像處理與樣本準備

在生活史試驗 15~30°C 各取 30 隻成體標本進行拍攝，因為雌、雄性成蟲在翅斑紋的差異有限，故沒有分別針對雌、雄性標本拍攝。35 及 40°C 各僅有 1 隻個體存活，所以樣本數稀少。將試驗中成功誘導黑化的個體製成標本；然而，在衝擊試驗 40°C 有 2 隻個體在羽化時收翅皺縮而沒有完全攤平，會先將整隻個體包覆在潮濕的衛生紙中 2 天，再嘗試將翅拉開壓平製成標本並保有誘導出來黑化的斑紋，以減少翅皺縮所帶來的計算誤差。首先，將成功羽化的存活個體置一天的時間，待翅上體液全乾，再裝入臘光紙袋放置 -20°C 冷凍以減少翅表鱗片掉落，隨後確認蟲體死亡後即製作標本，使用描圖紙將翅固定於泡棉版上，標本製作的角度前翅下緣與胸成 90 度，後翅中室的位子與胸成 45 度，確保背側翅表的黑色斑紋皆清楚呈現，再將標本放置 45°C 烘箱烘乾一天。所有的試驗標本皆保存在國立屏東科技大學植物醫學系有益昆蟲實驗室。標本拍攝時先將標本固定在泡棉上，背景用黑布去除反光及陰影，使用相機 Nikon D5600，鏡頭 SIGMA 18-200 mm 拍攝所有標本，設置信息：自動模式光圈為 F4.5-5.0，速度為 1/100~1/125，ISO 為 100/自動白平衡/JPG 格式/最高像素：在標準背景下為 2420 萬畫素。影像去除黑色背景及頭、胸、腹部使用 Adobe Photoshop 軟體去除，最後以 JPG 格式儲存。

### 黑化面積計算

使用 Image J (1.53a) 軟體計算翅黑色面積，首先將去背後的翅圖片檔設為 8-bit 的灰階影像，接著設定閾值範圍，調整 Threshold 的上下兩列的捲軸，選取 Default 會自動將紅色的面積剛好覆蓋在蝴蝶翅黑色的部分。打開 Analyze Particles 紀錄黑色的總面積，再將原始圖檔調整 Threshold 的 Percentile，使得紅色的面積覆蓋整個蝴蝶翅面積，打開 Analyze Particles 自動測量翅的總面積，再將翅總面積除以黑色部分面積，即是大白斑蝶翅面積黑色的比率 (圖一)。

### 統計分析

除了發育速率的統計資料，其他的百分比統計資料先行使用 arcsine 轉換。而後所有的統計資料使用單因子變異數分析 (ANOVA) 來檢測我們試

驗的平均數差異，然因考量試驗中的死亡數目於高溫處理中偏高而導致的缺值，而組別間的顯著性比較，則利用雪費法 (Scheffe's test) 事後檢定各組的差異。

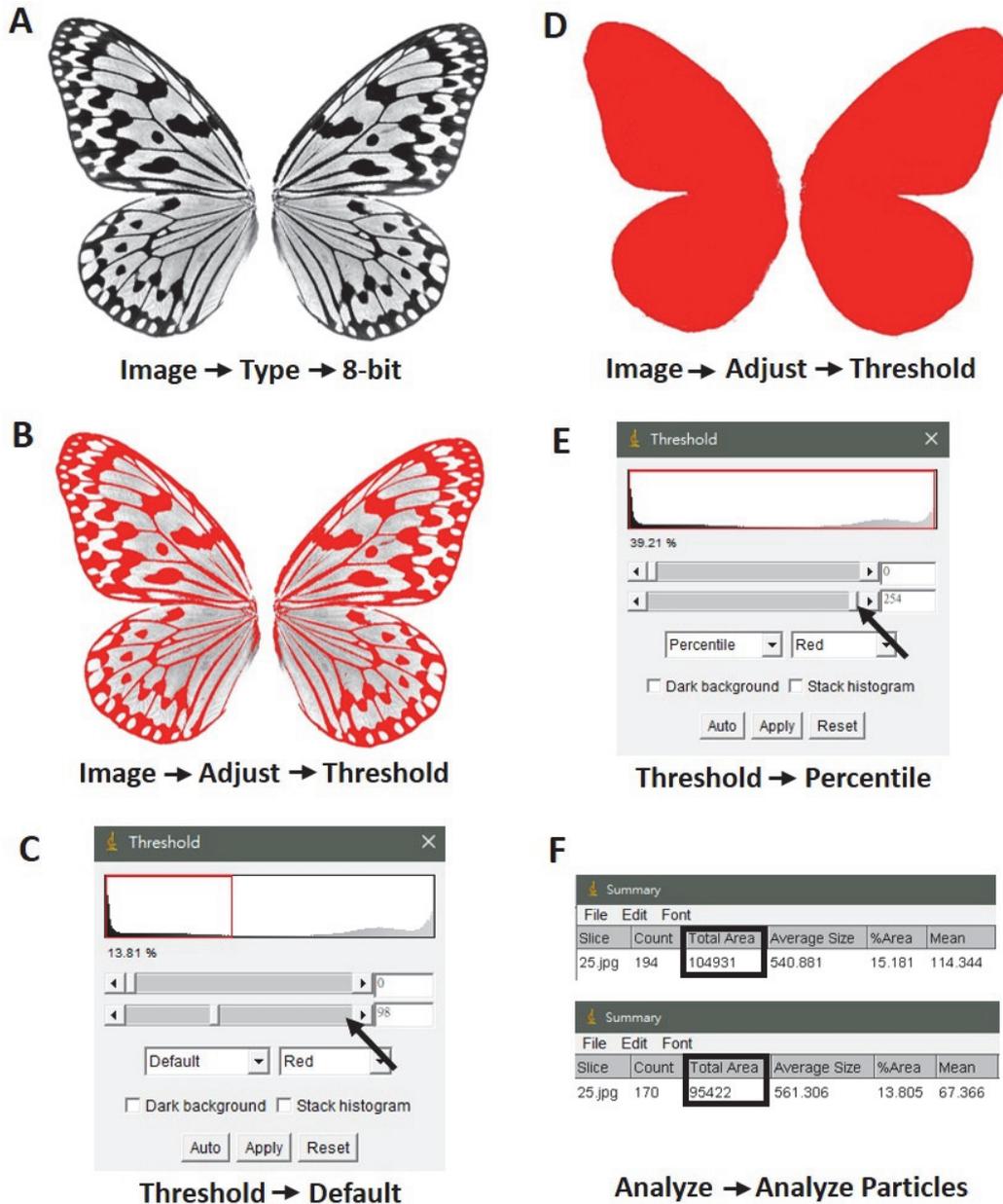
## 結 果

### 六個溫度下大白斑蝶的發育速率與存活率

大白斑蝶從卵到成蟲在六個溫度下的發育速率都有差異 ( $p < 0.05$ )。在 35°C 為  $0.0303 \pm 0.0009$  (1/day) 為所有處理中最快的，而 30°C 發育速率為  $0.0288 \pm 0.0012$  (1/day) 與 35°C 的發育速率最為接近。其次是 40、25 及 20°C，分別為  $0.0263$ 、 $0.0241 \pm 0.0011$  及  $0.0169 \pm 0.0004$  (1/day)，15°C 則為  $0.0083 \pm 0.0001$  (1/day) 是發育速率最慢的 (圖二)。20 及 25°C 是所有溫度下總存活率最好的處理，總存活率分別為 90、89%。20°C 處理組的卵存活率為 98%，幼蟲期的存活率皆可達至 94% 以上，蛹存活率為 93%；在 25°C 處理組中卵存活率為 97%，幼蟲期的存活率皆可達 94% 以上，蛹存活率為 89%。其次是 15 及 30°C 的處理組總存活率分別為 79 及 76%。15°C 處理組的卵存活率為 94%，在幼蟲期 4 齡前皆可達 91%，至 5 齡時僅 86%，蛹存活率為 79%；在 30°C 的處理組中卵存活率為 93%，而在幼蟲期的存活率降至 83~88%，蛹存活率為 76%。而 35 及 40°C 是所有溫度下總存活率最差的處理組，分別僅有 3 及 1%。35°C 的卵存活率為 67%，幼蟲期的存活率為 49~60%，而成功化成蛹的僅有 19%；在 40°C 的卵存活率為 21%，幼蟲期的存活率僅有 7~18%，而成功化蛹的僅有 5% (圖三)。

### 大白斑蝶在六個溫度下的翅黑色面積

在 15~30°C 所測試的樣本數各為 30 隻，但 35 及 40°C 僅各有 1 隻羽化有展翅成功的個體，故沒有標準差，也無納入統計比較中。這裡加入母族群個體 ( $n = 5$ ) 進行翅黑色面積比較，黑色面積經由 arcsine 轉換後，在母族群與 15~30°C 每個溫度的翅黑色面積都有差異 ( $p < 0.05$ )。母族群的翅黑色面積平均轉換值為  $4.3 \pm 0.07$ ，翅黑色面積為 36.8%。而 40°C 的翅黑化情形最明顯，平均轉換值為 5.07，黑色面積高達 80%，前後翅各翅室白底的區域會出現大規模的黑化情況使翅斑相連在一起，翅脈的黑色斑紋會變得更粗。其次是 35°C 也有出現黑化的情形，平均轉換值為 4.9，黑色面積為 67%，僅有前翅白底的區域會出現黑化的情形使翅斑相連在一起。

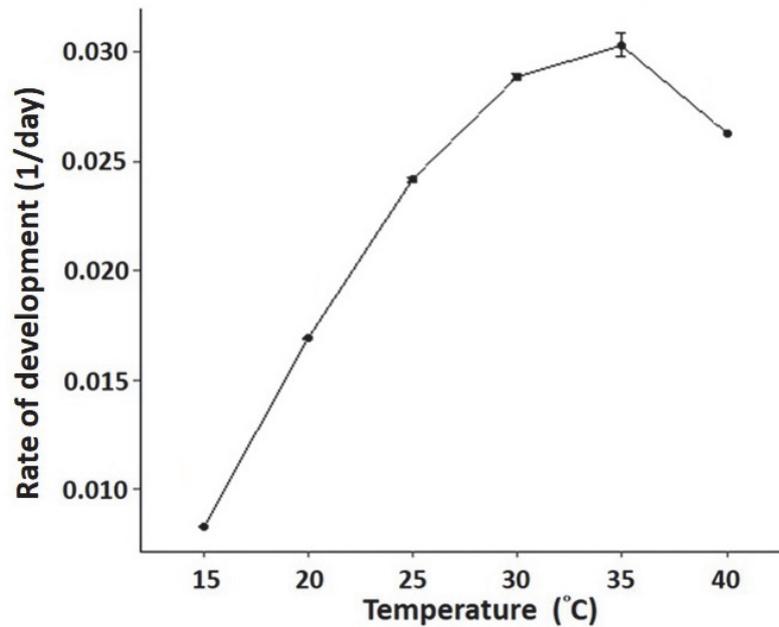


圖一 使用 Image J 計算大白斑蝶翅黑色斑紋的流程。(A) 先載入所分別拍攝的標本照，開啟 Image 欄位選取 Type，把照片調為 8-bit 的灰階照片。(B)、(C) 開啟 Image 欄位選取 Adjust，從 Threshold 勾取 Default 將照片的黑色面積變成紅色的面積。(D)、(E) 重複上述動作勾取 Percentile 將整隻蝴蝶的翅面積變成紅色面積。(F) 開啟 Analyze 選取 Analyze Particles 計算出來兩者所圈選的紅色範圍，將翅黑色面積數值除以總翅面積數值，即是大白斑蝶的翅黑色面積比例。

Fig. 1. Using Image J to calculate the area of black markings on the wings of *Idea leuconoe clara*. (A) Upon loading a specimen photograph, we opened the *image* field and selected the *type* button, adjusting the photograph to 8-bit black and white. (B), (C) Opening the *image* field, we selected the *adjust* button and selected *default* from the threshold to change the black area of the photo into a red area. (D), (E) These actions were repeated, and we adjusted the percentile to change the area of the entire butterfly's wings into a red area. (F) We then clicked the *analyze* button and selected *analyze particles* to calculate the red area range. We divided the black area of the wings by the total wing area to determine the black area percentage of *I. leuconoe clara*.

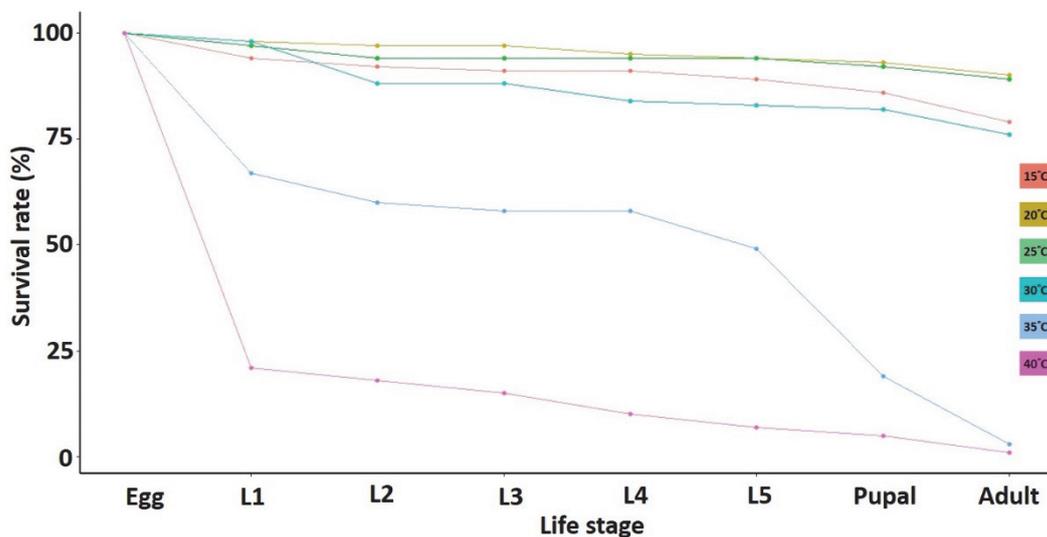
在 15~30°C 的樣本中沒有出現翅黑化變異的情況，但與母族群的大白斑蝶原始的黑斑仍有不同的差異。以 15°C 的翅黑色的面積最為顯著，平均轉換值

為  $4.61 \pm 0.05$ ，翅黑色面積達到  $50.73 \pm 2.6\%$ ，各翅室上的黑色翅斑會變得更加擴大，前翅中室的兩塊黑斑及後翅各翅室、邊緣的黑斑擴大的最為明顯。



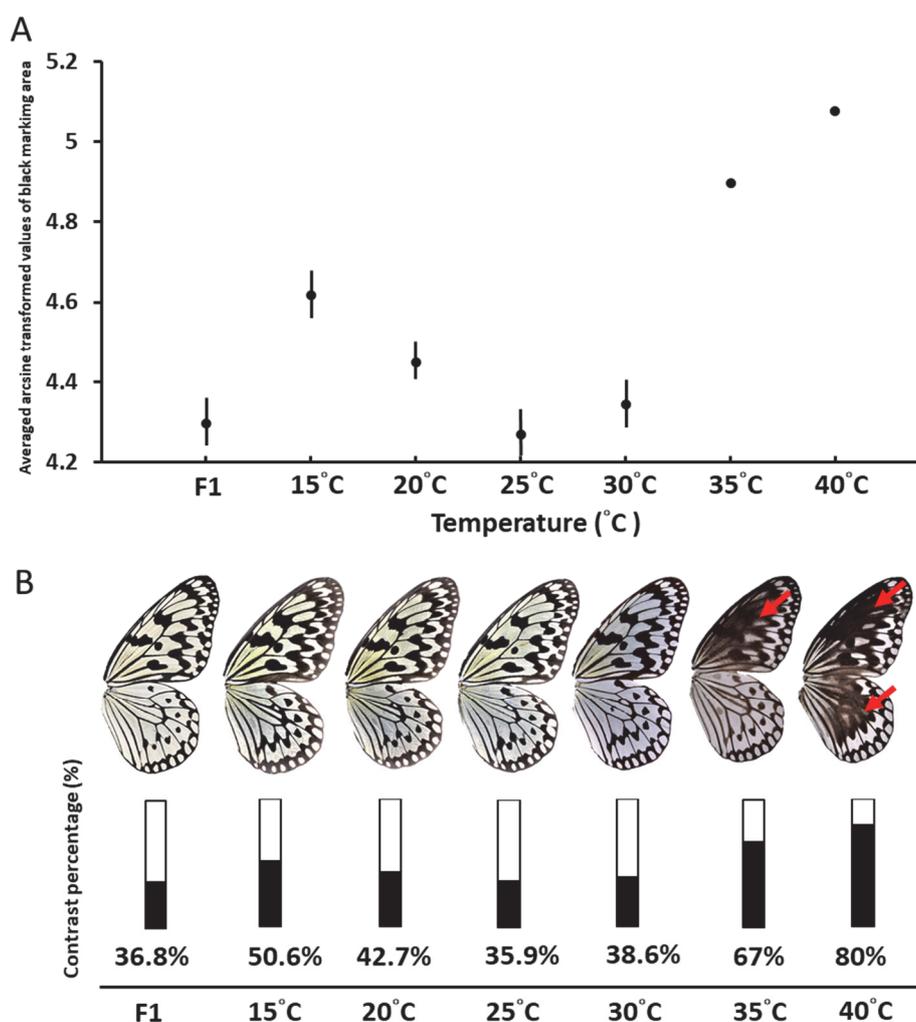
圖二 大白斑蝶在六種溫度下的發育速率。橫軸表示 6 種試驗溫度 (15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、40°C)，縱軸表示 6 種溫度試驗下的發育速率 (1/天)。大白斑蝶從卵到成蟲在 6 個溫度下的發育速率都有差異 ( $p < 0.05$ )。

Fig. 2. Developmental rate of *Idea leuconoe clara* at six temperatures. The x axis represents the six test temperatures (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, and 40°C), whereas the y axis represents the rate of development (1/day) under the six temperatures. The developmental rate of *Idea leuconoe clara* from egg to adult varied for the six temperatures ( $p < 0.05$ ).



圖三 六個溫度下大白斑蝶各齡期的存活率。橫軸表示的是大白斑蝶從卵至成蟲的各個齡期，縱軸表示存活率 (%)。15°C 以橘色的線表示；20°C 以黃色的線表示；25°C 以綠色的線表示；30°C 以青色的線表示；35°C 以藍色的線表示；40°C 以紫色的線表示。

Fig. 3. Survival rate of *Idea leuconoe clara* at six temperatures. The x axis represents the age of *I. leuconoe* from egg to adult, whereas the y axis represents the survival rate (%). The temperatures 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, and 40°C are represented by orange, yellow, green, cyan, blue, and purple lines, respectively.



圖四 六種溫度下大白斑蝶的翅黑色面積比例。(A) 6 種溫度下大白斑蝶翅黑色面積的平均轉換值散佈圖。橫軸表示的是 6 種溫度，縱軸表示的是各處理下的翅黑色面積平均轉換值。(B) 6 種溫度下的大白斑蝶標本與黑化程度示意圖，紅色箭頭表示的是出現黑化的斑紋。

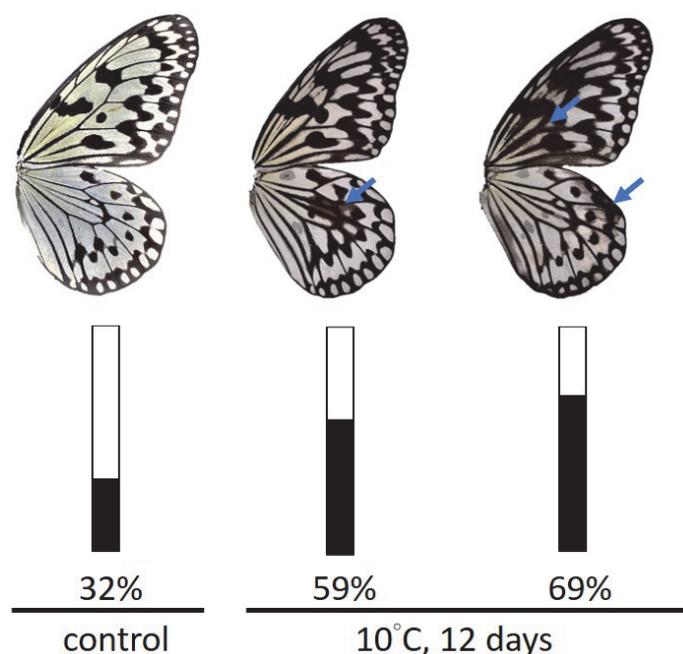
Fig. 4. Black area percentage of *Idea leuconoe clara* at six temperatures. (A) Average percentage arcsine-transformed values of the black wing area of *I. leuconoe* at six temperatures. The x axis represents the six temperatures, whereas the y axis represents the averaged arcsine-transformed values under each treatment. (B) Schematic of specimens and degree of melanization at six temperatures. The red arrows indicate the melanization areas.

其次是 20°C 的樣本平均轉換值為  $4.45 \pm 0.04$ ，翅黑色面積達到  $42.76 \pm 1.6\%$ ，各翅室的黑斑都有小幅擴大的情形。接著是 30°C 的樣本平均轉換值為  $4.34 \pm 0.06$ ，翅黑色面積為  $38.56 \pm 2.3\%$ ，最後是 25°C 的樣本平均轉換值為  $4.27 \pm 0.07$ ，翅黑色面積僅有  $35.8 \pm 2.5\%$ ，這兩組試驗組與母族群相比在黑色面積或是斑紋的型態並無太大的差異 (圖四)。

#### 極端溫度衝擊試驗誘導的翅面積黑化率

在衝擊試驗中，成功誘導出 9 隻黑化型的大白斑蝶。10°C 的冷衝擊試驗僅有衝擊 12 天的處理，成功誘導 2 隻翅黑化的大白斑蝶，面積分別是 59 及

69%，其餘天數的處理，皆沒有發生翅黑化的情況。而存活率為 60%，成功誘導率為 33.3%，黑化的個體有使用藍色箭頭標示出黑化區域，分別是在後翅中室及前翅中室周圍的翅脈，而翅上原始的黑斑面積皆變得更擴大 (圖五)。在 35°C 熱衝擊的處理中，待至試驗 3 及 4 天的處理後，才開始有黑化的個體 (圖六上)，分別誘導出 1 隻及 3 隻的黑化個體，處理 3 天的翅黑化面積為 75%，在後翅中室周圍出現黑化的情形，並相連各翅室的翅斑；處理 4 天的翅黑化面積為  $65.7 \pm 6.6\%$ ，分別為 59、66、72%。而處理 3 天的存活率為 90%，誘導率為 11.1%；處理 4 天的存活率為 30%，誘導率為 100%，黑化的區域



圖五 低溫衝擊試驗的大白斑蝶翅黑化面積比例。處理組使用 25°C 的樣本，沒有出現黑化斑紋的情況故僅計算翅黑色面積。低溫衝擊 10°C 試驗 12 天下出現 2 隻黑化樣本，藍色箭頭指出黑化斑紋的區塊，在測量上是將翅上的黑色斑紋與黑化的區塊一併計算。

Fig. 5. Melanization area percentage of *Idea leuconoe clara* subject to cold shock treatment. The control group was reared at 25°C, and no black spots appeared. Thus only the black wing area was calculated. Two melanized samples were discovered after 12 days at 10°C. The blue arrows indicate the melanizations. The black markings on the wings were measured together with the melanization markings.

使用橘色箭頭標示，黑化面積 59% 的個體是全翅的白底面積有淡淡的黑化，翅斑的型態並無改變。其他的個體出現的區域是由後翅中室向外延伸的黑化，覆蓋後翅中室周圍的翅脈及翅斑。在 40°C 熱衝擊處理中，試驗 1 及 2 天的處理有成功誘導翅黑化的個體，分別誘導出 2 及 3 隻的黑化個體，但在試驗 3 天的存活率為 0 (圖六下)。處理 1 天的翅黑化面積為  $65.5 \pm 0.7\%$ ，分別為 65 及 66%；處理 2 天的翅黑化面積為  $80.7 \pm 1.5\%$ ，分別為 79、81、82%，黑化的區域使用紅色箭頭標示，黑化的區域使用紅色箭頭標示，試驗 1 天的個體主要出現在前翅中室向外延伸的區域，翅脈及翅斑皆被黑化區域覆蓋，使中室翅斑表現不明顯；試驗 2 天的個體在前翅及後翅的中室周圍都有高度的黑化，黑化的區域覆蓋多數翅室上的翅斑使原始翅脈斑紋及翅斑的表現上並不明顯 (圖六下)。在處理 1 天的存活率為 20%；處理 2 天的存活率為 30%，兩組處理都可達到 100% 的誘導率。全程在 25°C 飼養的個體，則沒有出現誘導出黑化的個體，且存活率為 100% (表一)。

在極端溫度衝擊試驗中，10°C 衝擊 10、11、12 天及 35°C 衝擊 1、2、3 天有出現無誘導出黑化的個

體 (表一)，每個試驗的翅黑色面積經由 arcsine 轉換後都有差異 ( $p < 0.05$ ) (圖七 A)。在沒有黑化的個體中，10°C 的衝擊中每組天數的試驗造成的翅黑色面積是接近的，10°C 衝擊 12 天的樣本是翅黑色面積最高的試驗組，平均轉換值為  $4.63 \pm 0.02$ ，翅黑色面積達到  $51.8 \pm 1.2\%$ ，10°C 衝擊 11 天的樣本翅黑色面積平均轉換值為  $4.63 \pm 0.06$ ，翅黑色面積為  $51.6 \pm 3.3\%$ ，10°C 衝擊 10 天的樣本翅黑色面積平均轉換值  $4.57 \pm 0.06$ ，翅黑色面積為  $48.4 \pm 3\%$ 。冷衝擊的個體上發現主要造成翅黑色面積增加的形式是各翅室上的斑紋會有擴大的情況，在前翅中室的斑紋會隨著衝擊時間的增加而有擴大的趨勢。其次是 35°C 的衝擊試驗，各個衝擊的天數造成的翅黑色面積是接近的，35°C 衝擊 3 天的樣本翅黑色面積平均轉換值為  $4.32 \pm 0.05$ ，翅黑色面積達到  $38 \pm 1.9\%$ ，35°C 衝擊 2 天的樣本翅黑色面積平均轉換值為  $4.28 \pm 0.04$ ，翅黑色面積為  $36.4 \pm 1.6\%$ ，35°C 衝擊 1 天的樣本翅黑色面積平均轉換值為  $4.27 \pm 0.03$ ，翅黑色面積為  $35.9 \pm 1.2\%$ 。35°C 衝擊試驗的個體各翅室的斑紋形式與對照組雷同，僅有前翅中室與 CuA1 區域的黑斑有擴大的情況。在所有的衝



圖六 高溫衝擊試驗的大白斑蝶翅黑化面積比例。處理組使用 25°C 的樣本，沒有出現黑化斑紋的情況故僅計算翅黑色面積。35°C 有出現 4 隻黑化的個體，黑化的區域用橘色的箭頭標示。40°C 有出現 5 隻黑化的個體，黑化的區域用橘色的箭頭標示。有黑化的個體在測量上是將翅上的黑色斑紋與黑化的區塊一併計算。

Fig. 6. Melanization area percentage of *Idea leuconoe clara* subject to heat shock treatment. The control group was reared at 25°C. Four melanized individuals were discovered for 35°C. The melanized areas are marked with orange arrows. Five melanized individuals were discovered for 40°C. The melanized areas are marked with red arrows. The melanized individuals were measured together with the black markings on the wings and the melanized area.

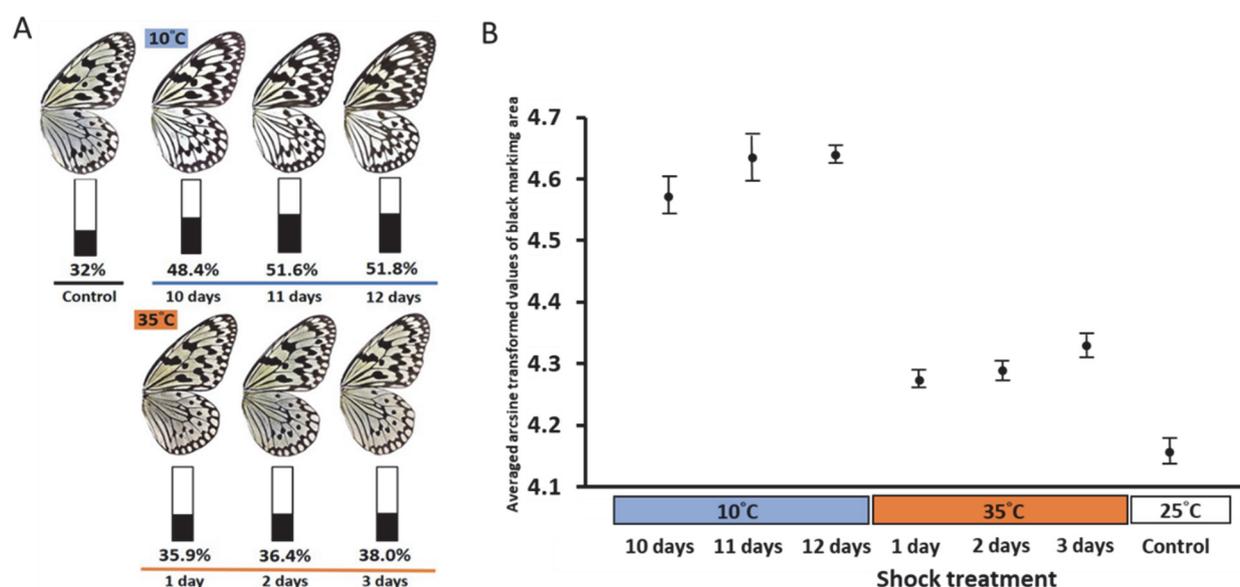
擊個體翅黑色面積皆比 25°C 對照組來的高，翅黑色面積平均轉換值為  $4.15 \pm 0.06$ ，翅黑色面積  $32 \pm 2.2\%$  (圖七 B)。而在 35°C 誘導 1、2、3 天的結果看到僅誘導出 1 隻黑化型的大白斑蝶，推測是高溫誘導的時間不夠久，因此沒有產生黑化。

## 討 論

### 大白斑蝶的最適生長範圍

從整個生活史試驗而言，大白斑蝶的發育速率與多數物種類似，隨著溫度的增加而加速；翅顏色同樣以黑白為主的日本紋白蝶 (*Pieris rapae* Linnaeus) 生長速率會隨著溫度升高而增加，在最

適溫度時達到峰值，然後隨著溫度進一步的上升或下降 (Kingsolver *et al.*, 2007)；生活史不同的地方，日本紋白蝶在 15°C 的飼養環境下，從卵期開始有趨緩的現象發生，死亡率開始上升，若成功度過卵期順利孵化的 1 齡幼蟲，則大多數可以存活到前蛹，但是在化蛹的階段也會有多數的個體會有化蛹不全的現象，最終能成功化蛹的個體也都能正常羽化成蟲。而大白斑蝶在 15°C 生長速率最慢，因為大白斑蝶是熱帶及亞熱帶地區的蝴蝶，面對低溫原本便較不耐低溫環境，因此無法調節代謝而使發育停止進入發育趨緩 (Bale, 1996)。在 20~30°C 不論是生長速率及存活率的結果表示此範圍適合台灣大白斑蝶的生長範圍，高溫確實能夠加快大白斑蝶的生長，主要是



圖七 極端溫度下大白斑蝶翅黑色面積比例。(A) 極端試驗無出黑化個體的處理組示意圖。(B) 每個試驗組的翅黑色面積平均轉換值都有差異 ( $p < 0.05$ )。橫軸是極端溫度衝擊試驗的處理組，縱軸是黑色面積平均轉換值，藍色代表 10°C 的試驗處理，橘色代表 35°C 的試驗處理，白色代表對照組 25°C 的試驗處理。小寫的符號代表事後比較的結果。

Fig. 7. Proportion of black area of *Idea leuconoe clara* wings under extreme temperature. (A) Schematic of the treatment group with no blackened individuals in the extreme test. (B) Average values of the black wing area of each test group were significantly different ( $p < 0.05$ ). The x axis represents the treatments of the extreme temperature shock test, whereas the y axis represents the average arcsine-transformed values of the black area. The blue, orange, and white bars represent the test treatments at 10°C, 35°C, and 25°C (the control group), respectively. The lower case letters represent the result of the subsequent comparison.

因為高溫會增加蝴蝶的新陳代謝；而代謝率越高，同時就要消耗掉更多的資源，進而使他們無法分配能量而導致無法正常發育，死亡率也跟著提升，在甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 及小紅蛺蝶 (*Vanessa cardui*) 的溫度試驗上也有相同的狀況 (Lee and Roh, 2010; Kennelly *et al.*, 2017)。前蛹前期是多數蝴蝶決定翅上色素沉澱的重要時期 (Iwata *et al.*, 2018)。我們成功的在此階段誘導出黑化型的大白斑蝶，亦降低個體死亡率。

### 溫度影響大白斑蝶翅的黑色斑紋面積

於不同溫度下大白斑蝶在翅的黑色斑紋面積都有差異，以 25°C 當作對照組，為試驗中 6 個溫度處理下翅黑色斑紋面積最小的處理組。在 15°C 的翅黑色面積達最高，與相關文獻比較，低溫飼養的個體為了增加吸收的熱量，翅的黑化面積因此增加，與前言所述的熱黑化假說吻合，在北美與歐洲地區，顯示在氣候較寒冷地區多數種類的蝴蝶翅顏色會較深於較溫暖氣候地區的同種蝴蝶 (Stelbrink *et al.*, 2019)。雖然本研究低溫及高溫都能誘導大白斑蝶翅黑化，但兩種黑化的形式不盡相同。高溫誘導蝴蝶出現黑

化的原因目前還尚未明瞭，Bhardwaj *et al.* (2020) 的研究指出，大白斑蝶的蛻皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 會隨著溫度的增加而增加，然而作者並沒有試驗 30°C 以上的處理，而較高的溫度誘導 20E 的增加使蝴蝶增加黑化的趨勢，因此我們推測，目前的試驗結果可能與 20E 蛻皮激素的調控有所關聯。

極端溫度衝擊，不論是冷熱衝擊皆成功出現翅黑化的個體。熱衝擊的頻度、強度的確能夠增加黑化。35°C 高溫誘導的黑化主要集中在後翅，前翅的黑化於衝擊 3 天以上的個體開始出現。更高溫的 40°C 全翅黑化的個體更早，於第二天即開始出現 (圖六)，且成功存活的個體全部都有黑化的現象。35 與 40°C 的試驗組，衝擊的時間分別佔了大白斑蝶整個蛹期的 25 及 6.25%。35°C 生活史試驗與 35°C 衝擊試驗的黑化個體出現的黑化模式不相同，也表示大白斑蝶黑化區域的強度並不由高溫環境與熱衝擊單獨調控，35°C 短時間衝擊僅能誘導後翅黑化，而 35°C 生活史試驗的高溫時間更長，導致黑化模式與同溫度下的衝擊試驗黑化模式不同。故我們推測在衝擊試驗前，終齡幼蟲期已經有色素沉澱的發生。

表一 大白斑蝶於不同的衝擊試驗處理後的存活率及黑化誘導率

Table 1. Survival rate (SR) and induction rate (IR) for the color-pattern modifications in response to different shock treatments in *Idea leuconoe clara*

Treatment mode	<i>n</i>	Successful eclosion	Modified (Individuals)	SR (%)	IR (%)
10°C, 10 days	10	8	0	80	0
10°C, 11 days	10	7	0	70	0
10°C, 12 days	10	6	2	60	33.3
35°C, 1 day	10	10	0	100	0
35°C, 2 days	10	9	0	90	0
35°C, 3 days	10	9	1	90	11.1
35°C, 4 days	10	3	3	30	100
40°C, 1 day	10	2	2	20	100
40°C, 2 days	10	3	3	30	100
40°C, 3 days	10	0	na	0	na
<b>Control</b>					
25°C	10	10	0	100	0

Note: n: number of treated individuals; SR: survival rate (%); IR: induction rate (%); na: not applicable.

而在極端溫度試驗下無誘導出黑化型態的個體中發現在 10°C 誘導天數越長的個體上他們的翅黑色面積越多，主要是翅斑的面積擴大，但並無產生黑化的現象。而 10°C 的翅黑色面積明顯高於 35 與 25°C，證實了在較寒冷的環境下能誘導大白斑蝶出現更擴大的黑斑面積或出現黑化的個體而使翅黑色面積增加（圖七）。雖然高溫誘導的時間拉長可以產出較多的黑化型個體，但同時也伴著及高死亡率的風險，固高溫產出的黑化型大白斑蝶並不是常態，是高溫的關係使大白斑蝶突變出黑化型的個體，而這些黑化型的個體產生的生態意義還尚待研究。

20E 蛻皮激素是誘導黑化的關鍵激素之一，以偏瞳蔽眼蝶 (*Bicyclus anynana*) 為例，高溫下除了前蛹的停滯階段外，蛹發育至 30% 時體內 20E 蛻皮激素的含量是達到最高的 (Bhardwaj *et al.*, 2020 ; Bear *et al.*, 2017)，這個發育階段，與我們 35°C 處理的熱衝擊出現明顯黑化個體，總蛹期的 25% 發育階段吻合。故我們推測 20E 蛻皮激素受到溫度影響，能在前蛹的停滯階段和蛹的前期使得大白斑蝶產生翅黑化，然而 20E 蛻皮激素如何改變大白斑蝶的翅顏色的不同色素合成、沉澱，則還需要更進一步的色素試驗與分析。

溫度確實能誘導大白斑蝶出現黑化的現象，但同時也伴著高風險的死亡率。我們成功藉著僅在前蛹的停滯階段誘導有效地降低死亡率，且誘導的效

果不亞於整個生活史生長的處理。同時本試驗證實溫度的高低是決定大白斑蝶的翅黑化面積主要因素，最適溫度顯現出來的黑色面積是最少的，溫度越低能使他們原本的黑色斑紋更加明顯；而溫度越高，能誘導他們原本的白色翅面積出現黑化的現象，越靠近致死的極端溫度能誘導出黑化程度高的大白斑蝶。對於大白斑蝶這種熱帶、亞熱帶的蝴蝶，熱黑化假說對於高溫範圍的適用性還沒有明確的案例，本試驗於低溫所誘導出的高度黑化同樣支持熱黑化假說。現在地球上的氣候變遷讓極端氣候發生的頻率越來越頻繁，可能讓許多生物產生的表型可塑性更加顯而易見，甚至伴隨基因變異的可能性，導致物種間及種內的一些生物學特性、生態改變，而導致更為複雜的結果。綜上所述，本研究指出在極端氣候下誘導的大白斑蝶與正常型的大白斑蝶產生非常明顯的差異，這對由溫度誘導的表型可塑性提供了一個直接的實例。

## 致 謝

本研究感謝科技部計畫 MOST-106-2313-B-020-014-MY2、及屏東科技大學鼓勵教師研提任務導向計畫之經費支持。同時感謝埔里木生昆蟲館提供大白斑蝶的蟲源和埔里錦吉昆蟲館羅錦吉先生不吝分享蝴蝶飼養上的經驗。亦承蒙各位編審委員不

吝撥冗斧正，謹致由衷謝忱。

## 引用文獻

- Bale JS.** 1996. Insect cold hardiness: a matter of life and death. *Eur J Entomol* 93: 369-382.
- Bear A, Prudic KL, Monteiro A.** 2017. Steroid hormone signaling during development has a latent effect on adult male sexual behavior in the butterfly *Bicyclus anynana*. *PLoS One* 12: e0174403. Available from: doi: 10.1371/journal.pone.0174403
- Beldade P, Mateus AR, Keller RA.** 2011. Evolution and molecular mechanisms of adaptive developmental plasticity. *Mol Ecol* 20: 1347-1363.
- Bhardwaj S, Jolander LS, Wenk MR, Oliver JC, Nijhout HF, Monteiro A.** 2020. Origin of the mechanism of phenotypic plasticity in satyrid butterfly eyespots. *eLife* 9: e49544. Available from: doi: 10.7554/eLife.49544
- Chen SC, Ouyang SC, Wang SU, Huang SI, Ho SR, Huang SJ, Shih CY, Chen WJ.** 2003. Effect of temperature on development of *Idea leuconoe clara* (Butler) (Lepidoptera: Danaidae). *Formosan Entomol* 23: 331-351. (in Chinese)
- Ellers J, Boggs CL.** 2002. The evolution of wing color in colias butterflies: heritability, sex linkage, and population divergence. *Evolution* 56: 836-840.
- Fischer K, Karl I.** 2010. Exploring plastic and genetic responses to temperature variation using copper butterflies. *Clim Res* 43: 17-30.
- Franke K, Karl I, Centeno TP, Feldmeyer B, Lasse KC, Oostra V, Riedel K, Stanke M, Wheat CW, Fischer K.** 2019. Effects of adult temperature on gene expression in a butterfly: identifying pathways associated with thermal acclimation. *BMC Biol* 19: 32. Available from: doi: 10.1186/s12862-019-1362-y
- Hartfelder K, Emlen DJ.** 2012. Endocrine Control of Insect Polyphenism. pp 464-522. In: Gilbert LI (ed). *Insect Endocrinology*. Academic Press, London, 588 pp.
- Iwata M, Tsutsumi M, Otaki JM.** 2018. Developmental dynamics of butterfly wings: Real-time in vivo whole-wing imaging of twelve butterfly species. *Sci Rep* 8: 16848. Available from: doi: 10.1038/s41598-018-34990-8
- Karl I, Janowitz SA, Fischer K.** 2008. Altitudinal life-history variation and thermal adaptation in the copper butterfly *Lycaena tityrus*. *Oikos* 117: 778-788.
- Kennelly D, Grigg J, Tabaru A, Sentak K.** 2017. The effects of temperature on *Vanessa cardui* wing size. *J Biol Sci* 3: 6-8.
- Kertész K, Piszter G, Horváth ZE, Bálint Z, Biró LP.** 2017. Changes in structural and pigmentary colours in response to cold stress in *Polyommatus icarus* butterflies. *Sci Rep* 7: 1118. Available from: doi: 10.1038/s41598-017-01273-7
- Kingsolver JG, Massie KR, Ragland GJ, Smith MH.** 2007. Rapid population divergence in thermal reaction norms for an invading species: breaking the temperature-size rule. *J Evol Biol* 20: 892-900.
- Koch PB, Merk R, Reinhardt R, Weber P.** 2003. Localization of ecdysone receptor protein during colour pattern formation in wings of the butterfly *Precis coenia* (Lepidoptera: Nymphalidae) and co-expression with Distal-less protein. *Dev Genes Evol* 212: 571-584.
- Lee KP, Roh C.** 2010. Temperature-by-nutrient interactions affecting growth rate in an insect ectotherm. *Entomol Exp Appl* 136: 151-163.
- Mahdi SH, Yamasaki AH, Otaki JM.** 2011. Heat-shock-induced color-pattern changes of the blue pansy butterfly *Junonia orithya*: Physiological and evolutionary implications. *J Therm Biol* 36: 312-321.
- Mateus AR, Marques-Pita AM, Oostra V, Lafuente E, Brakefield PM, Zwaan BJ, Beldade P.** 2014. Adaptive developmental plasticity: Compartmentalized responses to

environmental cues and to corresponding internal signals provide phenotypic flexibility. BMC Biol 12: 97. Available from: doi: 10.1186/s12915-014-0097-x

**Morishita K.** 1974. *Idea leuconoe*. Lepid. Soc Jap 78: 3-11. (in Japanese)

**Morishita K.** 1985. Butterflies of the south east Asian islands. Volume II. pp 518-520. In: Tsukada E (ed). Danaidae. Plapac Co. Ltd, Tokyo. (in Japanese)

**Otaki JM.** 2017. Contact-mediated eyespot color-pattern changes in the peacock pansy butterfly: contributions of mechanical force and extracellular matrix to morphogenic signal propagation. pp 83-102. In: Perveen FK (ed). Lepidoptera. Rijeka: InTech.

**Roskam JC, Brakefield MP.** 1999. Seasonal

polyphenism in *Bicyclus* (Lepidoptera: Satyridae) butterflies: different climates need different cues. Biol J Linn Soc 66: 345-356.

**Stelbrink P, Pinkert S, Brunzel S, Kerr J, Wheat CW, Brandl R, Zeuss D.** 2019. Colour lightness of butterfly assemblages across North America and Europe. Sci Rep 9: 1760. Available from: doi: 10.1038/s41598-018-36761-x

**True JR.** 2003. Insect melanism: the molecules matter. Trends Ecol Evol 18: 640-647.

**Zheng XL, Yang QS, Hu YW, Lei CL, Wang XP.** 2015. Latitudinal variation of morphological characteristics in the swallowtail *Sericinus montelus* Gray, 1798 (Lepidoptera: Papilionidae). Acta Zool 96: 242-252.

# Temperature Affects the Wing Melanization on *Idea leuconoe clara* (Lepidoptera: Nymphalidae)

Ching-Lin Chu, Tsen Hua, Li-Hsin Wu\*

Department of plant medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Neipu Hsiang, Pingtung, Taiwan

\* Corresponding email: lihsinwuu@mail.npust.edu.tw

Received: 14 May 2020      Accepted: 24 July 2020      Available online: 20 August 2020

## ABSTRACT

*Idea leuconoe clara*, the large tree nymph, is known for its presence in Southeast Asian butterfly gardens because of its large wingspan and black and white color contrast. The distribution of black spots and the degrees of coarseness and melanization of the wings are usually employed for species identification. Latitudinal and temperature variations in the phenotype or genotype of a butterfly can cause the wings of a single butterfly species to have varying coloration. The literature contains several records of melanized *I. leuconoe* and descriptions of specimen collections from Taiwan and Southeast Asia. To evaluate the effects of development temperature on the melanization of *I. leuconoe* wings, we reared 600 larvae under six constant temperatures (range: 15-40°C) and discovered only two melanized adults in the end, with 67-80% wing area melanization for the temperatures of 35 and 40°C; the mortality of high temperature reached 99%. We further conducted heat-cold-shock treatments on 100 individuals during their wandering stage before pupation. In response to 10°C cold treatment, two melanized adults had 59-69% wing area melanization. By contrast, four melanized adults had 66-75% melanization after 35°C treatment, and five melanized individuals had 79-82% melanization after 40°C treatment. When wandering-stage heat-shock treatments were administered, nine individuals were melanized, the melanization rate was increased to 12.9%, and the mortality rate was reduced to 33%. In summary, the wing color patterns of *I. leuconoe* caused by extreme temperature are a result from a combined effect in the species' wandering, early pupal stage. The mechanisms of color-pattern development of *I. leuconoe* may be exploited to prevent individuals arising from some specific rearing conditions, such as conditions in the wet and hot season.

**Key words:** *Idea leuconoe clara*, effects of extreme temperature, melanization