

第二十屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA20-408

作品名稱：探討雙齒圍沙蠶的眼外視覺之研究

姓名：陳宇晴

關鍵字：沙蠶科、光趨避性、眼外視覺

摘要

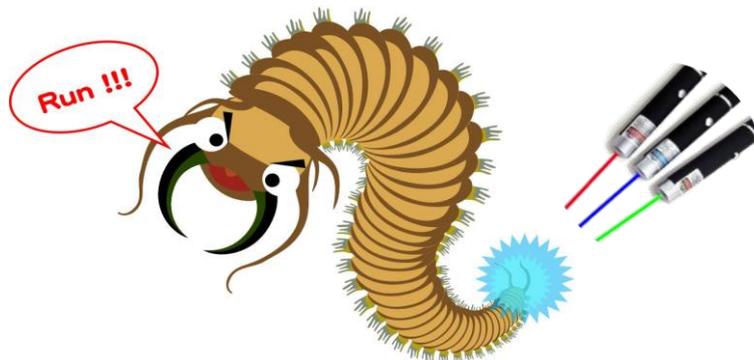
「視覺」是生物適應環境和力求生存的重要本能。科學家常透過現生物種視覺構造的比較，探索著眼睛的演化過程，例如簡單的無脊椎動物眼蟲、渦蟲會利用眼點偵測環境中的光線，而脊椎動物如斑馬魚的眼睛除了能感受色光並在腦中成像，還可偵測紫外光，並產生逃避行為。因海洋是生物的起源地也形塑著多樣化的光環境，而使許多海洋生物為更適應環境的變化，隨之演化出各式各樣不同的視覺能力。

「眼外視覺，Extraocular vision」意指生物的身體除眼睛構造外，另有分布著能夠感光細胞或蛋白，使得生物能更有效地偵測環境中色光或光線強弱的變化。現今，已有許多動物的眼外視覺現象相繼被報導，例如渦蟲、海星、海兔和多毛類等。這些生物透過眼外視覺的建立，能有助於動物躲避光害與天敵、感受晝夜節律和動物遷徙等作用。

本研究以易穩定取得的雙齒圍沙蠶進行實驗，透過一系列不同色光的行為觀察實驗設計來探討沙蠶的「眼外視覺」，本研究首次以動物行為學方法進行實驗，先以藍、綠、紅三種視覺感光三原色照射雙齒圍沙蠶頭部、尾部和疣足，發現均都對藍光產生明顯的逃避行為，再進一步以光梯度法證實沙蠶確實對藍光具有高度的敏感性。

透過比較沙蠶不同尾部型態、以顏料遮蔽和切除沙蠶尾部等方法，我們進一步探討沙蠶尾部可能的感光區域，發現尾部的肛節處是最可能存在感受藍光的區域，因為即使在切斷無頭部的狀態下，連續五天以藍光照射沙蠶肛節仍有明顯閃避反應。

綜合以上，本研究首次以動物行為、手術切除和藥理學方法，證實「雙齒圍沙蠶的尾部具有能感受藍光的眼外視覺」。有別於過去以沙蠶作為視覺感光研究對象時，大多僅對其視覺相關的基因表現和其分布進行探討，此次我們為建立了一套以行為科學為基礎，探討沙蠶視覺能力的研究方法，期盼本研究之結果未來能將沙蠶視覺基因表現與行為反應加以結合，在探索動物視覺的演化歷程有所貢獻。



壹、研究動機

三棘蠶是非常獨特的潮間帶生物之一，當我們在學校實驗室學習飼養稚蠶的過程時，我們接觸到一種外型非常特別，俗稱「青蟲」的餵食餌料，經過老師的說明後，我們才知道牠其實是一種屬於多毛綱的底棲海洋生物。經過一段時間的接觸和觀察，我們發現到沙蠶頭部有明顯的四個黑點，產生好奇與疑問後，我們立即付諸行動查詢資料，得知那四個黑點為沙蠶眼部構造，不免對生物的視覺反應產生連結，當下實施了個小測試，我們以藍光手電筒對沙蠶的頭部照射時，沙蠶頭部會對藍光產生逃避行為。而換對牠的尾部照射時，沙蠶尾部竟也會產生與頭部相同的逃避行為。對於這樣的觀察結果，我們不禁相當的好奇為何沙蠶會對藍光如此敏感？沒有眼睛構造的部位是否也能感光？牠又是如何感受色光？

貳、研究目的

「視覺」是生物適應環境和力求生存的重要本能。科學家透過現生物種視覺構造的比較，探索著眼睛的演化過程，例如簡單的無脊椎動物如眼蟲和渦蟲[1]會利用眼點（Eye spot）偵測環境中的光線，而脊椎動物如斑馬魚的眼睛則除了能感受色光並在腦中成像，還可偵測UV光，並產生逃避行為[12]。在海洋中，隨著海洋的深度、型態塑造出光環境的多樣性，而生物為因應環境的變化進而產生了演化的推力，例如銀色洞鰭鯛（*Dirtemus argenteus*）演化出多達38種以上的視蛋白基因（Rhodopsin gene），讓牠成為具超強視力的深海魚[9]。

在潮間帶環境中，有些生物也發展出了沒有眼睛器官卻也能感光的能力，此種現象稱為「眼外視覺（extraocular vision）」，例如屬軟體動物的海兔（Aplysia）會利用眼外視覺感受晝夜節律（circadian oscillation），讓沒有眼睛的海兔也能像正常的個體般，在日照時間建立學習和記憶的效果[10]。

沙蠶，俗稱海蟲、青蟲，是一種生活在潮間帶的多毛類動物，主要棲息於淺水海域，退潮後分布於沙質泥地或大石頭下方。沙蠶屬於夜行性動物，在夜間的活動量明顯高於白天，其擁有良好的行動及游泳能力[2]，並且會主動伸出口器捕食其他多毛類動物。因此，沙蠶為了適應潮間帶海域的複雜環境，其可能也具備眼外視覺之能力。沙蠶頭部的四個眼點是常用於研究眼睛發育過程和演化的對象，但對於沙蠶眼點以外的視覺能力則仍待研究。

本研究以雙齒圍沙蠶為研究對象，對沙蠶的視覺能力進行研究與探討，如下：

一、雙齒圍沙蠶是否能分辨不同色光？

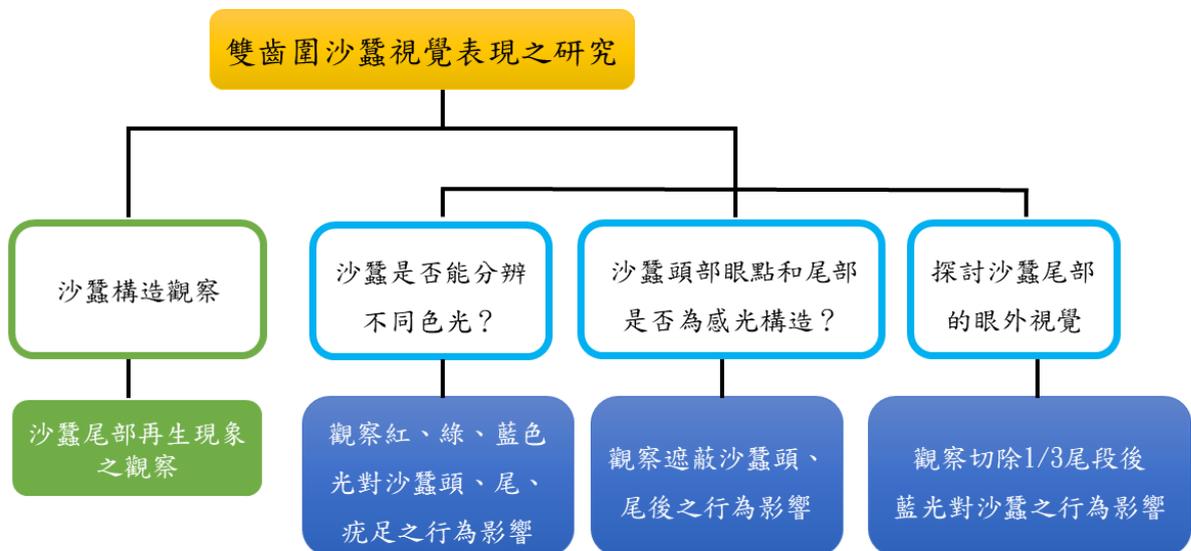
紅、藍、綠是光的三原色，將三色混合在一起就成白光。為了探討沙蠶對不同色光的感受能力，因此，我們利用三原色雷射光照射沙蠶的頭部、尾部和疣足，並將引發的行為反應進行量化，藉以證實沙蠶具有感受不同色光的能力。

二、沙蠶的頭部眼點和尾部是否為感光構造？

眼點（Eye spot）是許多無脊椎動物用以感光的重要構造，例如眼蟲和渦蟲。此外，多毛類的眼點構造是眼睛演化的重要過程，沙蠶的眼點具有眼杯(Eyecups)，內含玻璃狀液，但無眼睛晶體，眼杯下方則具黑色素細胞以及視覺神經[9,16]。實驗利用黑色顏料塗抹於眼點和尾部，探討將感光構造遮蔽後，是否能抑制沙蠶的感光行為。此外，當顏料移除後，沙蠶的感光行為是否重新恢復，藉以探討沙蠶重要的感光構造位於何處？

三、探討沙蠶「尾部」的眼外視覺

過去進行動物眼外視覺研究時，常對於已具備眼睛器官的動物，實驗過程中必須先將眼睛器官進行移除。由於沙蠶是具備再生能力之物種，故實驗亦採取切除佔身體總長約1/3的尾部，並連續數日對頭段的頭端和後端，以及切下之尾段進行觀察，量化藍光照射下產生之行為反應。亦試圖想了解其眼外視覺能力是否會因構造再生而具有再現性。



▲圖1. 實驗架構圖

參、研究設備及器材

一、實驗藥品與器材

(一) 實驗藥品

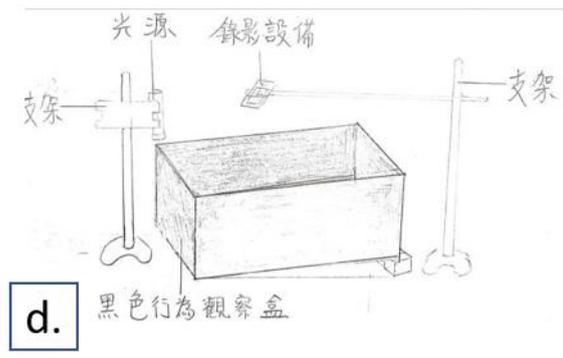
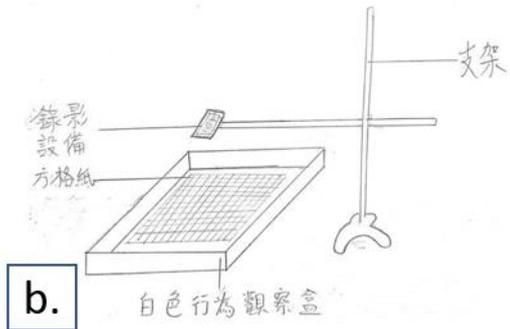
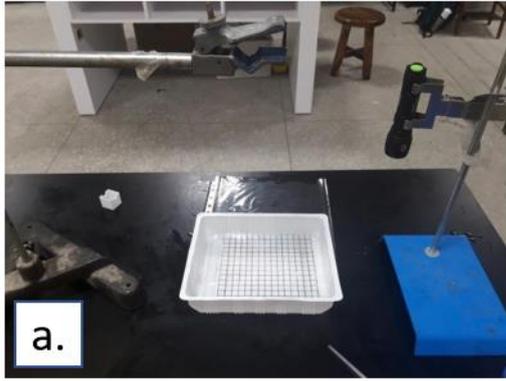
名稱	備註
8% 氯化鎂	作為沙蠶麻醉之用
A-967079	TRPA1-專一性抑制劑，廠商：Abcam
二甲基亞砜 (DMSO)	A-967079之配置溶劑

(二) 實驗器材

名稱	備註
恆溫培養箱	控溫在15°C飼養沙蠶
透明塑膠盒	飼養沙蠶並進行隔離分組用
不同色光光源	紅光、綠光、藍光三色光雷射筆 實驗1-2藍光光源 (UV LED 用手電筒) 紅光光源 (VIZZ 專業頭燈)
自製格線透明板	初步沙蠶移動觀察量化之用
透明長方形壓克力盒	纏繞黑布膠帶，阻隔其他光源干擾 「光梯度」行為實驗之用
錄影設備	SAMSUNG A70、OPPO X9079 手機攝錄影像
實體顯微鏡 (Dino-Lite顯微鏡)	進行沙蠶構造顯微觀察、不同色光行為反應之位移 攝影紀錄與搭配軟體分析 型號：MD5218M-FVT、MD73915MZT
筆記型電腦	影像擷取及分析



▲圖2. 實驗動物飼養裝置。(a) 恆溫培養箱；(b) 以透明塑膠盒分盒飼養情形。



▲圖3. 自製沙蠶行為實驗裝置。(a) (b) 實驗1-1行為實驗設置與手繪標示圖；
(c) (d) 實驗1-2行為實驗設置與手繪標示圖。

二、實驗動物

本研究實驗動物屬於多毛綱沙蠶科之雙齒圍沙蠶 (*Perinereis aibuhitensis*)，身體呈翠綠或黃褐色，其軀幹是由多個相似的體節所組成，頭部上有眼部及觸鬚等感覺構造，另咽部上有許多小齒，用途為捕食，也作為沙蠶物種辨識檢索的特徵。沙蠶的每一體節具有成對疣足，疣足可見剛毛，剛毛的型態因種而異，也可作為辨識的特徵。雙齒圍沙蠶分布於菲律賓、馬紹爾群島及中國大陸沿海，臺灣則分布於西部海岸一帶，也被釣友們稱之為「青蟲」，目前多以人工飼養的方式進行繁殖，使得本研究材料易於取得。

(一) 雙齒圍沙蠶物種分類之型態觀察

Kingdom Animalia 動物界

Phylum Annelida 環節動物門

Class Polychaeta 多毛綱

Order Nereidida 沙蠶目

Family Nereididae 沙蠶科 [8]

Genus *Perinereis* 圍沙蠶屬

Perinereis aibuhitensis Grube, 1878 雙齒圍沙蠶



a. ▲ 本實驗之動物



b. ▲ 沙蠶頭部背側



c. ▲ 沙蠶頭部腹側



d. ▲ 沙蠶頭部眼點



e. ▲ 沙蠶疣足



f. ▲ 沙蠶尾部

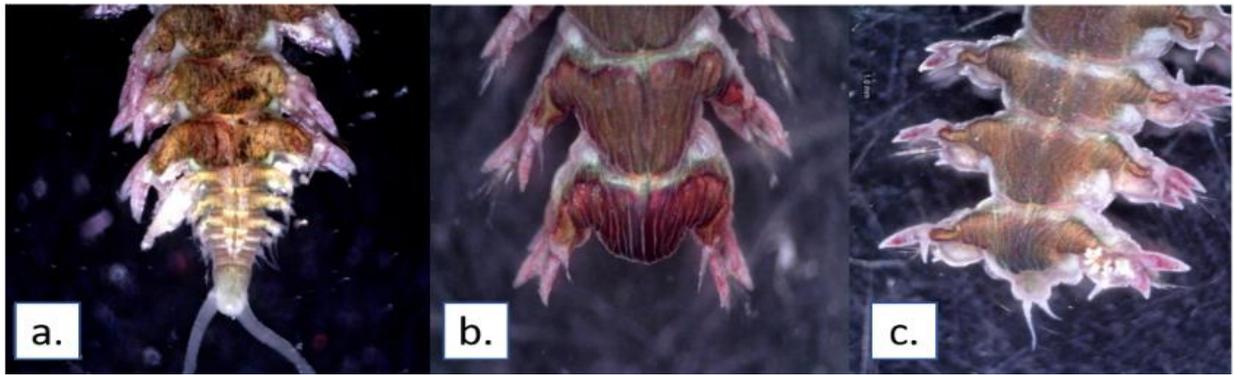


g. ▲ 沙蠶肛節與一對肛鬚

圖4. 雙齒圍沙蠶個體與各局部構造型態。

(a) 完整沙蠶個體，體長15-20公分。(b) 和 (c) 沙蠶頭部前方具有一對口前齒、咽部腹面具有小齒（黑色三角圓錐狀），沙蠶頭部背側具有兩對眼。頭部有明顯四黑點為沙蠶的眼點，口部長有勾狀顎齒，用途為捕食。

(二) 沙蠶的再生現象



▲ 圖5. 沙蠶尾部的再生現象。

(a) 完整的沙蠶尾部 (b) 尾節斷裂後的沙蠶尾部 (c) 受傷後再生的尾部。

觀察所購買的沙蠶，發現有些沙蠶的尾部非常完整，有些會呈斷裂型態，而有些則明顯呈現再生的形態。查詢相關文獻資料後得知，沙蠶科的尾部具有再生能力，且在 15°C 環境下飼養，其再生速率比 25°C 快[5]。

肆、研究過程與方法

◆ 目的（一）：探討雙齒圍沙蠶是否能分辨不同色光？

• 實驗 1-1：觀察沙蠶對不同色光之反應

1. 說明：以三色光源照射沙蠶頭部、尾部和疣足，觀察沙蠶對不同色光的行為反應。
2. 實驗流程：

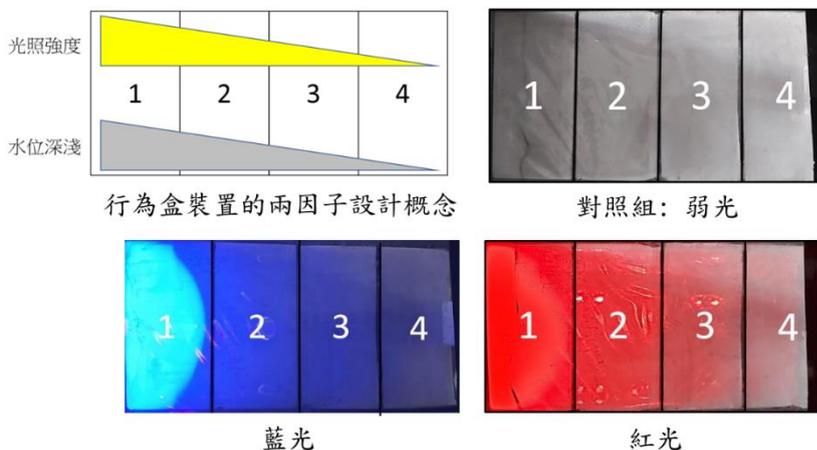


▲圖6. 以藍光照射疣足

- (1) 製備行為觀察盒：準備自製格線透明板，黏貼至白底容器內。
或準備直徑15公分的玻璃培養皿。
- (2) 加入些許海水，覆蓋過沙蠶身體，令沙蠶能夠自由活動。
- (3) 架設錄影器材至行為觀察盒之上方處，作為影像數據紀錄。
- (4) 將實驗沙蠶放入白色行為觀察盒，分別以不同光源照射沙蠶頭部、尾部和疣足，觀察其照光前後之移動變化。

• 實驗 1-2：觀察沙蠶對不同色光強弱之敏感度

1. 說明：以散光源照射定點，藉由光的明暗強弱劃分為四個區域，觀察沙蠶一定時間內的行為反應。
2. 實驗流程：
 - (1) 準備長方形透明壓克力盒，用黑布膠帶纏繞，阻隔其他光源干擾。
 - (2) 架設光源燈，照射實驗壓克力盒第一區域，成半圓形狀。
 - (3) 架設錄影設備至實驗壓克力盒之上方處，作為影像數據紀錄。
 - (4) 倒入海水，傾斜盒子，營造盒內水位之深淺變化，將沙蠶放於深水區。
 - (5) 使沙蠶於深水適應 30 秒後再照射光源，並啟動錄影設備紀錄之。
 - (6) 實驗分組中對照組：沒有光源照射，放入沙蠶自由活動；實驗組：利用藍光和紅光光源的照射，觀察沙蠶在兩分鐘內的頭、尾移動區域。



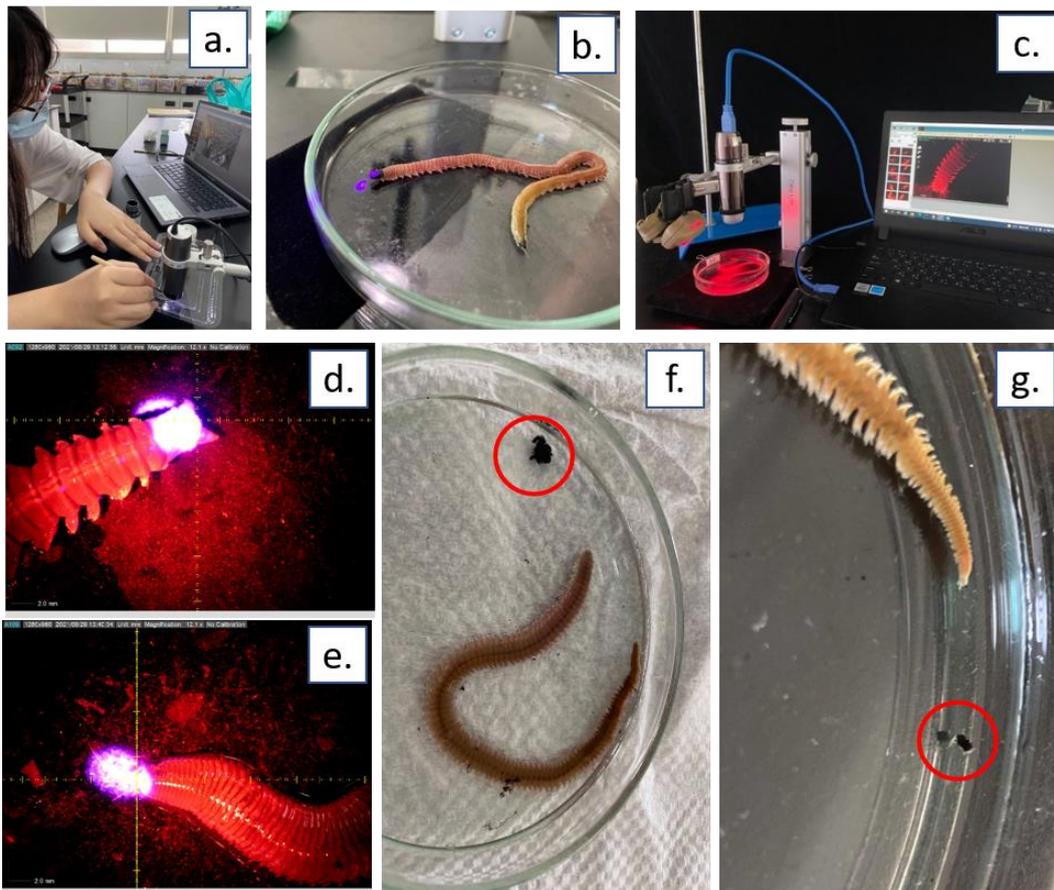
◀圖7. 行為盒設計。

以光照強度和水位深度等兩因子進行設計，觀察沙蠶在弱光、藍光和紅光刺激下，是否會逆習性自深水位區往淺水位區移動。

◆ 目的 (二) 沙蠶的頭部眼點和尾部是否為感光構造？

• 實驗 2：利用遮蔽法探究沙蠶感受藍光的部位

1. 說明：利用黑色壓克力顏料塗抹於頭部眼睛及尾部尾節上，觀察是否可阻斷因藍光照射所引起的逃避行為。
2. 實驗流程：
 - (1) 挑選出4隻頭尾端構造完整的沙蠶個體進行實驗。
 - (2) 顏料塗抹前，所有沙蠶皆需記錄並量化頭、尾部對藍光照射所引起的逃避反應。
 - (3) 在手持顯微鏡下利用黑色顏料塗抹於沙蠶的頭部眼睛及尾部尾節上。
 - (4) 待顏料全乾後，再次記錄並量化頭、尾部對藍光照射所引起的逃避反應。
 - (5) 小心將顏料自沙蠶身上除去，並再次記錄量化藍光照射對沙蠶頭、尾部所引起的逃避反應。



▲圖8. 以黑色顏料塗抹於沙蠶頭、尾部，並觀察及記錄遮蔽處理對藍光所引起的逃避行為是否有影響。

(a) 塗抹操作 (b) 塗抹後頭部受藍光刺激的情形 (c) 錄影設備設置及記錄操作，為降低沙蠶照明時的緊張，實驗過程中以紅燈輔助照明 (d) (e) 分別於頭部、尾部於塗抹處進行藍光照射，並進行影像擷取以量化 (f) 頭部脫落後的顏料 (紅圈內) (g) 尾部脫落後的顏料 (紅圈內)。

◆ 目的 (三) 探討沙蠶尾部的眼外視覺

• 實驗 3-1：觀察尾部形態與沙蠶感受藍光之關聯性

1. 說明：收集尾部不同型態的沙蠶，將尾部進行藍光照射並記錄其反應。

2. 實驗流程：

(1) 將收集到之沙蠶以藍光照射尾部，初步觀察其感光反應。

(2) 用8%的氯化鎂麻醉沙蠶，等候 30 分鐘。

(3) 利用顯微設備觀察沙蠶尾部結構，分為三區：末端體節、肛節、肛鬚。

• 實驗 3-2：觀察沙蠶頭段與尾段分離後對藍光刺激之反應

1. 說明：沙蠶是具有再生能力的動物，本實驗希望能藉由其再生能力進一步檢視尾部感光構造。

2. 實驗流程：

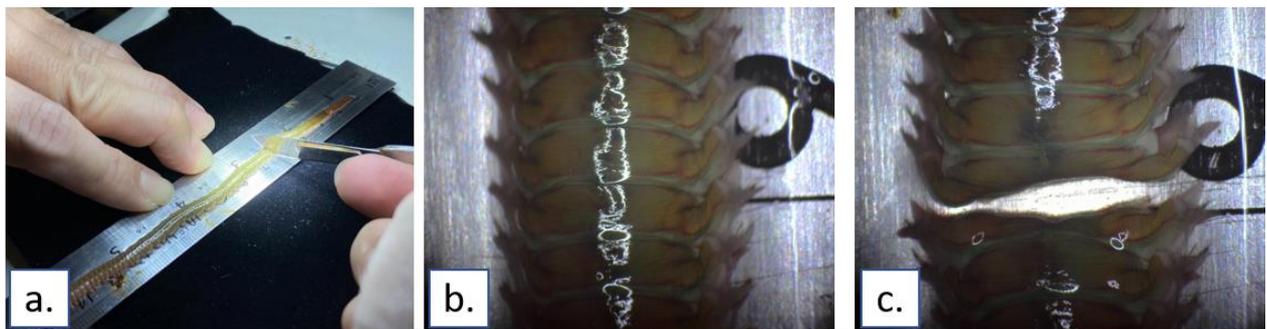
(1) 挑選出8隻頭尾端構造完整的沙蠶個體進行實驗。

(2) 用8%的氯化鎂麻醉沙蠶，等候30分鐘。

(3) 將麻醉後的沙蠶置於不鏽鋼鐵尺上測量體長，以決定切點，用手術刀切斷佔身體總長約1/3的尾部。

(4) 切除後的頭段和尾段分開培養，每日進行換水與觀察。

(5) 術後的1、3、5日觀察記錄頭段尾端再生的情形，也同步對頭段頭端、後端和尾段尾端進行藍光的照射與逃避行為之觀察記錄和量化分析。



▲圖9. 利用手術分割沙蠶頭段和尾段。

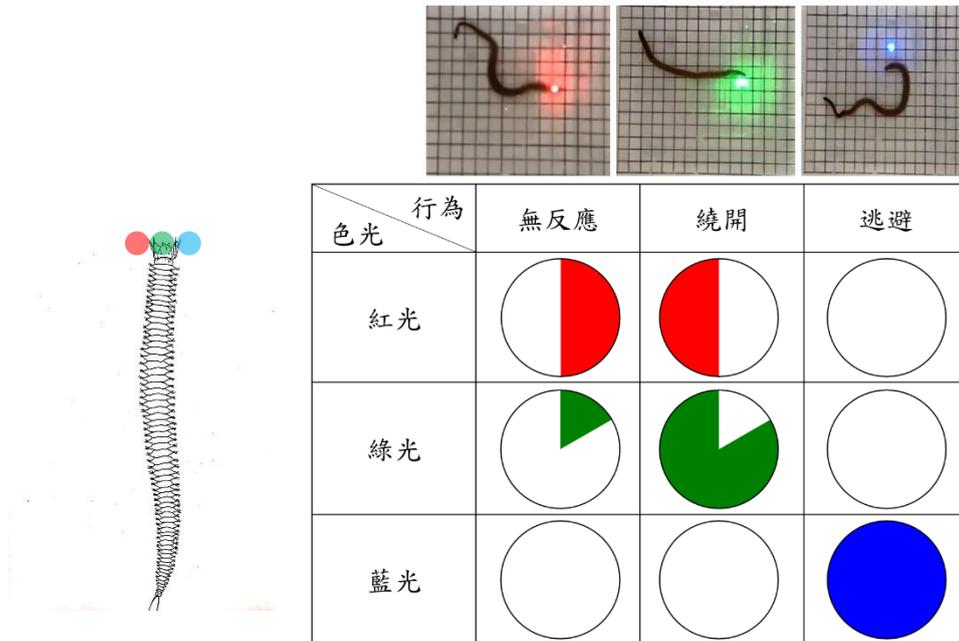
(a) 利用手術刀將置於不鏽鋼鐵尺的沙蠶進行分割；(b) 切割前視野 (c) 切割後視野，明顯可見平整的切口位於兩體節之間。

伍、研究結果

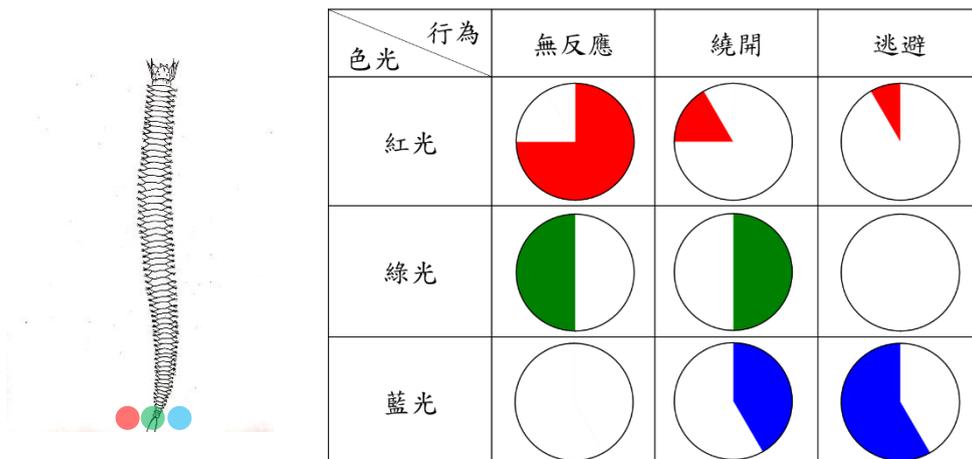
• 實驗 1-1：觀察沙蠶對不同色光之反應

以紅、綠、藍，三色照射沙蠶頭部及尾部，觀察到沙蠶的行為大致可分為以下三種：

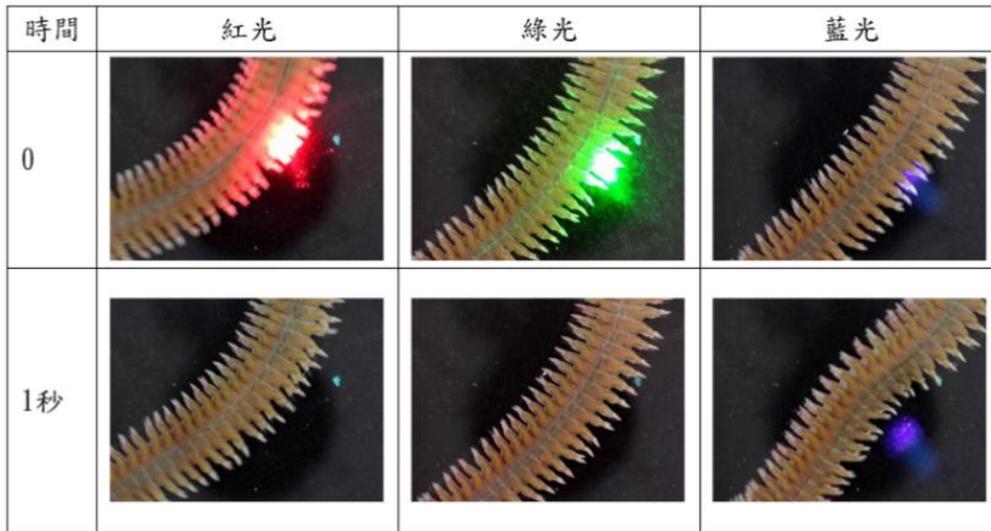
- (一) 無反應：在定點光照射下無任何遠離、躲避或是繞轉情形；
- (二) 繞開：在定點光照射下出現轉彎，繞開情形；
- (三) 逃避：在定點光照射下出現部位收縮，躲避行為。



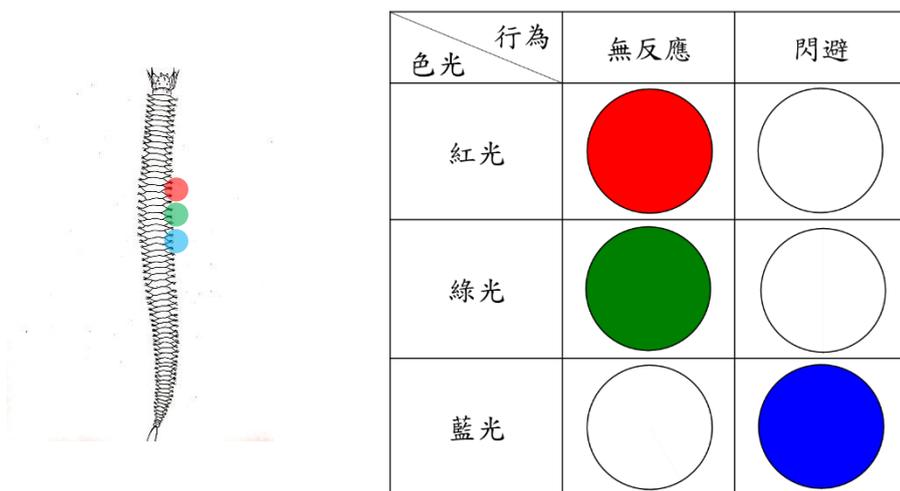
▲圖10. 沙蠶頭部對三色光反應圓餅圖。利用紅、綠、藍三色光照射沙蠶頭部，沙蠶會產生三種行為：無反應、繞開、逃避。在藍光照射下，頭部100%為逃避行為；在綠光照射下，頭部以繞開表現為主；而在紅光照射下，繞開及無反應各占比50%。



▲圖11. 沙蠶尾部對三色光反應圓餅圖。利用紅、綠、藍三種色光的雷射筆照射沙蠶尾部，在藍光照射下，尾部大多產生逃避反應；在綠光照射下，尾部繞開及無反應的表現各佔 50%；而在紅光照射下大多是呈現無反應的情形。



▲圖12. 沙蠶疣足受藍光照射後會引起體節的閃避反應。上圖為受到紅、綠、藍三種光照時的截圖，下圖為光照1秒後的截圖，藍光會引起沙蠶體節產生橫向位移現象。



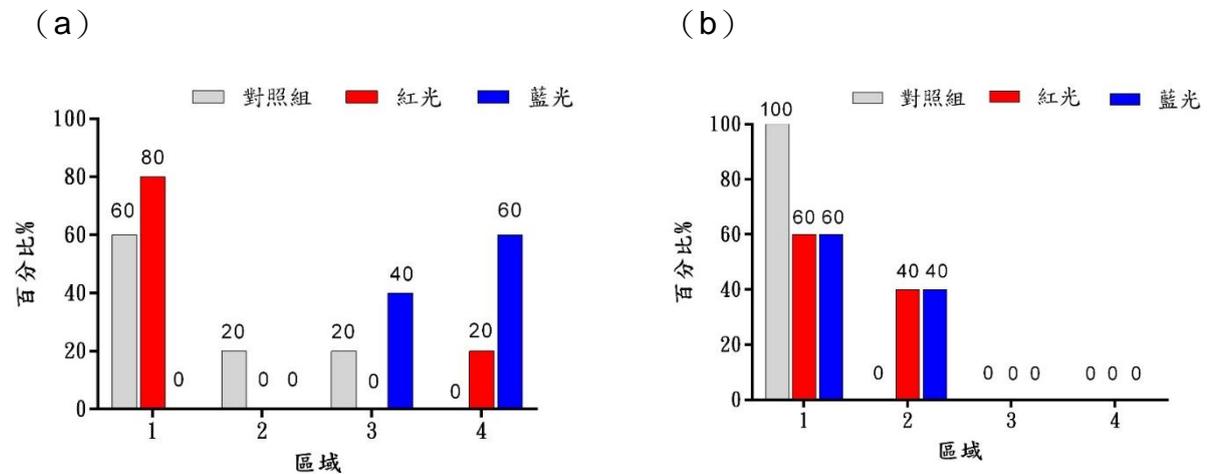
▲圖13. 沙蠶疣足對三色光反應圓餅圖。利用紅、綠、藍三種色光的雷射筆照射沙蠶疣足，只有藍光的照射會引起沙蠶體節的橫向位移，而產生明顯的閃避反應。

■ 實驗結果：

沙蠶的頭部、尾部和疣足對紅光感受最差，但對藍光感受則最為敏感。而綠光則介於紅、藍兩色之間。且藍光會引起沙蠶的頭部、尾部和疣足均產生明顯的逃避（閃避）反應。

• 實驗 1-2：觀察沙蠶對不同色光強弱之敏感度

接續實驗1-1進一步以不同強度之紅、藍色光照射沙蠶頭部及尾部，觀察記錄沙蠶之行為反應，結果如下圖14。



▲圖14. 觀察沙蠶頭部和尾部在弱光、紅光和藍光亮燈2分鐘後於空間內的位置。

(a) 當頭部在弱光和紅光條件下，超過一半的沙蠶個體，其頭部仍處在第1區。

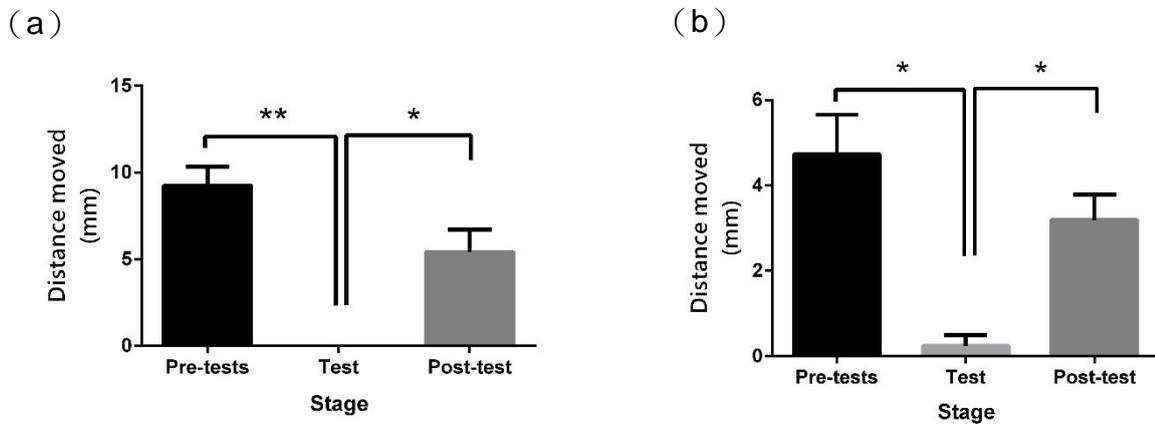
而在藍光照射下，所有個體的頭部皆已移動至離照射點較遠的第3區(40%)和第4區(60%)。(b) 尾部在三種光照射下皆無特別反應，移動位置介於第1區及第2區之間。

■ 實驗結果:

對照組沙蠶會分散移動在前三區。但沙蠶頭部受藍光照射後，皆移動至離光源較遠的第3、4區，顯見沙蠶頭部經藍光照射後會產生明顯的逃避行為，此結果與實驗1-1相符；而使用紅光照射則無明顯位移。與此同時，沙蠶尾部在紅、藍兩色不同光梯度照射下，移動範圍並無差異，顯示沙蠶頭部對藍光的敏感度大於尾部。

• 實驗2：利用遮蔽法探究沙蠶感受藍光的部位

以顏料塗抹沙蠶頭部和尾部進行遮蔽後，觀察塗抹前（Pre-test）、塗抹後（Test）和顏料洗淨後（Post-test）沙蠶受藍光刺激之反應，結果如下圖15。



▲ 圖15. 沙蠶頭部、尾部經顏料遮蔽前後對藍光之反應。

(a) 當頭部以顏料遮蔽後，其受藍光照射前後1秒鐘之位移距離為零，與Pre-test和Post-test有顯著差異。(b) 當尾部以顏料遮蔽後，其受藍光照射前後1秒鐘之位移距離與Pre-test和Post-test亦有顯著差異 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。統計方法採用one-way ANOVA followed by tukey's test，誤差線為平均值標準誤差。

■ 實驗結果：

以顏料塗抹沙蠶頭部和尾部確實能遮蔽沙蠶對藍光的接收，使之不產生逃避行為。且顏料經清洗後對藍光仍有逃避反應，顯見以顏料塗抹並未對沙蠶造成不可逆的傷害。

● **實驗3-1：觀察尾部形態與沙蠶感受藍光之關聯性**

將收集到不同尾部型態之沙蠶進行比較，並以藍光照射後記錄其反應結果如圖16。

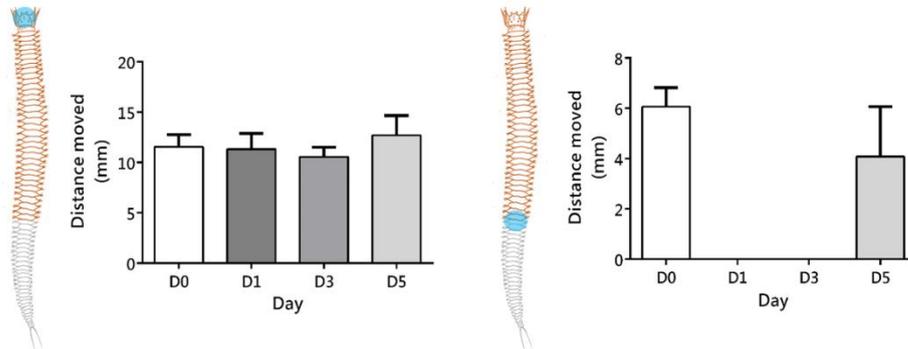
尾部 型態				
	結構完整	有肛節 沒有肛鬚	沒有肛節 沒有肛鬚	肛節部分再生 有肛鬚
對藍光 之反應	2	2	0	2
	(0：無反應 1：有反應但較緩和 2：反應激烈明顯)			
▲圖16. 沙蠶不同型態之尾部在藍光照射後反應情形。				

■ **實驗結果：**

沙蠶尾部在使用藍光照射後，對於尾部構造完整、沒有肛鬚和尾部部分再生等三種形態具有逃避的行為表現，並藉此比對出肛節的有無，對藍光的感受扮演關鍵的角色。

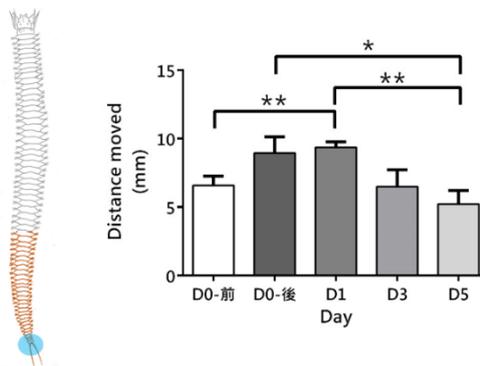
• 實驗3-2：觀察沙蠶頭段與尾段分離後對藍光刺激之反應

因沙蠶為具有再生能力之動物，故進一步以手術切除方式，探討沙蠶頭、尾之感光構造，亦試圖想了解其眼外視覺能力是否會因構造再生而具有再現性，結果如圖17.18。



▲圖17. 沙蠶經手術切除後，其前2/3頭段的頭.後兩端照射藍光後之反應。

(a) 頭端對藍光之反應，當天未手術前測D0和術後1、3、5天在藍光照射下其反應一致。(b) 尾端當天未手術前測D0和術後1、3、5天照射藍光照射下，發現在第5天頭段尾部開始出現對藍光之逃避反應。誤差線為平均值標準誤差。



▲圖18. 沙蠶經手術切除後，其後1/3切下之尾段的尾端照射藍光後之反應。

個體在斷尾前後均對藍光有反應，其在術後1天(D1)和術前其對藍光反應有顯著差異。且術後1天(D1)和術後5天(D5)對藍光之逃避反應亦有顯著差異 ($p < 0.05$, $**p < 0.01$)。統計方法採用 one-way ANOVA followed by Fisher's LSD，誤差線為平均值標準誤差。

■ 實驗結果：

沙蠶頭部對於藍光刺激之反應在手術前後具一致性，明顯有躲避藍光之位移表現。而頭段尾端在術後第5天時，逐漸恢復尾端的感光能力。特別是切下之尾部在經過五天後仍具生理活性，且在藍光照射時，依然有躲避藍光之位移行為。其中以手術切除當天和術後一天，生理活性狀態最佳，對藍光反應最為劇烈。

陸、討論及應用

「眼外視覺，Extraocular vision」意指生物的身體除眼睛構造外，另有分布著能夠感光的細胞或蛋白，使得生物能更有效地偵測環境中色光或光線強弱的變化。現今，已有許多動物的眼外視覺現象相繼被報導，例如果蠅的幼蟲[20]、渦蟲[6,14]、海星[17]、海兔[10]和多毛類[4]等。透過眼外視覺的建立，能有助於動物躲避天敵、感受晝夜節律、趨光表現、躲避光害以及動物遷徙等作用。

本研究首次以動物行為、手術切除和藥理學方法，證實「雙齒圍沙蠶的尾部具有能感受藍光的眼外視覺」。有別於過去以沙蠶作為視覺感光研究對象時，大多僅對其視覺相關的基因表現和其分布進行探討，此次我們為建立了一套以行為科學為基礎，探討沙蠶視覺能力的研究方法。

一、沙蠶對藍光逃避行為之發現

在海洋中，視覺是海洋生物最重要的感覺系統之一，隨著海洋的深度、型態塑造出光環境的多樣性，而生物為因應環境的變化，也演化出各式各樣不同的視覺能力。即使是簡單的海洋浮游動物蠕蟲、海綿、水母等的幼蟲都具有最簡單的眼點結構，眼點雖不能成像，但卻能感受光的方向，進而表現出會向光游動的趨光特性。

首先，透過行為觀察實驗對雙齒圍沙蠶感受不同色光的趨避能力進行探討，從實驗1-1和1-2的結果能發現，沙蠶**頭部**對藍光會產生明顯的逃避行為，此外在**尾節和疣足**也呈現出一樣的反應，對藍光非常敏感，一旦該部位受到藍光照射，沙蠶個體會立即產生逃避反應（圖10、11、12）。為更進一步判別沙蠶對光的趨避行為是否會受光照強度的影響，藉以釐清沙蠶對不同色光之敏感性。我們利用水生生物喜愛待於深水的本能行為，進行趨光行為研究常用的「**光梯度法**」作為實驗設計，首先營造水位深淺分區，觀察到對照組沙蠶大部分都待在海水量最多的第一區，確認沙蠶很其他水生生物一樣喜好海水較多的區域。接著再營造藍光和紅色的不同光梯度強弱環境，發現沙蠶對紅光與對照組相比並無明顯行為差異，但換藍光照射時，即使弱光區的水位較淺，沙蠶仍會逃離水深但藍光較強的區域，再次顯示沙蠶對藍光之排斥，且實驗發現是由頭部帶動軀體遠離藍光光源，尾部分布的区域則無明顯逃離現象（圖14）。

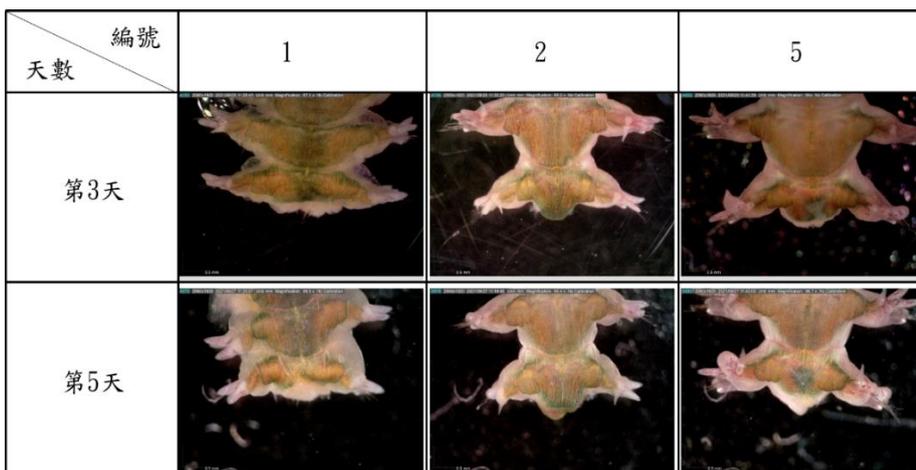
沙蠶是夜行性動物，在夜間的活動量明顯高於白天，其擁有良好的行動及游泳能力[2]，以生物演化適應角度而言，若沙蠶除了頭部以外，個體上能有其他大量對藍光敏感的構造接收光線，將能有助於正確地在夜間出沒，並減少被晝行性的天敵，如魚類、螃蟹或水鳥捕食的可能。

二、沙蠶眼外視覺構造之探討

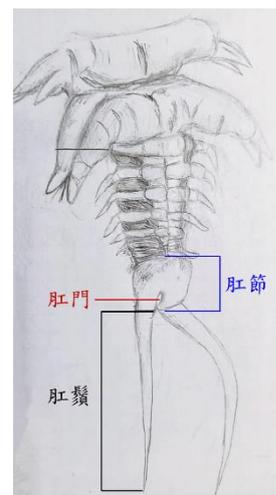
我們觀察沙蠶的頭部時，肉眼清晰可見四個黑色的眼點（圖3b、3d），但尾部卻沒有發現有眼點的存在。實驗2利用遮蔽的方法將頭部和尾節塗抹上黑色的壓克力顏料，目的為檢視尾部可能的感光區域位在何處？結果顯示，沙蠶頭部的眼點和肛節是負責感受藍光的重要區域（圖15）。另實驗3-1以不同沙蠶尾部型態比較和其對藍光之反應，也同步驗證尾部的肛節是負責感受藍光的重要部位（圖16）。

過去研究渦蟲眼外視覺的文獻指出，當渦蟲頭的眼點部受到405nm波長的藍光照射時，會引起渦蟲產生逃避藍光的行為反應。有趣的是，若將兩個眼點消除後，渦蟲依然會對藍光做出同樣的逃避反應，證實了渦蟲具有眼外視覺。此外，若以藍光照射渦蟲尾部時，尾部肌肉會產生收縮的現象，且將渦蟲身體分切成五段後，各區段也都會產生收縮的現象，結果顯示了渦蟲的眼外視覺感光區域實際上分布於全身[6]。為了進一步探究沙蠶尾部的眼外視覺，我們將沙蠶全長約1/3的尾部段切除，實驗結果顯示，所切下尾部段的尾節依然能對藍光的刺激產生逃避的反應，並且持續至少五天的時間，顯示尾部的感光反應與頭部是否存在並無關聯。此外，我們觀察到術後的當天，尾節逃避藍光的移動距離明顯較連結頭部時來得更大，並於術後的隔天達到顯著之差異（圖18）。造成此現象形成的原因可能是與頭部對於尾部的運動控制消失有關。

由於沙蠶具有組織再生能力，實驗3-2的結果顯示，頭段尾端在術後第5天時，共有三隻個體重新恢復了尾端的感光能力，我們將尾端的型態進行比較，發現恢復感光能力的個體，牠們的傷口處已有良好的癒合且較第3天的尾端更為突出（圖19）。因此，若突出的部位即將發展成為肛節，且合併實驗3-1的觀察，我們推估肛節處可能存在著感光的構造。



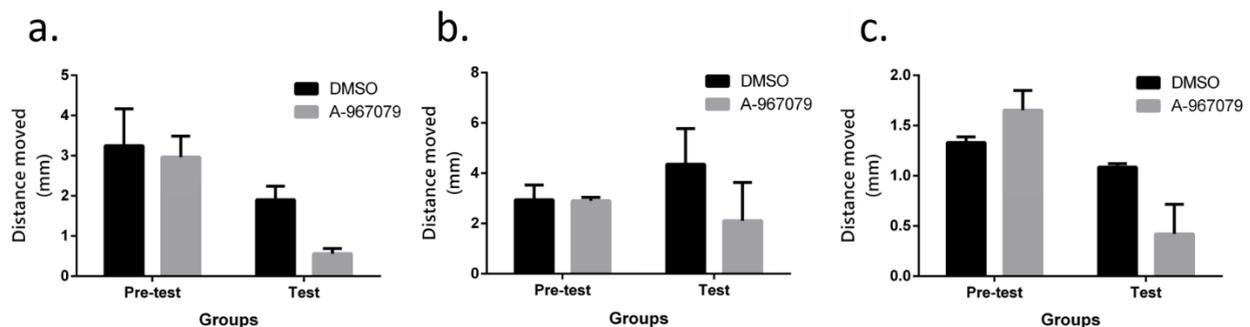
▲圖19.沙蠶頭段尾端經過5天再生的情形



▲圖20.沙蠶尾部手繪圖

三、沙蠶感受藍光生化機制初探

沙蠶科的闊沙蠶 (*Platynereis dumerilii*) 是從事晝夜節律相關研究常用的模式物種之一。研究發現，缺少頭部的闊沙蠶在經過14天以16hr白天與8hr黑夜的條件培養後，依舊能維持晝夜節律相關基因的正常表現，顯示闊沙蠶頭部以外實際存在著能感受晝夜變化的接收器[3]。視蛋白 (Opsins) 是一群以G蛋白偶聯受體為結構的穿膜蛋白，主要的功能是負責讓動物的光接受器 (Photoreceptor) 細胞能對光敏感。無脊椎動物的感光細胞稱為彈狀細胞 (Rhabdomeric Photoreceptors)，內含彈狀視蛋白 (Rhabdomeric Opsins, r-Opsin)。文獻資料顯示，闊沙蠶的彈狀視蛋白分布位置包含了頭部的四個眼點和每一對的疣足上，且彈狀視蛋白與「瞬態電壓感受器陽離子通道 (Transient receptor potential ankyrin subtype 1 protein, TRPA1) 彼此間是共同表現並協同作用，目的是讓視蛋白受光照誘發活化後，能進一步透過訊息傳遞開啟TRPA1通道，讓鈣離子流入細胞內，引起細胞的活化[15]。此外，由於渦蟲的眼外視覺功能也需要TRPA1的參與[6]，因此，本研究的最後一個目標是希望透過TRPA1的專一性抑制劑，既A-967079的使用，能進一步釐清沙蠶視覺功能的運作機制。A-967079已被證實可作用於多毛綱的小頭蟲 (*Capitella teleta*)，降低TRPA1的活化[13]。



▲圖21. TRPA1的專一性抑制劑A-967079對沙蠶藍光視覺之影響。

圖 (a) 頭部、(b) 尾部和 (c) 疣足對藍光刺激所產生的逃避反應之大小 (各組n=2)。實驗中所使用的A-967079或DMSO會添加入海水中稀釋。浸泡藥物前，所有的動物會預先進行前測 (Pre-test) 以確保動物對藍光的反應。動物經過四小時濃度為40uM的A-967079或與藥物等體積的DMSO浸泡後，會再進行一次行為測試 (Test)。

實驗結果顯示，A-967079能抑制頭部和疣足對藍光的逃避 (迴避) 反應，但對尾部卻無明顯之影響 (圖21)。此結果與闊沙蠶的彈狀視蛋白分布位置的結果相似，推測TRPA1蛋白可能參與了雙齒圍沙蠶眼點和疣足感受藍光的機制。由於本實驗所使用的沙蠶個體數、藥物劑量以及浸泡時間仍未盡完善，需更多時間再進一步實驗釐清。

四、沙蠶對棲地光環境變化之適應性

海洋自然光場 (Light field) 係指自然光源 (太陽或月亮) 的光能在海水介質中的分布型態。以潮間帶為例，影響水中光場型態的因素可分為三點：(1) 潮高、(2) 海浪和 (3) 水中懸浮物[7]。研究指出，無論是在白天亦或是月光的夜晚，短波長的色光 (400-450nm的藍光) 都較長波長的色光 (650nm紅光) 在海水中具有更佳的穿透力[19]，其中，若海水達10公尺的深度，紅光幾乎難以穿透水層[7]。

雙齒圍沙蠶[2]和闊沙蠶[19]在交配季的夜晚時，在短時間內會出現成群結隊的沙蠶游到水中進行交配，此現象稱為「群婚」。最新發表的文獻顯示，闊沙蠶能利用彈狀視蛋白和L-cry蛋白 (一種對藍光敏感且負責調控動物晝夜節律的轉錄蛋白) 偵測月光，使得大量的沙蠶能同步在一天的時間內引起「群婚律動」的交配盛況[19]。根據闊沙蠶體內的彈狀視蛋白和L-cry蛋白分布型態，得知這兩種蛋白會在眼點以外的地方分布 [3,4,13]。因此，眼外視覺對於沙蠶科動物的群婚律動可能扮演著重要的角色，特別是與偵測環境中的藍光有關。如此相互交聯將有助於沙蠶在潮間帶環境中的生存適應，可更準確地掌握晝夜節律，於白天躲避天敵、夜晚群婚律動生殖繁衍。

五、沙蠶眼外視覺研究之重要性與應用性

本研究為探討沙蠶的眼外視覺能力建立了一套以行為科學為基礎的研究方法，發現「雙齒圍沙蠶的尾部具有能感受藍光的眼外視覺」，且此眼外視覺現象可能與沙蠶維持體內的晝夜節律有關。而掌握分辨晝夜的能力是動物維持生理時鐘很重要的關鍵。以人類為例，光線從眼睛進入再刺激視網膜上的感光神經，就能將環境的顏色和影像傳送至我們的大腦。不同的色光除了能讓我們看見多彩的世界，也能調節我們的生理時鐘，其中，以藍光的影響最為明顯。在白天時，眼睛接收到藍光，喚醒身體在白天的生理狀態；而夜晚時，由於藍光大量的減少則是宣告夜晚的來臨。但若眼睛在夜晚時仍接收過量的藍光，就會干擾原先夜晚的生理時鐘，進而對睡眠品質和人體免疫力造成負面影響[18]。

未來若能進一步探究藍光對沙蠶晝夜節律之影響與其細胞分子機轉，基於生物在演化上重要構造發育的保守性，或許相關之實驗方法或結果也能延伸運用於人類在接觸大量3C產品時，接觸大量藍光刺激影響人體生理時鐘和內分泌的相關研究議題上。

柒、結論

- 一、雙齒圍沙蠶頭、尾部和疣足對不同色光有所反應，反應程度為：藍光>綠光>紅光，當受到藍光照射，沙蠶個體會立即產生逃避行為，且頭部反應較尾部明顯。
- 二、在不同的紅、藍色光梯度的照射下，沙蠶頭部對藍光敏感產生明顯逃避行為。
- 三、沙蠶的眼外視覺現象中，肛節和疣足對於藍光之接收具有重要性。
- 四、被切下的沙蠶尾部在具生理活性時，仍能對藍光的刺激產生逃避的反應，顯示沙蠶尾部具獨立的眼外視覺能力。
- 五、TRPA1陽離子通道蛋白可能參與沙蠶眼點和疣足感受藍光的機制。

捌、參考資料

- [1] 彭慧文、曾昀婷、劉力文。渦`光`食`色！群下的秘密—探討渦蟲個體與群體的游泳行為。中華民國第 56 屆中小學科學展覽會。
- [2] 吳彥儀 (2015)。雙齒圍沙蠶半月群婚律動機制。國立中山大學碩士論文。
- [3] Arboleda, E., Zurl, M., Waldherr, M., & Tessmar-Raible, K. (2019). Differential impacts of the head on *Platynereis dumerillii* peripheral circadian rhythms. *Frontiers in physiology*, 10, 900.
- [4] Backfisch, B., Rajan, V. B. V., Fischer, R. M., Lohs, C., Arboleda, E., Tessmar-Raible, K., & Raible, F. (2013). Stable transgenesis in the marine annelid *Platynereis dumerillii* sheds new light on photoreceptor evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(1), 193-198.
- [5] Bhuiyan, K. A., Rodríguez, B. M., Pires, A., Riba, I., Dellvals, Á., Freitas, R., & Conradi, M. (2021). Experimental evidence of uncertain future of the keystone ragworm *Hediste diversicolor* (OF Müller, 1776) under climate change conditions. *Science of The Total Environment*, 750, 142031.
- [6] Birkholz, T. R., & Beane, W. S. (2017). The planarian TRPA1 homolog mediates extraocular behavioral responses to near-ultraviolet light. *Journal of Experimental Biology*, 220(14), 2616-2625.
- [7] Cummings, M., & JOHNSEN, S. (2007). Light, effects of. *Encyclopedia of Tidepools and Rocky Shores*, (1), 325.

- [8] Hsueh, P. W. (2019). Neanthes (Annelida: Nereididae) from Taiwanese waters, with description of seven new species and one new species record. *Zootaxa*, 4544(1), 173-198.
- [9] Jékely, G., Colombelli, J., Hausen, H., Guy, K., Stelzer, E., Nédélec, F., & Arendt, D. (2008). Mechanism of phototaxis in marine zooplankton. *Nature*, 456(7220), 395-399.
- [10] Lyons, L. C., Rawashdeh, O., & Eskin, A. (2006). Non-ocular circadian oscillators and photoreceptors modulate long term memory formation in *Aplysia*. *Journal of biological rhythms*, 21(4), 245-255.
- [11] Musilova, Z., Cortesi, F., Matschiner, M., Davies, W. I. L., Patel, J. S., Stieb, S. M., 396 Busserolles, F. de, Malmstrøm, M., Tørresen, O. K., Brown, C. J., et al. (2019). Vision 397 using multiple distinct rod opsins in deep-sea fishes. *Science* 364, 588–592.
- [12] Nava, S. S., An, S., & Hamil, T. (2011). Visual detection of UV cues by adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of vision*, 11(6), 2-2.
- [13] Ogino, T., & Toyohara, H. (2019). Identification of possible hypoxia sensor for behavioral responses in a marine annelid, *Capitella teleta*. *Biology open*, 8(3), bio037630.
- [14] Paskin, T. R., Jellies, J., Bacher, J., & Beane, W. S. (2014). Planarian phototactic assay reveals differential behavioral responses based on wavelength. *PloS one*, 9(12), e114708.
- [15] Revilla-i-Domingo, R., Rajan, V. B. V., Waldherr, M., Prohaczka, G., Musset, H., Orel, L., Gerrard, E., Smolka, M., Farlik, M., Lucas, R. J., Raible, F. & Tessmar-Raible K. Analyses of Cephalic and Non-cephalic Sensory Cell Types Provide Insight into Joint Photo- and Mechanoreceptor Evolution. Characterization of cephalic and non-cephalic sensory cell types provides insight into joint photo-and mechanoreceptor evolution. *Elife*, 2021, 10: e66144.
- [16] Schwab, I. R. (2018). The evolution of eyes: major steps. The Keeler lecture 2017: centenary of Keeler Ltd. *Eye*, 32(2), 302-313.
- [17] Sumner-Rooney, L., Kirwan, J. D., Lowe, E., & Ullrich-Lüter, E. (2020). Extraocular vision in a brittle star is mediated by chromatophore movement in response to ambient light. *Current Biology*, 30(2), 319-327.
- [18] Zhao, Z. C., Zhou, Y., Tan, G., & Li, J. (2018). Research progress about the effect and prevention of blue light on eyes. *International journal of ophthalmology*, 11(12), 1999.
- [19] Zurl M., Poehn B., Rieger D., Krishnan S., Rokvic D., Rajan V.B.V., Gerrard E., Schlichting M., Orel L., Lucas R.J., Wolf E., Helfrich-Förster C., Raible F., Tessmar-Raible K. 2021. Two light sensors decode moonlight versus sunlight to adjust a plastic circadian/circalunidian clock to moon phase. bioRxiv. doi:10.1101/2021.04.16.440114
- [20] Zordan, M., Osterwalder, N., Rosato, E., & Costa, R. (2001). Extra ocular photic entrainment in *Drosophila melanogaster*. *Journal of neurogenetics*, 15(2), 97-116.