

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會 作品說明書

國中組 生物科

佳作

030311

蚤必投光？水蚤趨光行為及其可塑性研究

學校名稱： 宜蘭縣立國華國民中學

作者： 國二 邱量 國二 周益華 國二 林羿伶	指導老師： 覺一容 邱旻昇
--	-----------------------------

關鍵詞： 多目標追蹤、趨光行為、運動分析

蚤必投光？水蚤趨光行為及其可塑性研究

摘要

本研究探討水蚤 *Daphnia pulex* 趨光行為的可塑性與各運動數值差異，藉自行開發的 YOLOv8 模型追蹤多隻水蚤的移動軌跡，並使用 tracker 軟體分析數據。證實了 ByteTrack 多目標追蹤演算法在生物研究中具有重要的應用價值，尤其適用於微小生物運動研究，為微觀尺度生物研究領域帶來了新的貢獻。研究顯示水蚤傾向趨光，水蚤日齡越大、光強度越強、光波長越長，和黑暗前置都會使水蚤在趨光測試中移動速度增快。遺傳和生長環境皆會影響到水蚤對光線刺激的行為反應，並發現水蚤在利他素或模擬掠食者的環境下，趨光偏好明顯轉變。趨光水蚤面對掠食者擁有更高逃脫率，並意外發現了水蚤禦敵時會行繞圈運動。此外，在水蚤基因體中發現多處與果蠅的 rhodopsin 蛋白高度相關的序列，值得未來進一步研究。

壹、研究動機

在經歷國中的生物研究時，曾在發愁要用什麼作為水蠶的食物，進行池水採樣時，總會發現有許多體型小且顏色透明的生物在水中活動，因而認識了近在眼前但卻不知道名字的水蚤。這次經驗激發了我們對水蚤的強烈興趣，希望深入研究這種在水中活動的微小生物，特別是對其運動模式和趨光行為的瞭解。我們觀察到有些水蚤會受到光的吸引，然而查詢相關文獻卻顯示水蚤為負趨光，兩者間出現矛盾，這使我們感到困惑，究竟水蚤屬於趨光或不趨光？或是因物種而異？這種習性是先天遺傳控制的嗎？還是後天學習而來的呢？水蚤的趨光行為是否有利於生存？由於水蚤在生態系統中的重要性，我們決定聚焦於水蚤 *D. pulex* 的運動行為及其對光的反應，以深入了解其在水域生態中的角色和影響。

貳、研究目的

研究一、不同水蚤生活史階段的運動行為有不同嗎？

研究二、探討不同條件下水蚤的趨光行為的差異

研究三、驗證水蚤趨光行為是否為遺傳控制


研究四、探討趨光行為是否能因後天逆轉？

研究五、探討趨光行為對於水蚤躲避掠食者是否有幫助？


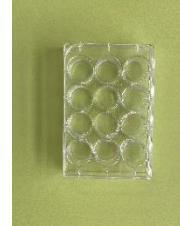







研究六、生物資訊分析水蚤基因體中的感光蛋白序列

參、 研究設備及器材

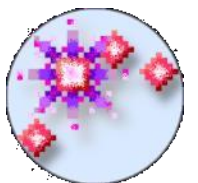





一、研究生物

水蚤 <i>Daphnia pulex</i>	
<p>別名：蚤狀溞、米蚤、小型蚤</p> <p>分類地位： 門： 節肢動物門 <i>Arthropoda</i> 綱： 鰓足綱 <i>Branchiopoda</i> 目： 枝角目 <i>Cladocera</i> 科： 溞科 <i>Daphniidae</i> 屬： 溞屬 <i>Daphnia</i></p>	
<p>外型特徵： 水蚤的本體為 1-5 毫米長,並且被劃分成段。水蚤的頭部通常向下彎曲朝向身體並且與身體融合,有一個可見的槽口將兩者區分開來。身體的其餘部分是由甲殼覆蓋,有五或六對腿處於其腹側間隙之中。</p>	

二、設備器材

培養皿 	滴管 	燒杯 	篩網 	細胞培養孔盤 	紅外線攝影機 
濾光片 	懸滴玻片 	解剖顯微鏡 	複式顯微鏡 	環狀燈管 	自製篩選器 
燈管 	LED 光板 	拍攝腳架 	全遮光貼膜 	紗網 	手機支架 

三、實驗軟體

Tracker 	Image J 	VS Code 	YOLOv8 	roboflow 	光度計 
--	--	--	---	---	--

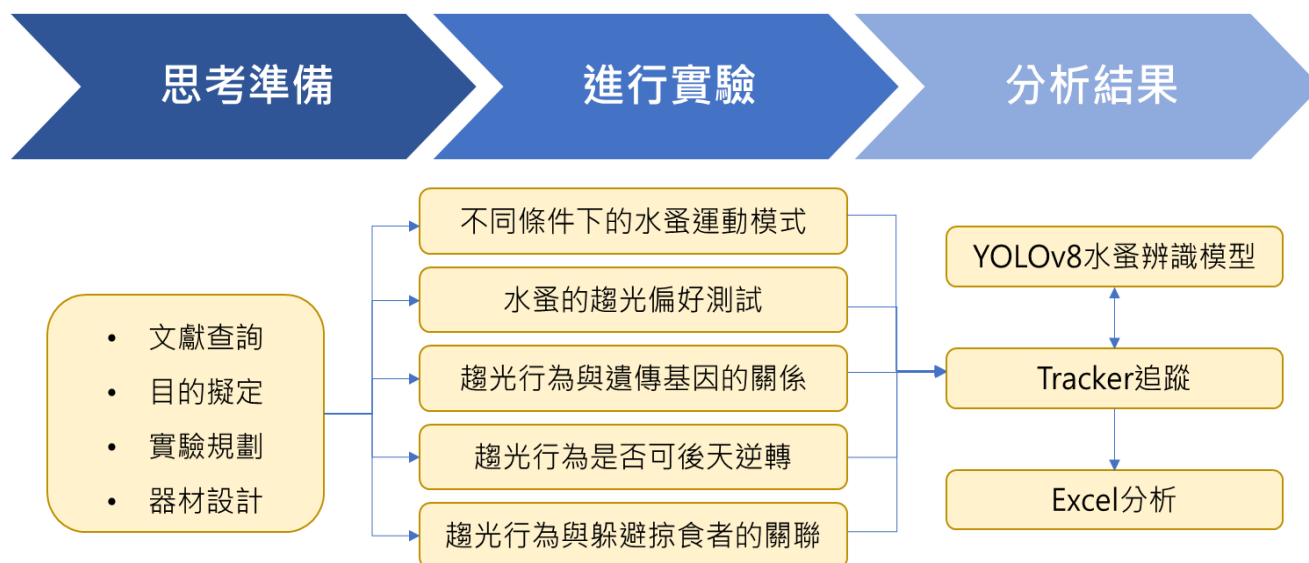
肆、 文獻整理

作者	研究題目	研究論點
游淵任 洪廷玠 (2000)	生死相「半」·你 「農」我「濃」	1. 研究不同年齡擬同形蚤對丁基加保伏乳劑之半致死濃度 (LC ₅₀)，體型小幼蚤對農藥耐受性越差。 2. 針對台東著名產稻地的稻田水蚤種類做野外實察。
魏博滔 蕭奕佺 呂紹頡 (2021)	「蚤」出「癮」 形殺手—成癮物 質對水蚤心搏之 影響	1. 探討成癮物質對水蚤心搏的影響 2. 實驗劑量過高會導致水蚤心跳變慢甚至死亡 3. 本研究還探討了成癮物質的特性及對人心跳的影響，透過生活經驗與文獻探討，了解成癮物質的相關知識。
李佳螢 張碩珍 (2009)	蚤尋活水	1. 研究水蚤在酸、鹼環境中的生存情況及外表，發現水蚤在酸性環境下很快就死亡，且殼發生脫離現象 2. 研究水蚤對不同重金屬的承受能力，每一種金屬離子對水蚤都有一定的傷害程度，其中銅離子傷害性最大。
羅芝瓚 梁筑庭 宮昕儀 (2021)	塑膠微粒對大型 蚤生殖的影響	1. 研究發現塑膠微粒會造成大型蚤育卵年齡延遲、平均子代數、體長成長量及子代存活率下降。 2. 暴露在塑粒環境中的親代所產下的子代，若移置於無塑環境中成長則會有恢復的現象。
梁晏誠 甘閔燁 郭晏伶 (2018)	「貝」受矚目— 探究貝蚤的外形 特徵與行為模式	1. 歸納出貝蚤具有負趨光行為、在高溫環境下貝蚤活動力增加、貝蚤遇到刺激物會先暫停移動再快速離開。 2. 水蚤比例增加會使貝蚤移動速率與 NGDR 值下降 3. 酸性、高鹽份和重金屬離子（鋅、銅）環境會使貝蚤活動力下降。
張博涵 (2010)	米蚤懷卵的孵化 機制及環境適應 力	1. 米蚤的生活史中會產生 4 種不同類型的卵，包含雄性卵、孤雌卵、受精卵及無法孵化的無形卵。 2. 米蚤的蛻皮可加大了卵囊容積，增加孤雌卵數。

我們的見解：上述報告多涉及水質監測相關生物試驗，依水蚤對環境毒性的敏感性，探討不同物質對水蚤生存、耐受性和生殖等方面影響，本研究主軸在於深入水蚤對光的感知和行為模式。國外研究探討的 *D.magna*(大型蚤)屬負趨光，與本研究的 *D.pulex*(小型蚤)反應不同，相關文獻甚少，因此我們決定從運動模式及趨光行為切入，探討 *D.pulex* 趨光偏好，以及在不同操作下變異性及可塑性，以及與掠食者的關係。有助於更全面地理解水蚤的生態適應。

伍、 研究方法

研究流程圖



前置作業

水蚤飼養及準備：

參考生物急毒性檢測方法－水蚤靜水式法(行政院環境保護署，2013)，使用去氯自來水作為馴養水，使用多段定時器維持光照時間為每天 16 小時。實驗用水蚤飼養於 1L 玻璃燒杯中，為避免水蚤意外造成全部死亡，共分散 10 個燒杯進行馴養，燒杯上方使用紗網蓋住避免其他蚊蟲靠近。每週換水一次，清除燒杯底部沉積之食物、殘渣與水蚤排泄物。

水蚤飼料製備方法：

將 7.5 公克小球藻粉、2.5 公克螺旋藻粉、2.5 公克乾酵母粉加入 500 毫升水，以均質機攪打均勻後分裝，冷凍保存。解凍後可冷藏保存 7 天。飼料餵食量約 1 mL/L。



圖 1A. 水蚤飼養準備



圖 1B. 水蚤攝食藻類飼料後，腸道呈現綠色(如小圖)

研究一、 不同生活史階段的水蚤運動行為有不同嗎？

(一) 觀察：

飼養水蚤時，發現同一環境中，不同大小的水蚤如圖 2，運動速度看起來都不盡相同，而且水蚤對於光線的變化十分敏感，於是我們想進一步探究不同時期的水蚤在暗室或亮室中的運動行為是否有差異？性成熟前的齡期為幼齡蚤，性成熟後為成齡蚤，實驗室飼養的水蚤約在 6-9 日達到性成熟，我們探討不同年齡水蚤的運動模式有無差異。



圖 2. 不同大小的水蚤運動速度不太相同

(二) 提出疑問：不同階段的水蚤運動行為是否有差異？

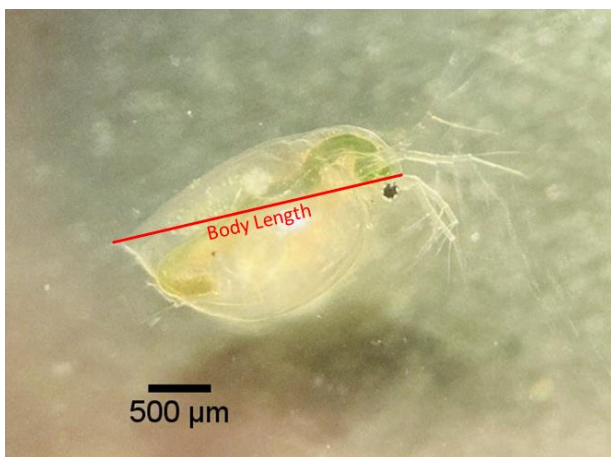
(三) 提出假設：不同日齡的水蚤具有不同的運動行為，如移動速度、移動路徑等應有所差異

(四) 求證假設與實驗方法：

實驗 1-1 水蚤的體型和年齡有沒有相關？多久後不再變大？

1. 將同樣 24 小時內出生的幼蚤分裝至容器中飼養
2. 拍下每天水蚤的生長情況
3. 使用 ImageJ 軟體測量其體長

A



B

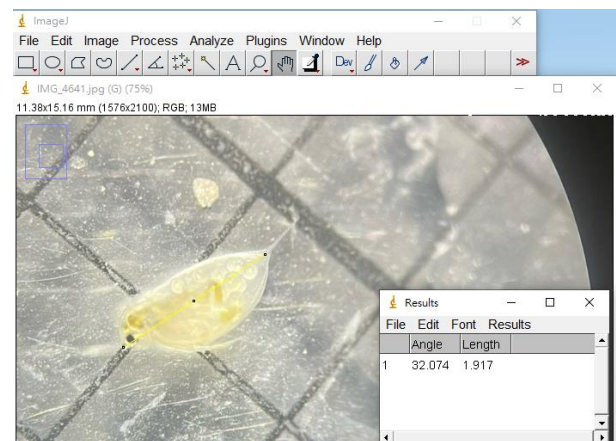


圖 3. 體長測量。A.體長(body length)定義為水蚤頭部至尾部之間的距離，不包含尾刺。B.使用 Image J 軟體量測水蚤體長，自製方格紙透明片，每一格邊長為 2mm 設定比例尺。

實驗 1-2 不同日齡水蚤運動行為的差異

1. 實驗 1-2 取 1 日齡、4 日齡、7 日齡、14 日齡、21 日齡水蚤各 20 隻
2. 利用紅外線攝影機分別在亮室、暗室下進行二維運動分析
3. 前 5 分鐘作為適應期，之後自頂端錄影 5 分鐘，每組進行 3 重覆

二維運動分析 (2D movement analysis) :

是一種用於捕捉、追蹤和分析物體在二維平面上運動的方法，測試全程在黑暗行為房(45cm×90cm×105cm)的實驗場地進行，將水蚤置於圖 4 裝置的培養皿中(Φ90mm×15mm)，事先倒入水 35ml，水體厚度約為 5mm，此活動空間能讓水蚤自由活動且不會感到不適，水體高度亦無法讓水蚤間重疊。使用紅外線攝影機(RUNSPIKE)自上方俯拍記錄(紅外線波長 850nm，30fps，1080×1920)，其後擷取 1 分鐘水蚤運動影片，匯入 Tracker 手動追蹤物體水蚤的運動軌跡和姿態，獲得有關運動特徵和動作的詳細資訊。

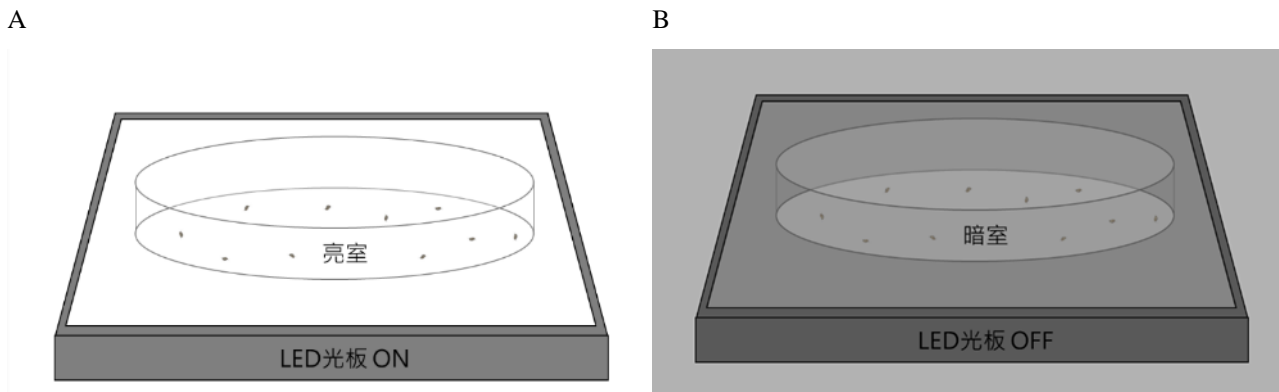


圖 4. 二維運動分析裝置。A.亮室運動環境，開啟 LED 光板，亮度控制為 1600lux。B.暗室運動環境，關閉 LED 光板，亮度控制為 0lux。

Tracker 分析方式：

將實驗影片匯入後，先建立空間座標系統，調整校正桿刻度，如圖 5。設定影片時間間隔，以 10 個影格(約 0.3 秒)為單位，縮放畫面找到目標水蚤，選擇水蚤影像中心點新增質點標記追蹤，完成追蹤後進行軌跡的校正與調整，提取所需的數據至 EXCEL 進行簡單運算，如個體 x、y 座標、速度、加速度等數據，以解釋物體的運動特性。

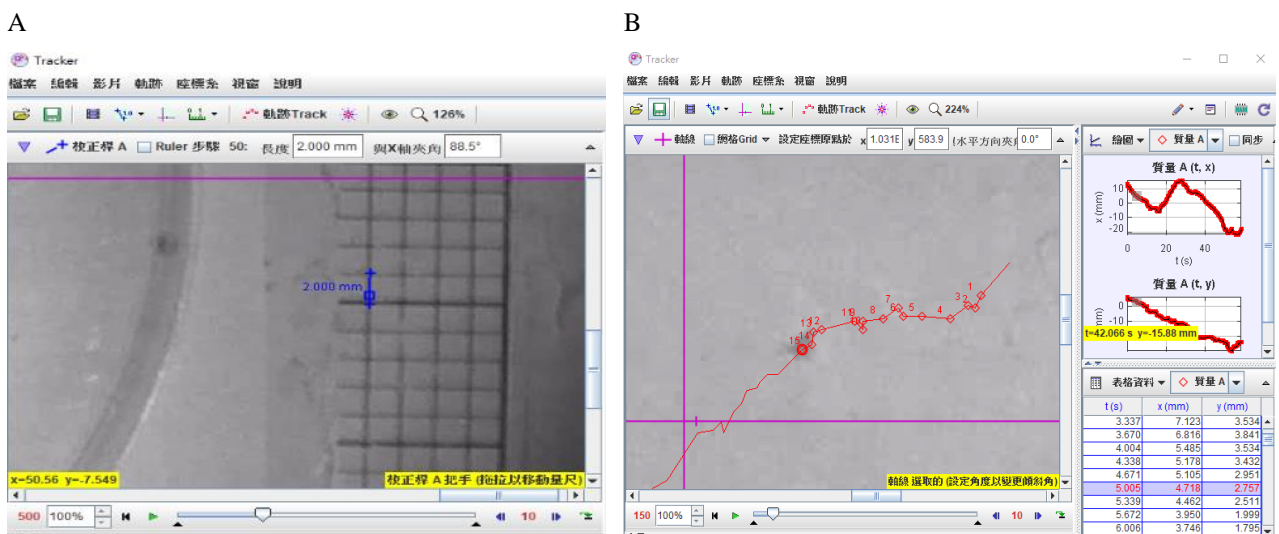
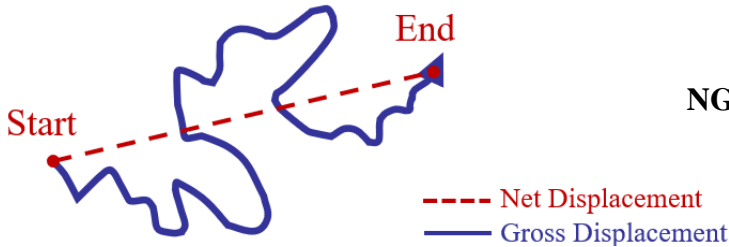


圖 5. Tracker 分析。A.設定座標系統。B.手動標示水蚤移動軌跡

NGDR(Net to Gross Displacement Rati)：

NGDR 譯作淨總位移比，是一常用於橈足類動物運動指標，表示游泳路徑起點和終點之間的直線距離與實際行走總距離的比率，用來描述移動路徑的扭曲程度。NGDR 介於 0 和 1 之間，當 NGDR 的值越小，表示其移動軌跡較彎曲；當 NGDR 的值越大，表示其移動軌跡較直，參考前人研究，本實驗以 3 秒時間間隔作為時間間隔進行分析。



$$NGDR = \frac{\text{淨位移(Net Displacement)}}{\text{總路徑(Gross Displacement)}}$$

圖 6. NGDR 計算說明

實驗 1-3 利用 YOLOv8 建置水蚤辨識模型

由於手動標記個別水蚤的移動路徑工作量繁瑣，我們嘗試結合 YOLOv8 (You Only Look One-level) 實現水蚤的移動軌跡追蹤，YOLOv8 是一個由 Ultralytics 開發的類神經網路演算法，適用於影像辨識偵測或分類等任務。由於水蚤並非官方 COCO dataset 所能辨識 80 種類別，因此本研究自行拍攝水蚤影像，建立一影像數據集，將影像上傳至 Roboflow 平台進行資料標註，確保每個水蚤都被準確標示，總共標示 119 張影像，約 2400 個標籤。

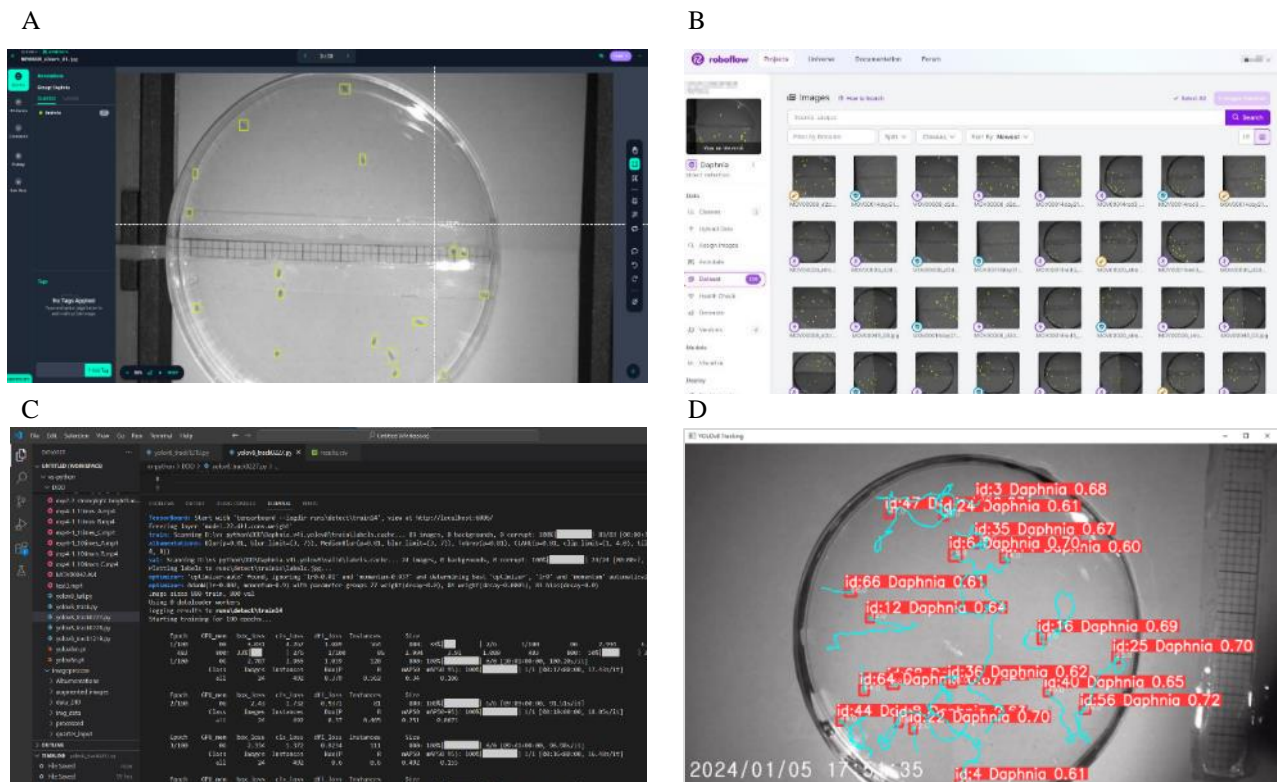


圖 7. 建立水蚤影像數據集並訓練 AI 視覺辨識模型。A.以 Roboflow 標註水蚤的邊界框。B.將所有影像依 7:2:1 比例，分為訓練集(training set)、驗證集(validation set)、測試集(testing set)。C.建置 YOLOv8 基本環境，設定參數及資料夾路徑，開始訓練自定義模型，imgsz=800，epochs=100，batch=16。D.測試模型訓練結果。

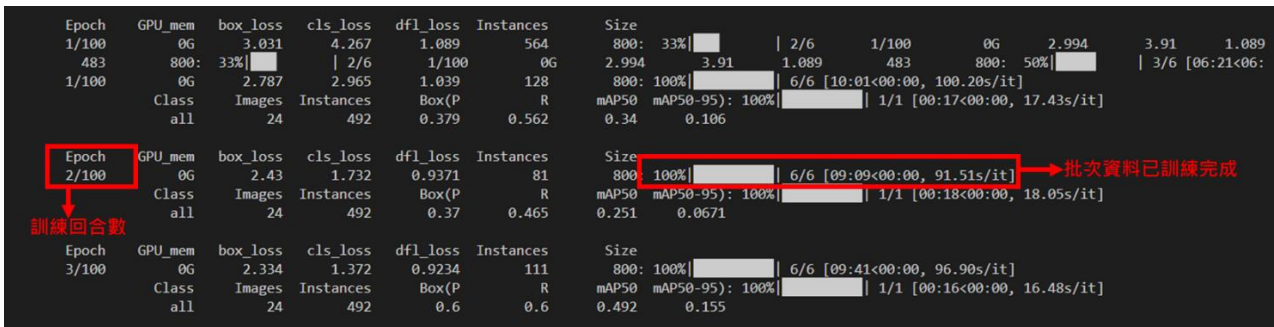


圖 8.訓練過程

研究二、 探討不同條件下水蚤的趨光行為的差異

(一) **觀察**：當手電筒靠近杯壁時，可觀察到部分水蚤會朝向光源移動，發生趨光反應，如圖 9A。然而又觀察到若水域兩側的亮度不同時，水蚤較多水蚤會集中於暗處，如圖 9B。究竟水蚤具有正趨光性或負趨光性呢？查詢資料後，有部分文獻表示水蚤為負趨光性，亦有部分文獻顯示為趨光性，對此我們感到更為疑惑。



圖 9A. 水蚤明顯受光源吸引



圖 9B. 水蚤偏好在暗處

(二) **提出疑問**：水蚤是偏向趨光性或是負趨光性？不同年齡的水蚤面對光線變化是否有不同的行為？水蚤的趨光行為會如何受外在刺激而影響？

(三) **提出假設**：水蚤的趨光行為比想像的更為複雜，可能受環境和光線變化而有所影響。不同年齡的水蚤的趨光行為應有所差異。光源亮度也會影響到水蚤的選擇，越強的光越能吸引水蚤。

(四) **求證假設與實驗方法**：

實驗 2-1 水蚤年齡對趨光反應的影響

1. 取 1 日齡水蚤、7 日齡水蚤、21 日齡水蚤各 20 隻
2. 在培養皿中加入 35ml 的過曝水
3. 在白燈 LED 光板上以全遮光片遮蓋一半區域，分為透光區及全遮光區
4. 進行水蚤的趨光偏好測試，每組進行 3 重複(n=60)

趨光偏好測試 (Light-Preference Assay)

此實驗全程於特製暗室行為房觀察，確保實驗在黑暗條件下進行，選擇體型一致的 20 隻個體(總共 20×3 重複=60)，將水蚤置於 1.0×12.8 cm 測試培養盤中，下方使用 LED 光板投射光線，如圖 10，事先將一半底板區域貼上全遮光貼膜，作為遮光區供水蚤選擇，並鋪上一白紙，使明暗區外觀一致。培養皿側壁也以黑色膠布包覆，確保光線只由下方進入，不會從側壁透入。

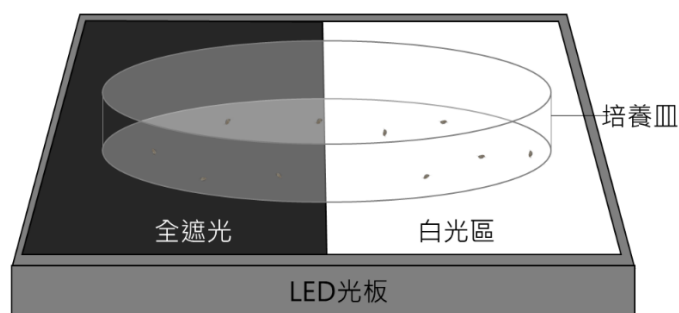
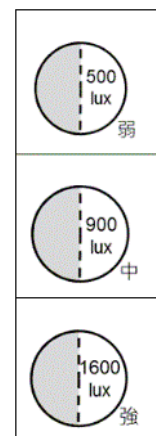


圖 10. 趨光偏好測試裝置圖。此裝置位於特置暗室中，以確保黑暗條件，示意圖為協助理解，實際測試時，會在測試盤的下方平鋪一張白紙作為背景，使兩區表面顏色一致，讓水蚤無法預先判斷遮光黑暗區的方位。

使用紅外線攝影機攝影記錄水蚤的水平運動，以消除重力此一複雜變數，進行 10 分鐘的試驗。前 5 分鐘黑暗期作為水蚤適應期，使其全區自由移動以適應環境黑暗，不予分析，遮光區或白光區亦無從分辨，其後開啟 LED 光板自裝置下方投射白光，進行 5 分鐘的趨光試驗。截取燈源開啟後第 1 分鐘影片，匯入電腦分析。評估項目為水蚤在每個明/暗區域花費的時間和速度。

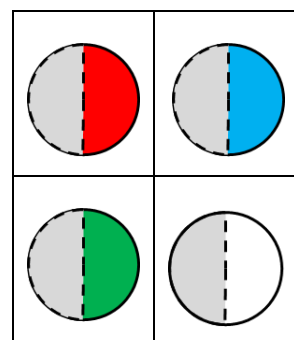
實驗 2-2 不同光照度對水蚤趨光反應的影響

1. 在培養皿中加入 35ml 除氯水，分為透光區及遮光區
2. 事先在 LED 光板上平放不同張數的影印白紙控制亮度
3. 篩取 20 隻體型接近水蚤(2.25±0.1mm)平均置於培養皿中
4. 測試水蚤在不同照度光下趨光偏好，每組進行 3 重複(n=60)



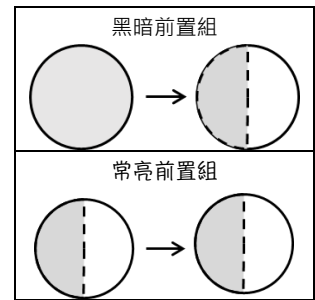
實驗 2-3 不同光波長對水蚤趨光反應的影響

1. 在培養皿中加入 35ml 除氯水，分為透光區及遮光區
2. 在 LED 光板放置濾光片
3. 篩取 20 隻體型接近水蚤(2.25±0.1mm)平均置於培養皿中
4. 測試水蚤在不同波長光下的趨光偏好，每組進行 3 重複 (n=60)



實驗 2-4 光照前置對水蚤趨光反應的影響

1. 在培養皿中加入 35ml 除氯水，分為透光區及遮光區，遮光區以遮光貼紙覆蓋
2. 篩取 20 隻體型接近水蚤($2.25\pm 0.1\text{mm}$)平均置於培養皿中
3. 以紅外線攝影機自頂端錄影觀察 10 分鐘
4. 黑暗前置組：水蚤在全黑暗適應 5 分鐘後再開始趨光測試
常亮前置組：水蚤預先在半亮狀態 5 分鐘後進行趨光測試
5. 每組進行 3 重複($n=60$)



研究三、 驗證水蚤趨光行為是否為遺傳基因控制

(一) **觀察**：我們發現並非所有個體都表現出明顯的趨光行為，這引發了幾個有趣的問題：光的趨性是否受遺傳因素所控制？如果在幼蚤出生時給予不同的光線刺激，那麼在不同環境下生長的水蚤是否後天產生變化呢？若一出生就接受光刺激的幼蚤是否會有趨光行為？水蚤通常透過夏卵進行無性生殖，子代的遺傳物質與親代幾乎相同，這對研究是否受遺傳所控制具有重要意義，可確保子代獲得與親代的基因型，子代間的差異也較小。

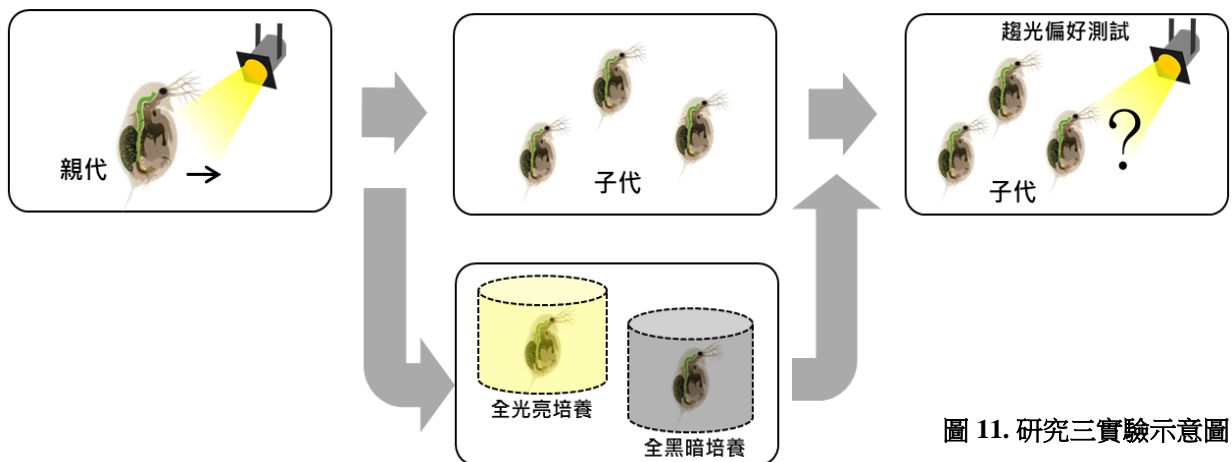


圖 11. 研究三實驗示意圖

- (二) **提出疑問**：水蚤的趨光行為是否會遺傳至子代？在不同環境下生長的水蚤是否有差異？
- (三) **提出假設**：水蚤的趨光或負趨光行為會遺傳至子代。一出生時給予不同光線刺激可以改變水蚤的習性。
- (四) **求證假設與實驗方法**：

實驗 3-1 收集有趨光行為的水蚤，其子代具有趨光行為的比例及運動分析

實驗 3-2 收集無趨光行為的水蚤，其子代具有趨光行為的比例及運動分析

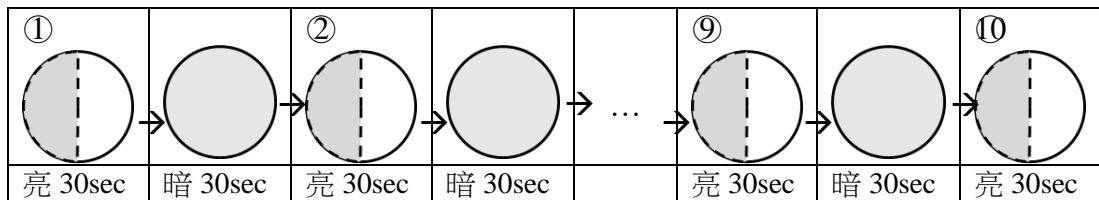
1. 取體型接近的水蚤置於培養箱中，打燈後篩選具有明顯趨光性及不趨光的個體
2. 分成兩組培養其子代，帶幼蚤出生後，將幼蚤濾出
3. 再分別將幼蚤置於日夜週期、全日週期、全暗週期三種環境進行培養 2 週
4. 待子代成長至 7 天取出，進行趨光偏好測試

研究四、 探討趨光行為是否能因後天逆轉？

- (一) **觀察**：若不是在幼蚤時期營造長期的環境條件刺激，而是在水蚤成體時具有明顯偏好的習性之後，這樣的習性有機會改變嗎？
- (二) **提出疑問**：成蚤的趨光行為是否具行為可塑性，是否能在短期的變化發生適應性改變？
- (三) **提出假設**：如果給予重複刺激，牠們的趨光行為可能會疲勞和原本不同。
- (四) **求證假設與實驗方法**：

實驗 4-1 趨光行為是否會疲勞？

1. 取 20 隻體型接近的水蚤平均置於培養皿中，使水蚤自由移動 5 分鐘以適應環境
2. 開始自頂端錄影，暗半分鐘，亮半分鐘，重複 10 次，總計 10 分鐘
3. 接著維持 5 分鐘的黑暗，持續觀察水蚤的行為，每組進行 3 重複(N=60)



實驗 4-2 在掠食者利他素環境下水蚤的趨光偏好

1. 將 1 隻孔雀魚置於 1L 水箱中放置 24 小時，產生富含魚利他素的水，將魚撈出
2. 以魚飼養水(利他素水)作為實驗組，過曝自來水作為對照組
3. 篩取 20 隻體型接近水蚤($2.25 \pm 0.1 \text{mm}$) 進行趨光偏好測試，每組 3 重複(n=60)

實驗 4-3 模擬掠食者進入環境下水蚤的趨光偏好

1. 製作孔雀魚 2D 模型及 3D 列印魚形異物
2. 以環境中有模擬魚及魚形異物作為實驗組，無為對照組
3. 篩取 20 隻水蚤進行趨光偏好測試，每組 3 重複(n=60)



圖 12. 培養皿中放入孔雀魚模型

研究五、 探討趨光行為對於水蚤躲避掠食者是否有幫助？

- (一) **觀察**：在實驗 4-2 中水蚤在利他素的影響下移動速度變慢，並且由趨光明顯轉變為負趨光，這讓我們十分好奇，如果是真實的掠食者-孔雀魚，水蚤會有何影響呢？
- (二) **提出疑問**：水蚤的趨光行為是否有助於水蚤逃脫掠食者？
- (三) **提出假設**：趨光的水蚤被捕食機率較小，且較難被捕捉。
- (四) **求證假設與實驗方法**：

實驗 5-1 掠食者對趨光及不趨光水蚤的捕食比較

1. 將雄性孔雀魚使用水蚤作為飼料馴養一週
2. 將 10 隻趨光/不趨光水蚤的放入直徑 10.5 公分燒杯容量 400ml
3. 引入一隻雄性孔雀魚，一放入容器中開始計時 10 分鐘，計算水蚤被捕獲隻數



圖 13. 孔雀魚捕食測試

研究六、 生物資訊分析水蚤基因體中的感光蛋白序列

(一) **提出假設**：rhodopsin 感光蛋白與趨光性 (phototaxis) 之間有密切的關聯，rhodopsin 在吸收光子後並觸發視覺信號傳遞，最終導致行為反應，如向光移動或避光移動。每種果蠅視紫質 rhodopsin 的吸收最大值是不同的，目前 *Daphnia pulex* 水蚤感光蛋白相關研究甚少，可以透過比對了解水蚤的感光蛋白所在位置。

(二) **求證假設與實驗方法**：

實驗 6-1：不同物種 rhodopsin 蛋白序列的相似性分析

實驗 6-2：果蠅 rhodopsin1~7 與水蚤基因體的比對分析

說明：果蠅 rhodopsin 蛋白的功能和結構研究得相對深入，通過與水蚤基因體的比對，可以幫助揭示水蚤 rhodopsin 蛋白的潛在功能。



陸、 研究結果

研究一、 不同水蚤生活史階段的運動行為有不同嗎？

實驗 1-1 水蚤的體型和年齡有沒有相關？多久後不再變大？

體長變化：

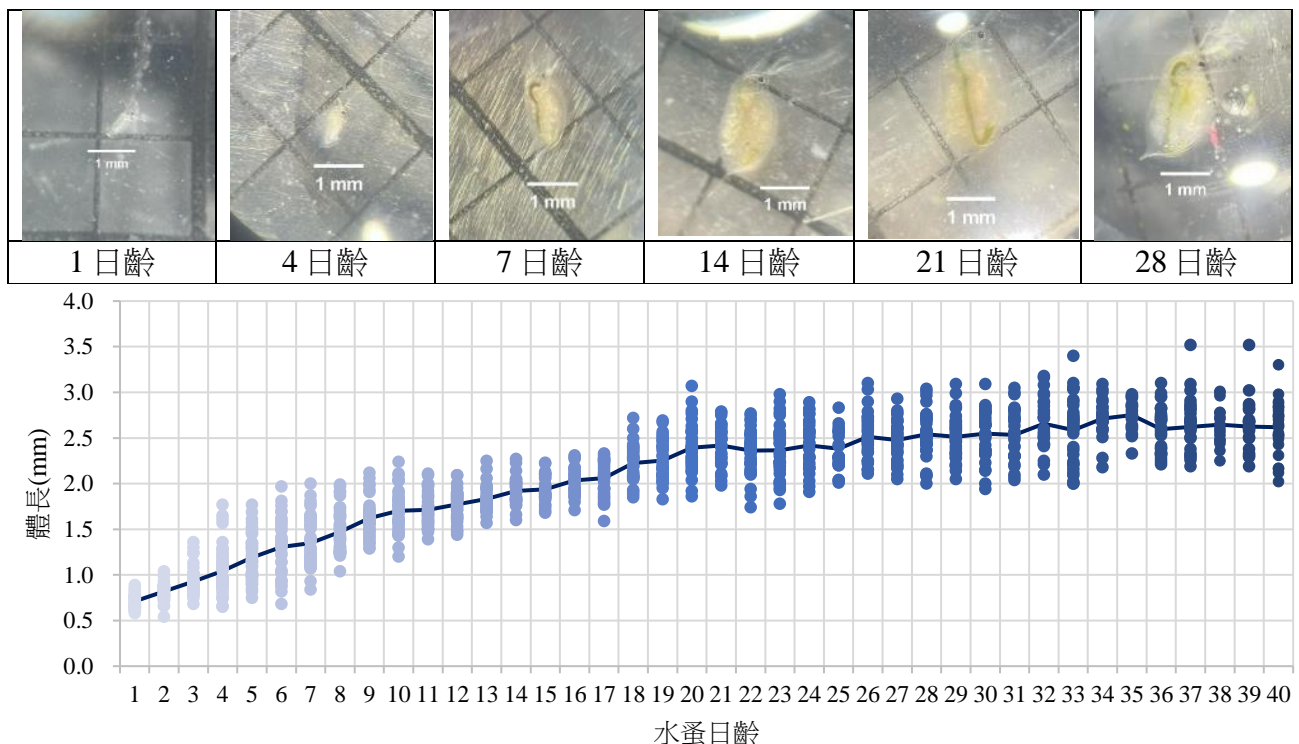
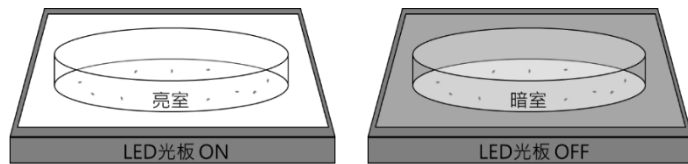


圖 14.水蚤 *D.pulex* 體長與成長日齡關係圖。

由圖 14 可知，在前三週，水蚤的體型與年齡呈現正相關，隨著年齡增長，水蚤的體長也逐漸增加，第三週後水蚤體長不再明顯成長。第一週體長增加幅度最大，第 1 日的水蚤體長僅有 0.71mm，到了第 7 日已達 1.35mm，成長 0.6mm，第一週體長增長幅度高達 90%。第二週成長幅度逐漸減緩，但體長仍然持續增加，第 14 日的體長為 1.92mm，第 21 日的體長為 2.42mm，第三週體長增長的幅度為 26%。在三週後水蚤的體長基本保持在約 2.5mm 的水平。(各組 n=26~39)



實驗 1-2 不同日齡水蚤運動行為的差異

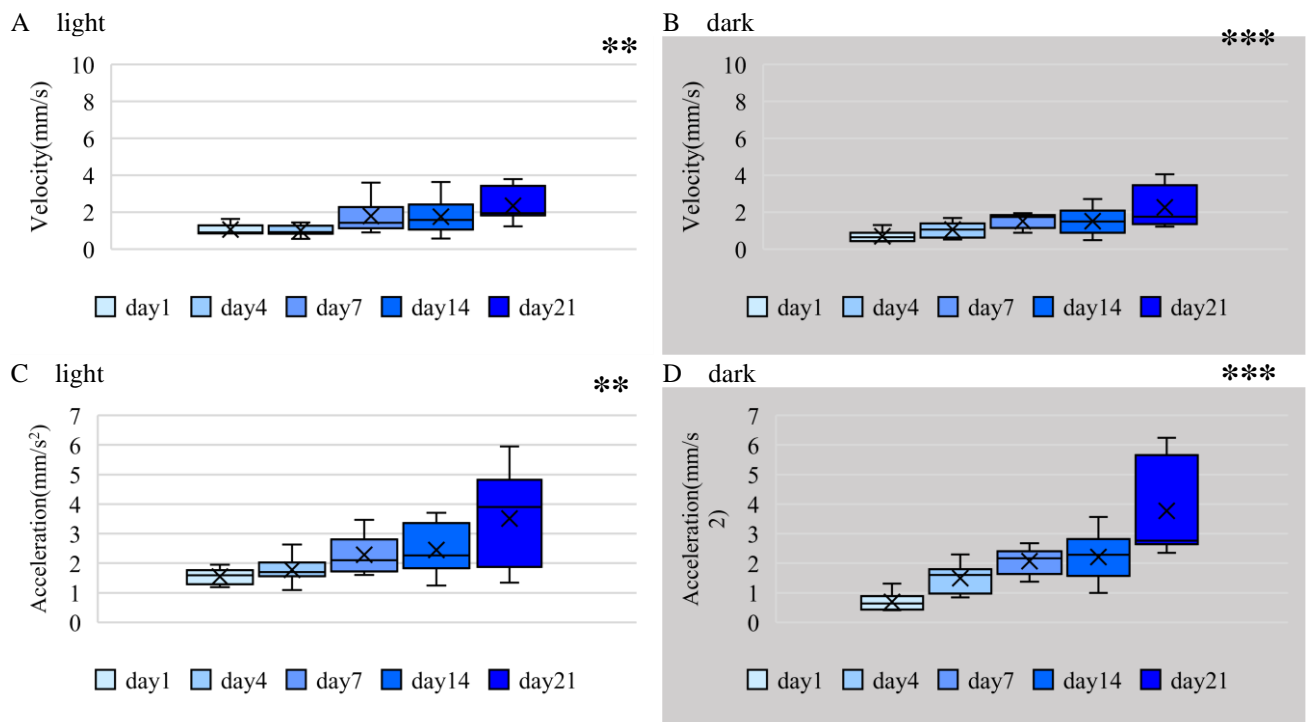


圖 15 不同日齡個體在全亮及全暗條件下運動速度分析。A.全亮環境平均速度。B.全暗環境平均速度。C.全亮環境平均加速度。D.全暗環境平均加速度。(n=45, Welch's ANOVA, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)

速度 Velocity (mm/s)、加速度 Acceleration(mm/s²):

由圖 15A、B 可知，在亮、暗的環境下不同年齡組的移動速度也不同，當水蚤年齡越大，移動速度越快，在黑暗環境下各組差異比明亮更明顯。1、4 日齡水蚤在明亮條件時移動速度接近，約為 1.05mm/s，7 日齡為 1.79mm/s，21 日齡達 2.35mm/s。年齡越小時，資料離散程度也較小，顯示水蚤幼期個體間運動速度較為接近，隨著成長後個體速度差異增大。

參考圖 15C、D，水蚤在亮、暗的環境下加速度與速度的趨勢接近，年齡越大的水蚤其加速度也越大，運動時能更快的加速或減速。在光亮條件下，1 日齡水蚤平均加速度為 1.61 mm/s²，7 日齡 2.28mm/s²，21 日齡 3.51mm/s²。

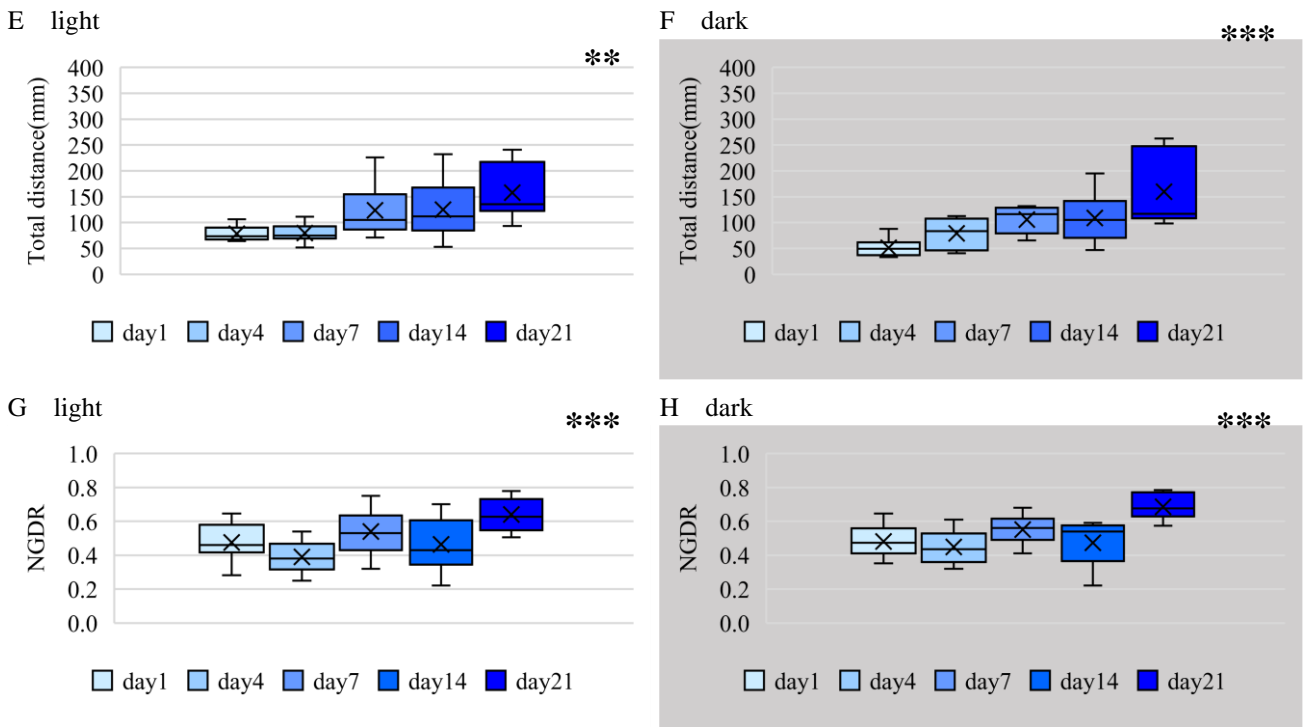


圖 15 不同日齡個體在全亮及全暗條件下移動距離分析結果。E.全亮環境平均移動總距離。F.全暗環境平均速度移動總距離。G.全亮環境平均 NGDR。H.全暗環境平均 NGDR。(n=45, Welch's ANOVA, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)

運動總距離 Total distance(mm)、NGDR：

由圖 15E、F 可知，不同日齡的水蚤運動總距離也跟速度加速度類似，隨著年齡增加，運動總距離有增加的趨勢。在光亮條件下，1 日齡平均總距離 78mm，7 日齡 124mm，21 日齡 157mm，可以發現年齡相近者差異較小，如 1 日齡與 4 日齡，7 日齡與 14 日齡數值接近。年齡間隔較大時，差距較明顯。

NGDR 的表現上，在亮的環境時，可觀察到 21 日齡的 NGDR 較高，顯示其移動較為筆直，其餘四組年齡較小的水蚤差異不大，NGDR 值偏小，移動較為曲折，第 1~14 日齡運動軌跡曲折程度較為彎曲，在暗的環境下也呈現類似狀況。

實驗 1-3 利用 YOLOv8 建置水蚤辨識模型

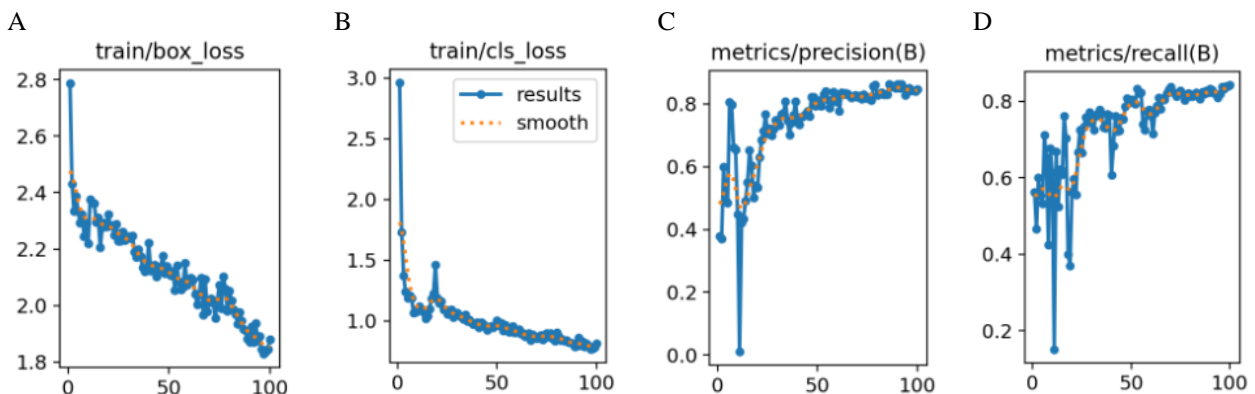


圖 16. YOLOv8 模型訓練結果。A. 定位損失(box_loss)，指預測框與標定框之間的誤差。B. 置信度損失(obj_loss)，計算框中有目標概率的置信度，越小判定為定位目標的能力越準。C. 精確率(Precision)，表示在所有預測為真的樣本中真實正確百分比。D. 召回率(Recall)，表示所有事實為真樣本中預測正確的百分比。

模型訓練結果：

以上四圖結果為模型隨著訓練期數，各項模型評估數值的變化，由圖 A 定位損失 box_loss，圖 B 置信度損失 obj_loss，兩項損失隨著訓練期數增加分別下降至 1.8、0.7 左右。精確率及召回率也穩步上升，在訓練 100 個期數後逐漸收斂達到 0.85、0.84 左右，顯示模型訓練成效優良。利用測試集(testing set)進行試驗，模型辨識正確率有 94.33%。

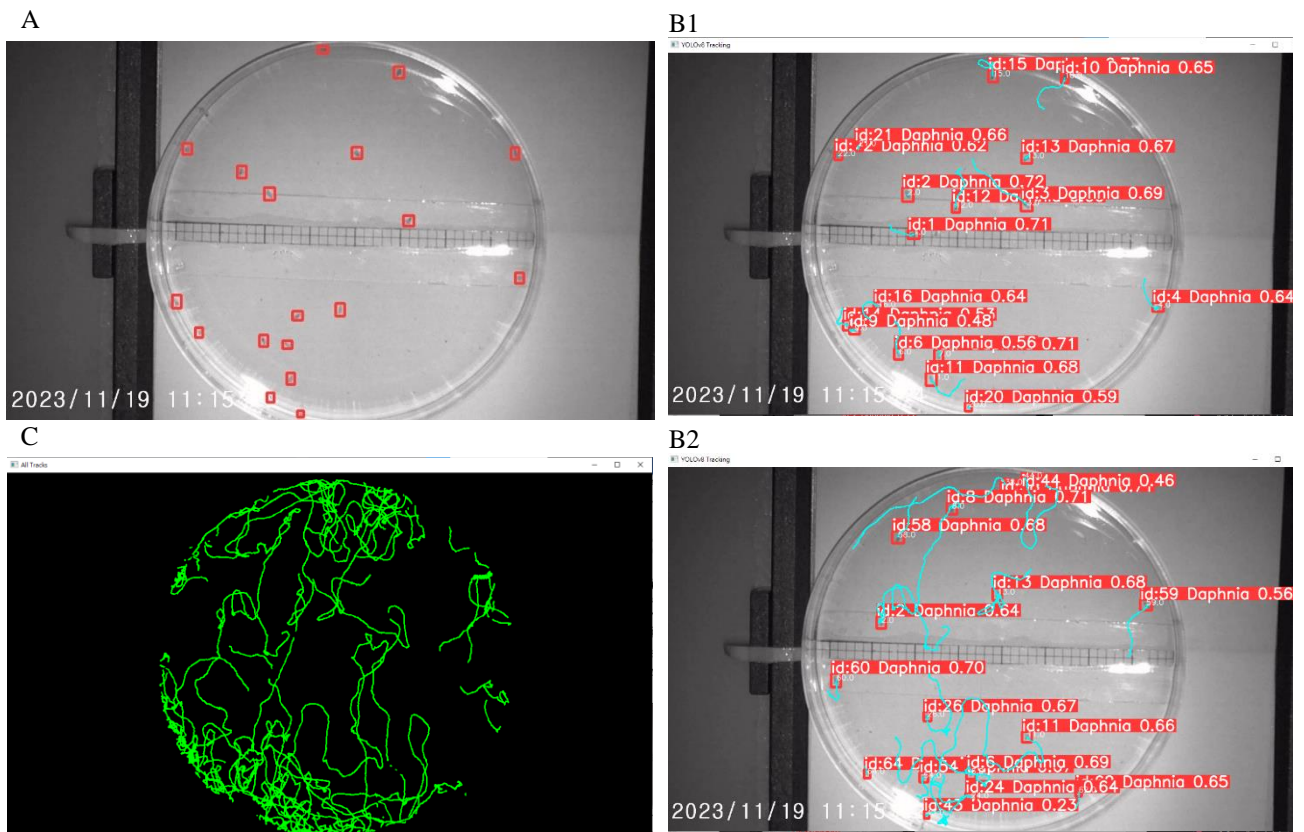


圖 17.目標檢測及多目標追蹤任務。A.單一影像目標檢測，成功辨識出畫面中所有水蚤。B.採用 ByteTrack 演算法進行影片多目標追蹤，記錄每幀目標座標，隨著影格持續追蹤各個目標，如 B2 繪製軌跡連線。C.將所有個體的移動軌跡疊加成圖。

從圖片檢測到多目標追蹤(MOT)：

本實驗並不只是希望進行圖片目標檢測，而是希望進行更有挑戰性的多目標追蹤 (Multiple Object Tracking, MOT) 如圖 17B，多目標追蹤指在影片或者連續幀圖像序列中，同時追蹤多個目標物體並識別它們的運動軌跡的任務。然而，多目標追蹤比單純的目標檢測困難得多，因為會面臨到不同幀之間確定目標的持續性和一致性。經過比較，我們最終選擇表現最穩定的 ByteTrack 演算法。與廣泛使用的 tracker 軟體相比，YOLOv8 的 ByteTrack 多目標追蹤演算法能克服 tracker 一次僅追蹤單一目標的限制，並具有物件識別追蹤一體化的優勢，這更符合生物研究的實際需求，對於生物研究中運動學分析，此乃一項實用且高效的新興技術。

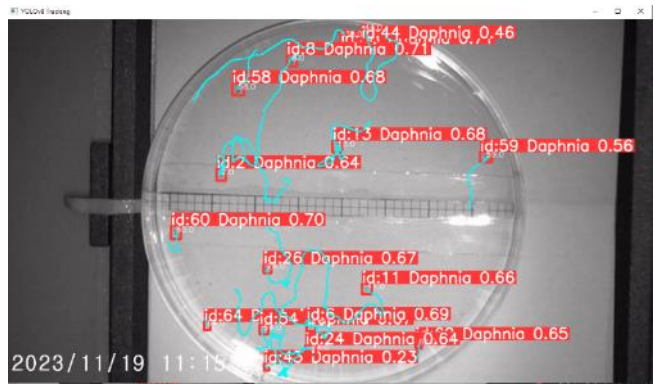
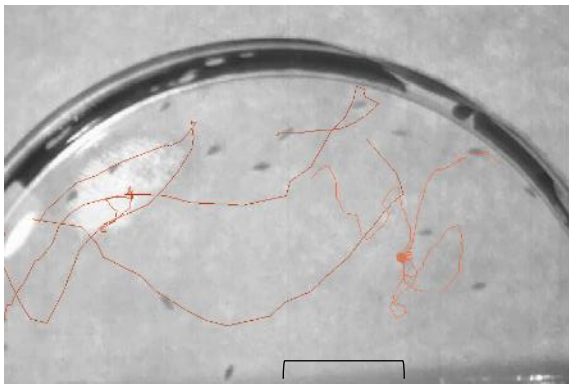


圖 18.傳統追蹤方法與 YOLOv8 多目標追蹤技術比較。A.tracker 需要單一目標一個一個影格手動標註，標註完一目標後才能繼續標註下一目標，較為費時。B.YOLOv8 的 ByteTrack 則可實現多目標同時追蹤。

我們利用自行訓練的水蚤追蹤模型，繪製出水蚤在明亮環境下的運動軌跡，並進一步分析其在兩種環境下的聚散模式，平均鄰距離（Average Neighbor Distance, AND）是一用於評估點分佈均勻性的指標。圖 19 可知水蚤明亮環境個體之間平均鄰距離為 28.35mm，小於黑暗環境 38.95mm，顯示水蚤在明亮分布較黑暗集中，兩者間具有顯著差異(p=0.0017)，從軌跡圖上也支持這樣的結果。

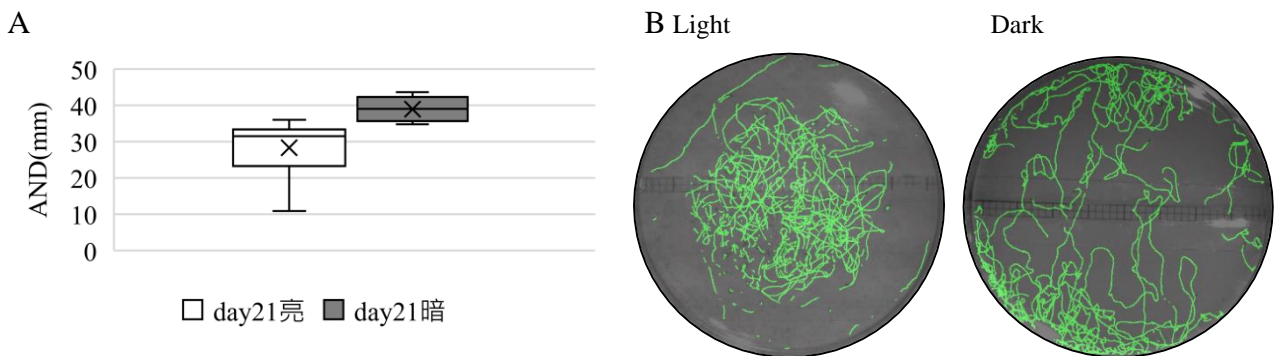


圖 19.第 21 日齡水蚤在亮暗環境下聚散模式。A.平均鄰距離 average neighbor distance(AND)，(n=60, T test, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)。B.水蚤運動軌跡圖。

研究二、 探討不同條件下水蚤的趨光行為的差異

實驗 2-1 水蚤年齡對趨光反應的影響

趨光偏好分析：

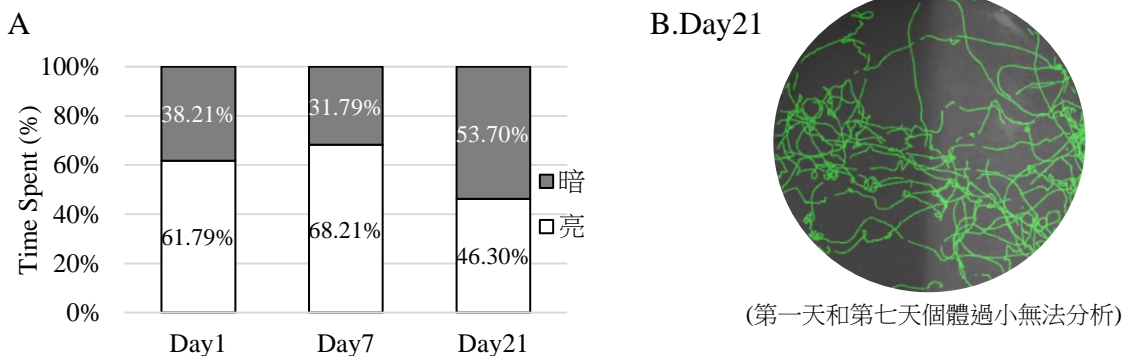


圖 20.不同日齡水蚤趨光偏好測試結果。A.不同齡期水蚤在亮暗區停留時間比例(n=60)。B.運動軌跡圖

由圖 20 可以發現，除了年紀較大的 21 日齡外，1 日齡及 7 日齡的水蚤皆偏好選擇亮區，21 日齡反而沒有明顯的趨光表現，推測年齡層較小的水蚤對光的敏感度較高。

運動分析：

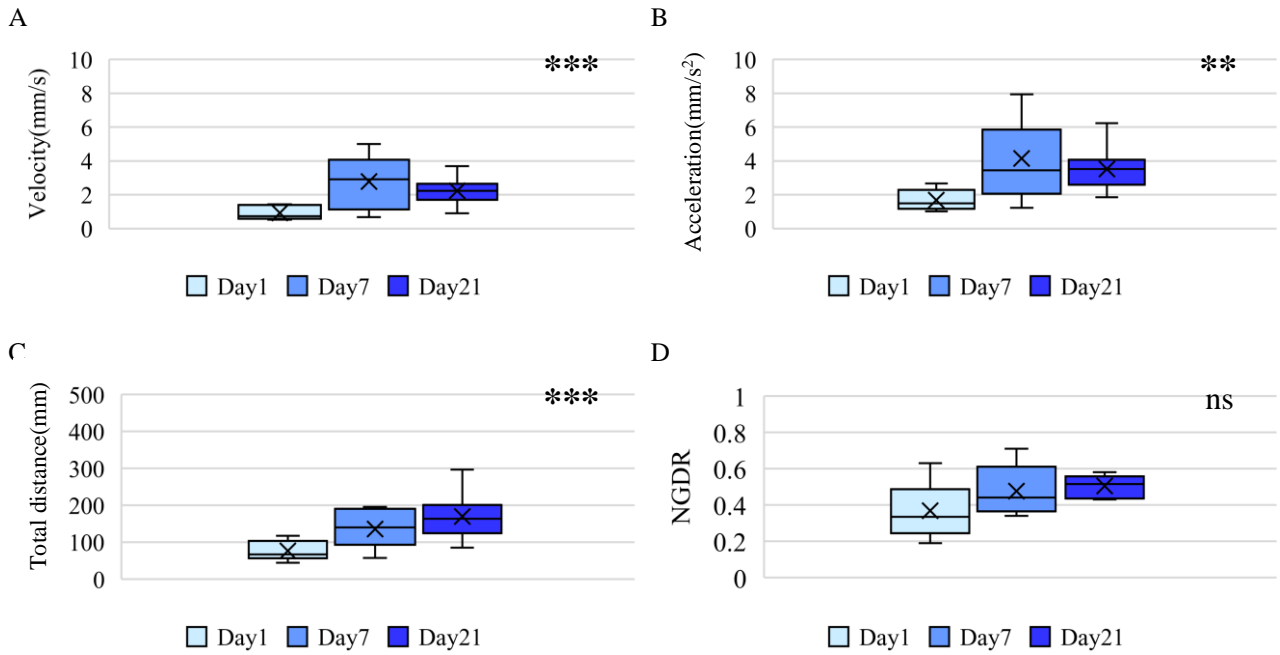


圖 21.不同日齡個體趨光運動分析結果。 A.開燈刺激後水蚤移動速度測試結果。B.移動平均加速度。C.一分鐘內移動總距離。D.NGDR。(n=27, Welch's ANOVA, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)

平均速度 Velocity(mm/s)、平均加速度 Acceleration(mm/s²)：

由上圖可以看到，在運動速度及加速度表現上，趨光刺激後 7 日齡與 21 日齡接近，速度為 2.78mm/s，加速度為 4.14mm/s²。受限於體型差異，在趨光刺激後，1 日齡移動速度及加速度明顯較小於他組，表示年齡與體型會影響趨光運動速度。

運動總距離 Total distance(mm)、NGDR：

上圖為趨光下的平均總位移和 NGDR 數據分布。可以看到 21 日齡的平均總位移都較其餘兩者高，總位移為 170mm，；7 日齡的平均總位移為 136mm；1 日齡為最低，平均總位移約為 76.9mm。在 NGDR 值部分，不同日齡運動曲折程度沒有明顯差異。

實驗 2-2 不同光強度對水蚤趨光反應的影響

趨光偏好分析：

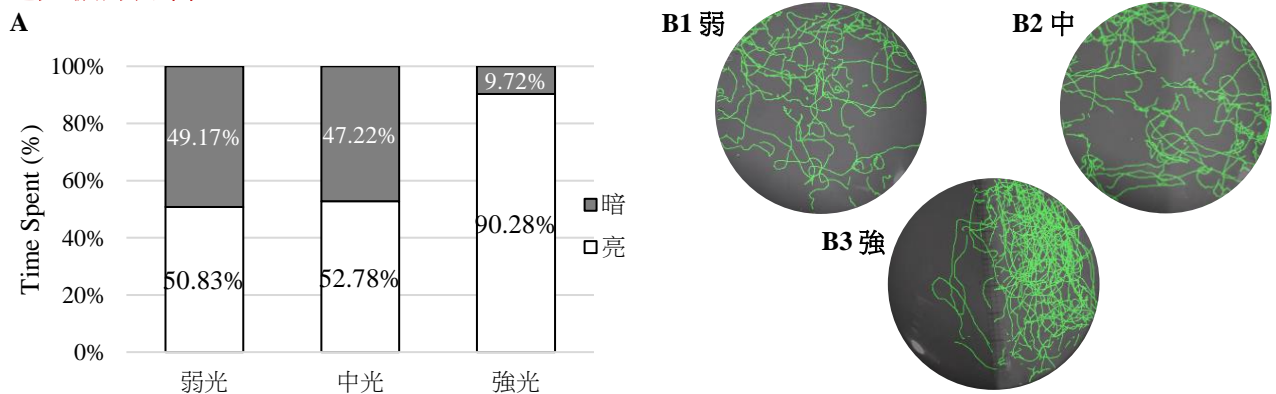


圖 22.不同光強度水蚤趨光偏好測試結果。 A.水蚤在亮暗區停留時間比例(每組 n=60)。B.水蚤移動軌跡圖。

由圖 22 結果顯示，在強光組(1600 Lux)中水蚤停留在亮區比例為 90.28%，明顯高於亮度較小的兩組，水蚤在弱光組(500 Lux)、中光組(900 Lux)並沒有明顯的趨光偏好，顯示當光亮度增強至一定強度時，能激發水蚤的趨光偏好表現。

運動分析：

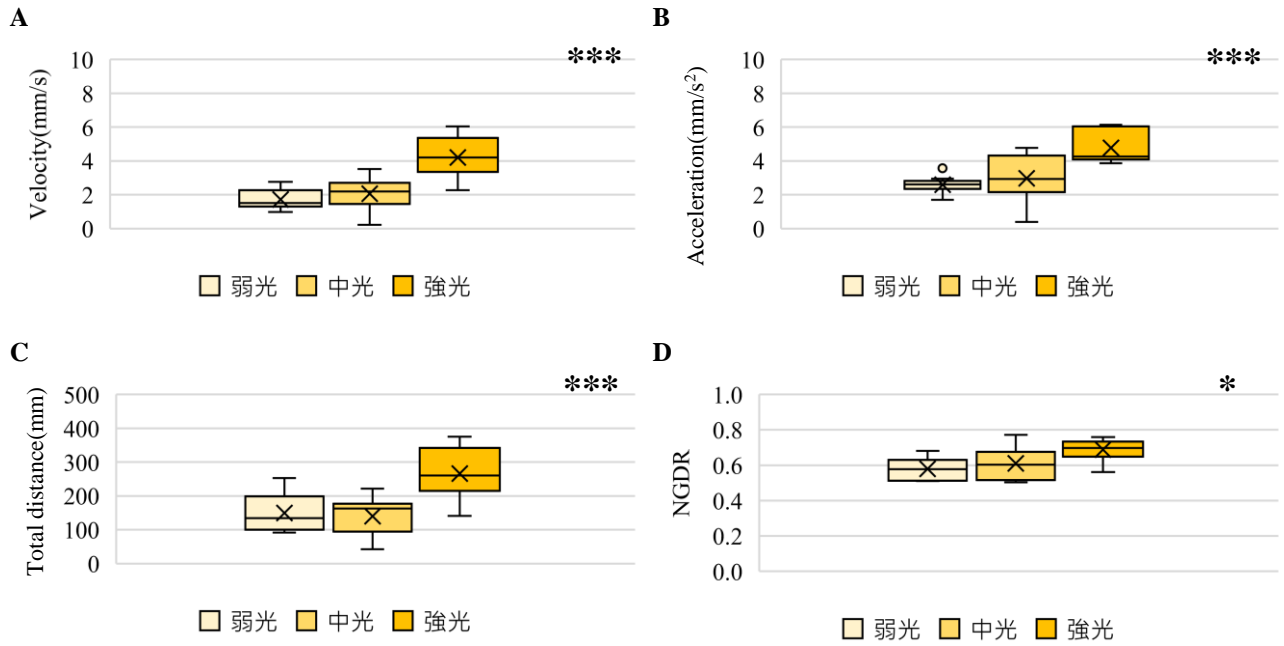


圖 23.水蚤在不同光強度下趨光運動分析結果。A.移動速度測試結果。B.移動平均加速度。C.一分鐘內移動總距離。D.NGDR。(n=27, Welch's ANOVA, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)

平均速度 Velocity(mm/s)、平均加速度 Acceleration(mm/s²)：

由圖 23 可得知，在強光環境下，水蚤的平均移動速度 4.2 mm/s 和加速度 4.77 mm/s² 都較高於中光和弱光環境下的移動速率，顯示受到強光刺激，水蚤的運動速度也隨之加快，速度變化量較大。可注意到在弱光的數據分布較集中，個體間差異較小。

運動總距離 Total distance(mm)、NGDR：

強光組的總位移比另兩組高出約 121.6 mm 左右，可從此關係得知光強度對水蚤的移動狀況有影響，當光強度較強時，水蚤的移動距離會較高，強光 NGDR 也較高，軌跡較直。

實驗 2-3 不同光波長對水蚤趨光反應的影響

趨光偏好分析：

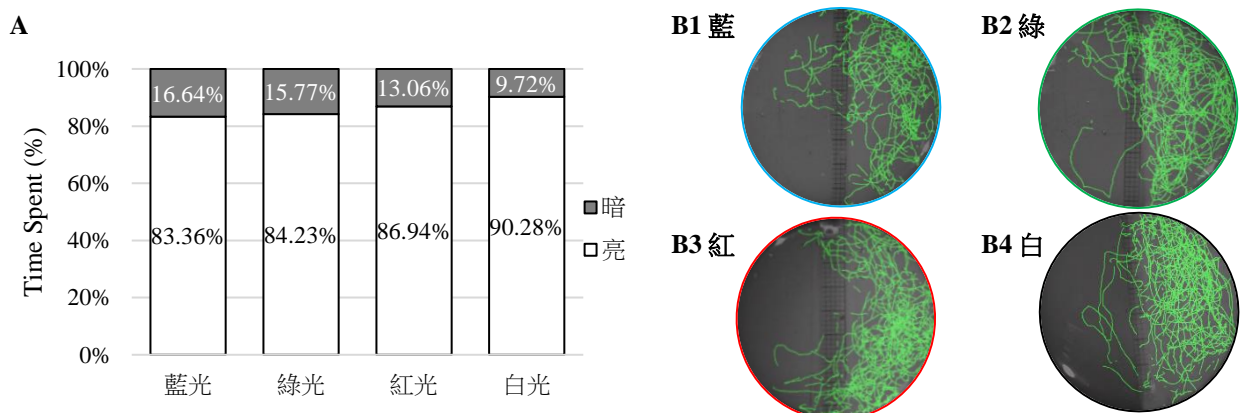


圖 24.不同光波長水蚤趨光偏好測試結果。A.水蚤在亮暗區停留時間比例(n=60)。B.水蚤移動軌跡圖。

由圖 24 可知，水蚤對各種色光均有所偏好，在高照度 1000lux 條件下，水蚤在藍、綠、紅不同色光中停留比例差異不大，在亮部的停留比例依次為 83.36%、84.23%、86.94%。

運動分析：

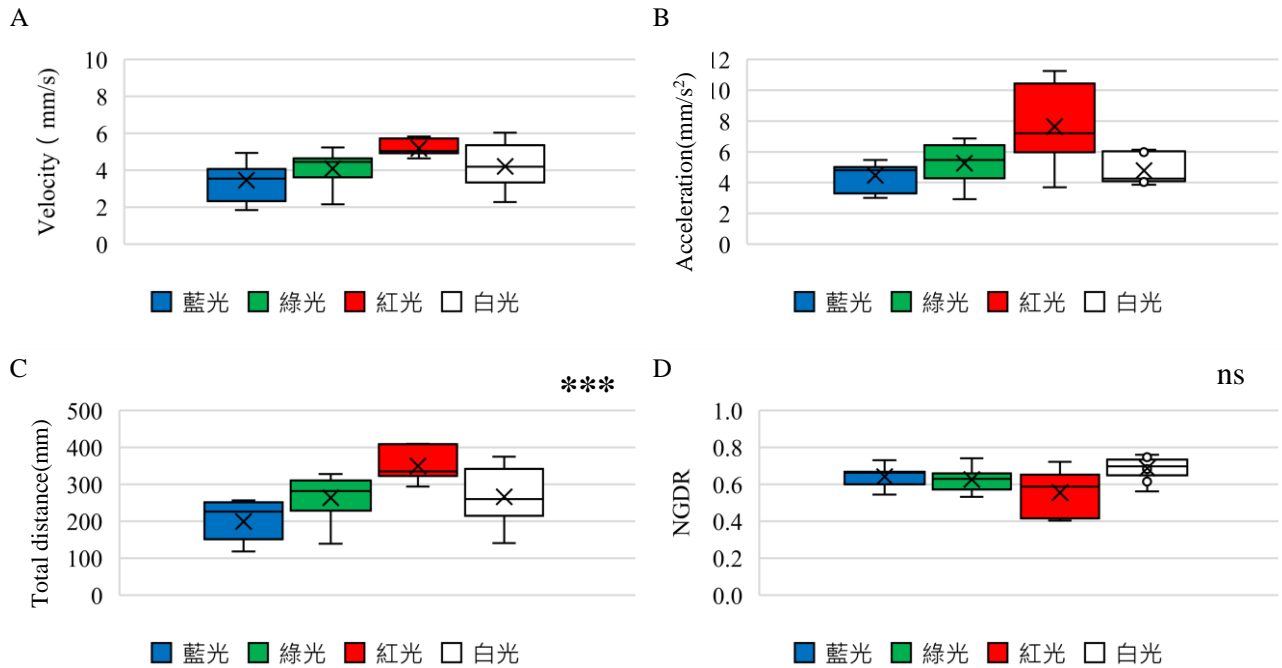


圖 25. 水蚤在不同光波長下趨光運動分析結果。A.移動速度測試結果。B.移動平均加速度。C.一分鐘內移動總距離。D.NGDR。(n=36, Welch's ANOVA, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)

平均速度 Velocity(mm/s)、平均加速度 Acceleration(mm/s²)：

由圖 25 可知，水蚤在不同色光中的移動速度與加速度有所差異，波長越短，移動速度越小，加速度亦如此。以波長最短的藍光環境下移動速度最慢僅 3.46mm/s，小於綠光 4.03mm/s，波長最長的紅光下水蚤速度達 5.18 mm/s，白光則居中。

運動總距離 Total distance(mm)、NGDR：

在紅光中的水蚤在 1 分鐘內的平均移動總距離最長，達 305.12mm，其次是綠光為 263.57mm，藍光為 210.21mm。經統計分析後，不同色光下的 NGDR 值沒有明顯差異。值得注意的是，儘管各組光線停留時間接近，趨光偏好程度相似，但不同光線下水蚤的運動表現卻有明顯差異，顯示運動分析能補足了解水蚤行為。

延伸探究：

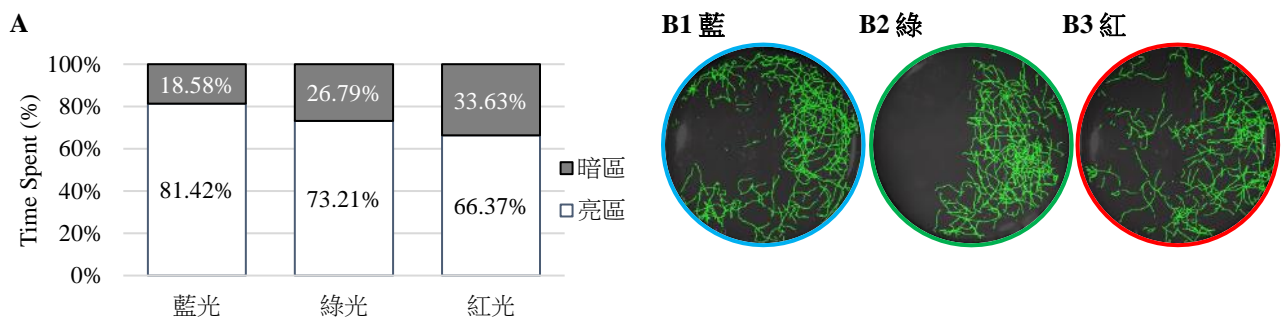


圖 25-2. 在低照度下水蚤各色光趨光偏好測試結果。A.水蚤在亮暗區停留時間比例(n=60)。B.水蚤移動軌跡圖在降低照度至 100 lux 後，水蚤對不同顏色光源的趨光性有所差異。特別是對藍光的比例仍保持在較高水平 81.42%，而對綠光和紅光的趨光性分別下降至 73.21%和 66.37%。這顯示出在較低照度條件下，水蚤對藍光的敏感度最高，其次是綠光，對紅光的敏感度最低。

實驗 2-4 光照前置對水蚤趨光反應的影響

趨光偏好分析：

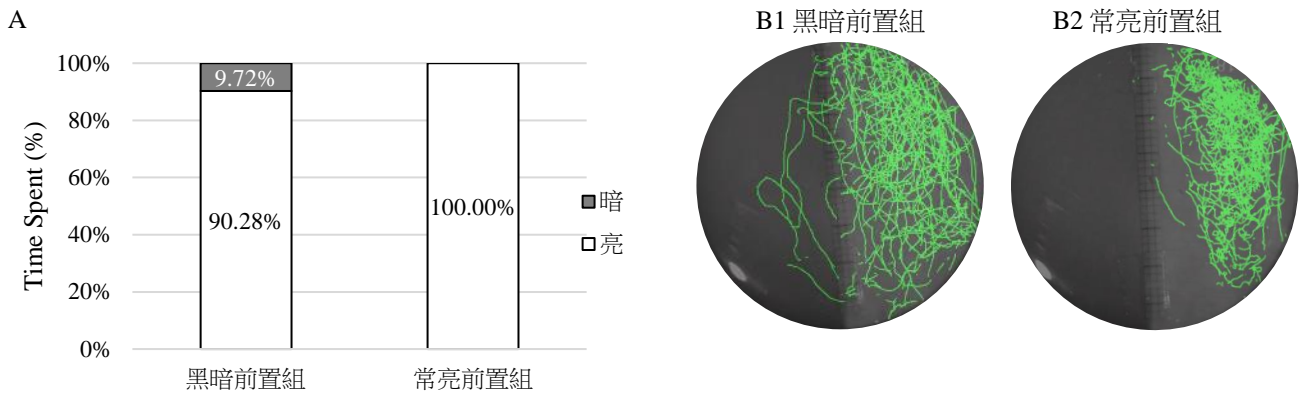


圖 26.不同光照前置下水蚤趨光偏好測試結果。A.水蚤在亮暗區停留時間比例(n=60)。B.水蚤移動軌跡圖。

由上圖可發現，不同光照前置處理後的水蚤的亮暗分布有些微差異，在黑暗前置組中，由於水蚤先經歷了五分鐘的黑暗，在第一分鐘出現光亮時，還有部分水蚤留在暗區，還未適應光源。但在常亮前置組中，水蚤已經充分的適應了光源，沒有在暗區的水蚤出現。

運動分析：

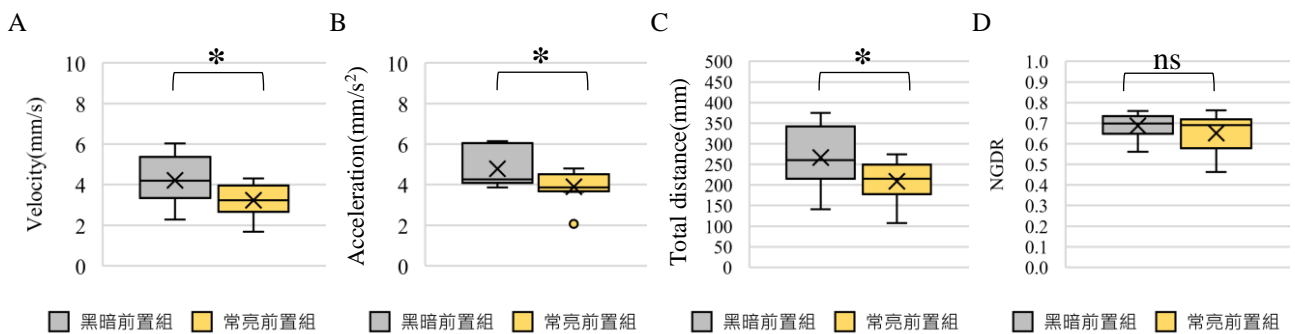


圖 27. 水蚤在不同光照前置下趨光運動分析結果。A.移動速度測試結果。B.移動平均加速度。C.一分鐘內移動總距離。D.NGDR。(n=18, T test, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)

平均速度 Velocity(mm/s)、平均加速度 Acceleration(mm/s²)：

從圖 27 可得知，在黑暗前置組中的水蚤的移動速度較常亮前置組高，兩者相差 1mm/s，可從之推論水蚤適應黑暗後在無預警情況下突然光亮刺激會使其進入亢奮狀態，速度及加速度皆提高，已經預先適應光亮的水蚤移動速度及加速度值皆較小。

運動總距離 Total distance(mm)、NGDR：

黑暗前置組在趨光後一分鐘內的運動總距離平均為 266mm，常亮前置組僅 209mm，黑暗前置組的運動總距離高於常亮前置組，這種差異可能是由於暴露於黑暗環境後的水蚤再接觸光線時，感到更強烈的對比刺激，水蚤表現出更積極的趨光行為。

研究三、 驗證水蚤趨光行為是否為遺傳基因控制

實驗 3-1 收集有趨光行為的水蚤，其子代具有趨光行為的比例及運動分析

趨光偏好分析：

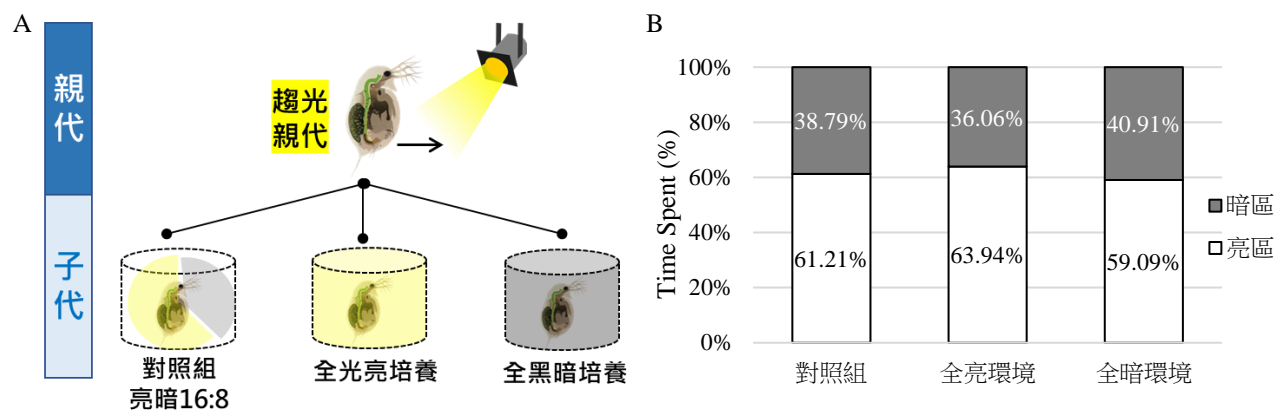


圖 28. 趨光水蚤的子代趨光偏好測試結果。A. 實驗組示意圖，三種環境培養。B. 亮暗區停留時間比例(n=30) 整體趨光性偏好趨於一致，均表現出對亮區的偏好，親代水蚤在不同光照環境下所生的幼蚤仍然保有一定程度的趨光性，顯示出趨光性可能具有一定的遺傳性或先天性。

運動分析：

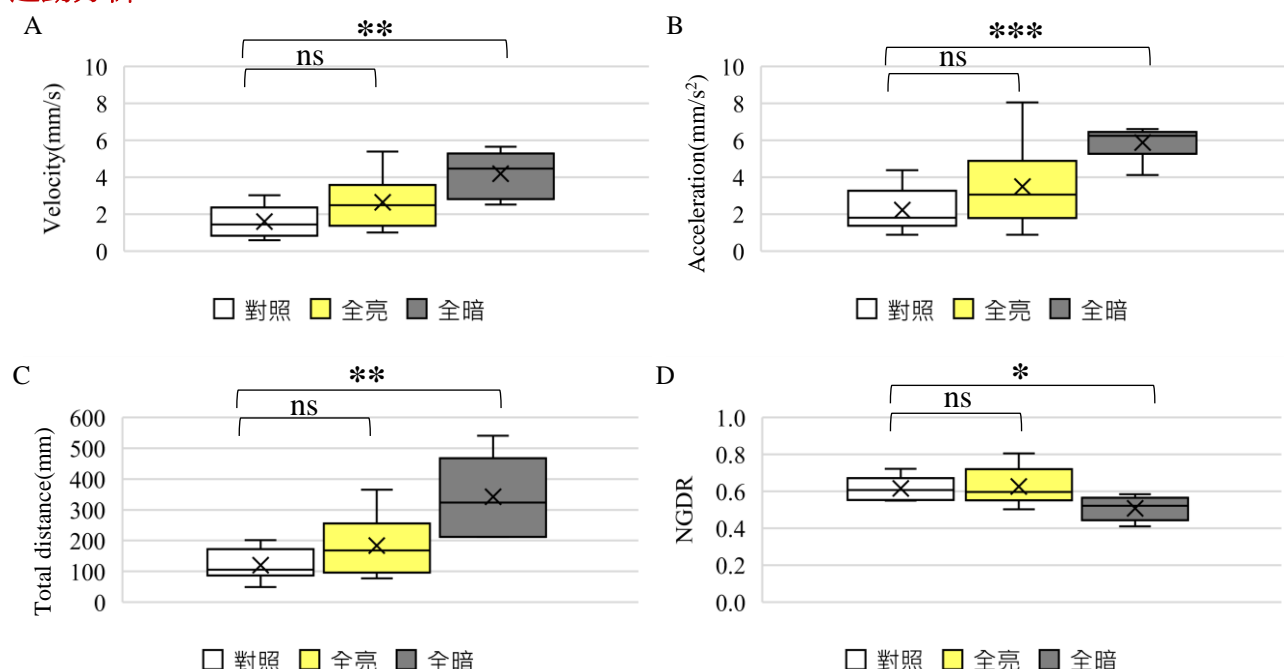


圖 29. 趨光水蚤子代的運動分析結果。A. 移動速度測試結果。B. 移動平均加速度。C. 一分鐘內移動總距離。D. NGDR。(n=18, T test, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)

平均速度 Velocity(mm/s)、平均加速度 Acceleration(mm/s²)：

由圖 29 可知，全暗組的速度和加速度明顯高於對照組，對照組及全亮組則無顯著差異。此現象可能是因水蚤本身具有趨光行為，而在出生後黑暗組幾乎未曾接觸光線，導致其對光線的反應更為敏感，因此有較高的運動速度及加速度。

運動總距離 Total distance(mm)、NGDR：

趨光水蚤子代對照組和全亮組之間移動總距離、NGDR 並無顯著差異，全暗組與對照組相比，移動總距離較長，NGDR 值比較小，軌跡較曲折，趨光水蚤的全暗組子代在光線刺激下表現出更活躍且較不直線的運動模式。

實驗 3-2 收集無趨光行為的水蚤，其子代具有趨光行為的比例及運動分析

趨光偏好分析：

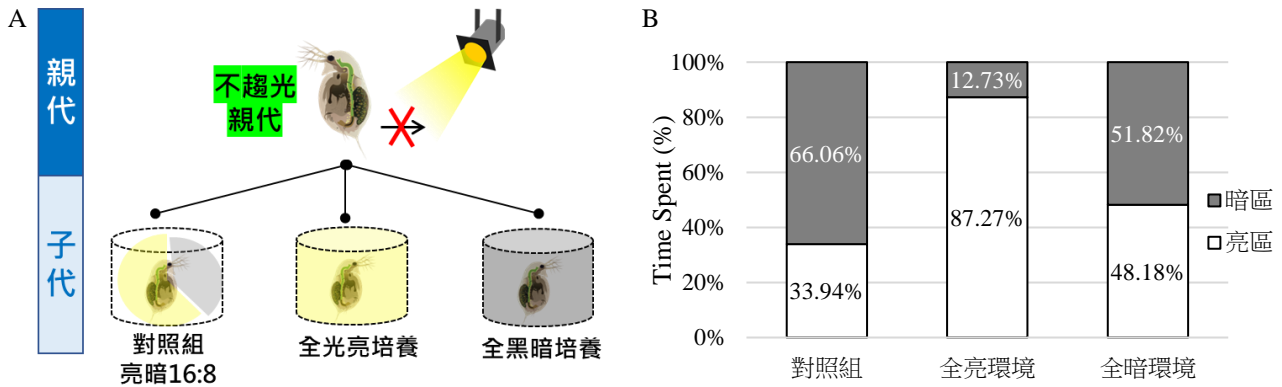


圖 30.無趨光水蚤的子代趨光偏好測試結果。A.實驗組示意圖，三種環境培養。B.亮暗區停留時間比例(n=30)

受不趨光性親代的遺傳影響，對照組及全暗環境中的幼蚤仍無明顯的趨光偏好。而全亮環境中的幼蚤表現出顯著的趨光性，可能是全亮環境中成長的幼蚤對光的依賴性大幅增加，對環境光線適應的結果，顯示出後天培養環境在塑造水蚤趨光行為起重要作用。

運動分析：

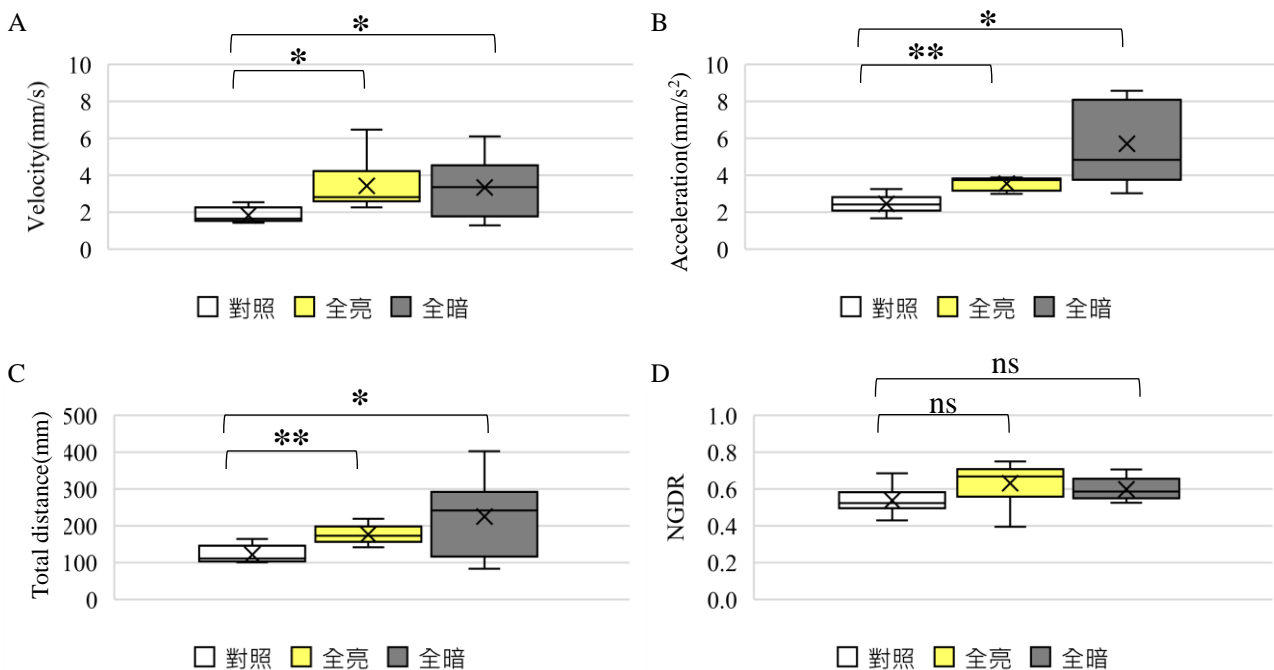


圖 31.無趨光水蚤子代的運動分析結果。A.移動速度測試結果。B.移動平均加速度。C.一分鐘內移動總距離。D.NGDR。(n=18, T test, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)

平均速度 Velocity(mm/s)、平均加速度 Acceleration(mm/s²)：

由圖 31 可知，無趨光水蚤子代中全亮組與全暗組的速度及加速度均大於對照組，且具有顯著差異。這可能與他們缺乏光線亮度變化的經驗有關，證實後天環境對行為的影響。

運動總距離 Total distance(mm)、NGDR：

全亮培養與全暗培養的方式皆會影響水蚤運動表現，移動總距離增大，活動力較大。三組水蚤 NDGR 並無明顯差距。趨光水蚤子代全亮組無明顯改變，但不趨光子代經全亮培養後明顯影響運動表現，顯示這兩族群先天條件上應有所不同，推測趨光水蚤較能適應光線。

研究四、 探討趨光行為是否能因後天逆轉？

實驗 4-1 趨光行為是否會疲勞？

趨光偏好分析：

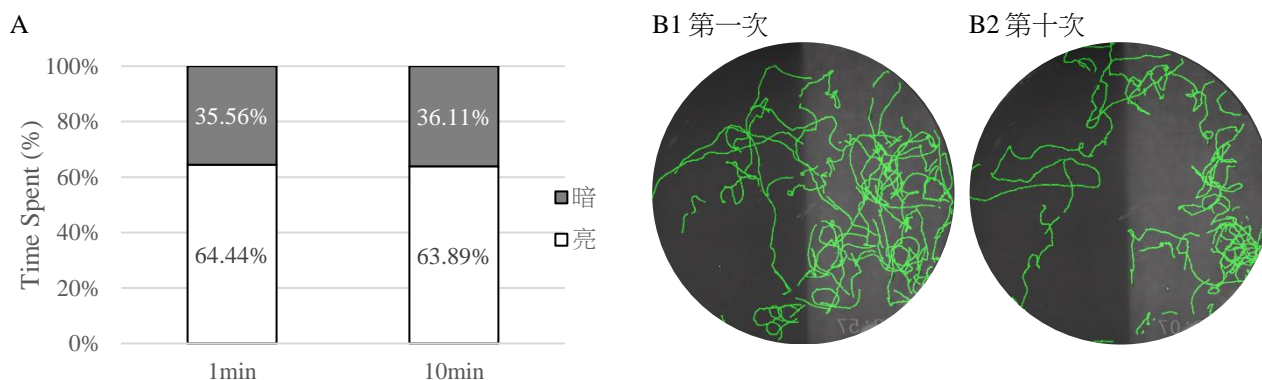


圖 32. 多次趨光刺激後水蚤偏好測試結果。A. 水蚤在亮暗區停留時間比例(n=60)。B. 水蚤移動軌跡圖。

經過反覆刺激後，水蚤在亮區和暗區的停留時間比例基本保持不變，沒有明顯的適應或疲勞現象，從軌跡圖則可發現在第十次趨光刺激時，水蚤分佈趨於集中。

運動分析：

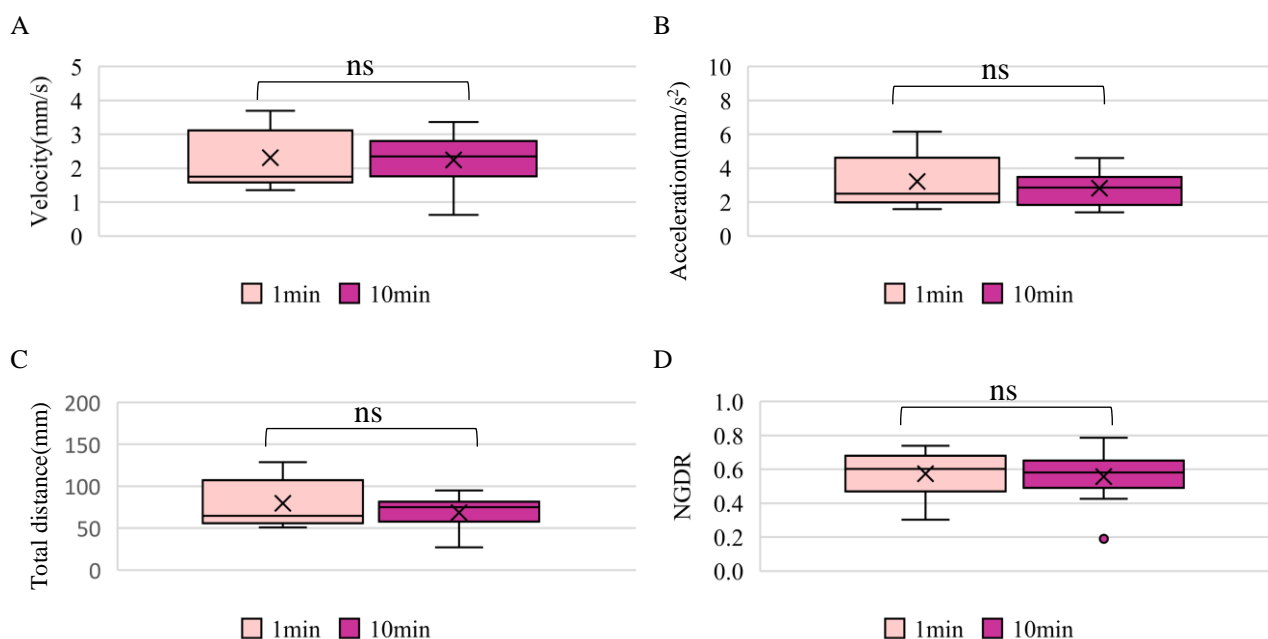


圖 33. 水蚤在多次刺激下趨光運動分析結果。A. 移動速度測試結果。B. 移動平均加速度。C. 一分鐘內移動總距離。D. NGDR。(n=18, T test, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)

平均速度 Velocity(mm/s)、平均加速度 Acceleration(mm/s²)：

由圖 33 可知，在反覆刺激下，第一次與第十次趨光刺激時，水蚤移動速度及加速度並無明顯差異，這顯示水蚤持續對光刺激做出反應，10 次刺激後水蚤運動速度並未降低。

運動總距離 Total distance(mm)、NGDR：

在反覆刺激下，第一次與第十次運動總距離及 NGDR 值並無明顯差異。水蚤可能具有自我調節的能力，使其能夠持續對刺激做出反應，可能再增加更多的刺激次數。

實驗 4-2 在掠食者利他素環境下水蚤的趨光偏好

趨光偏好分析：

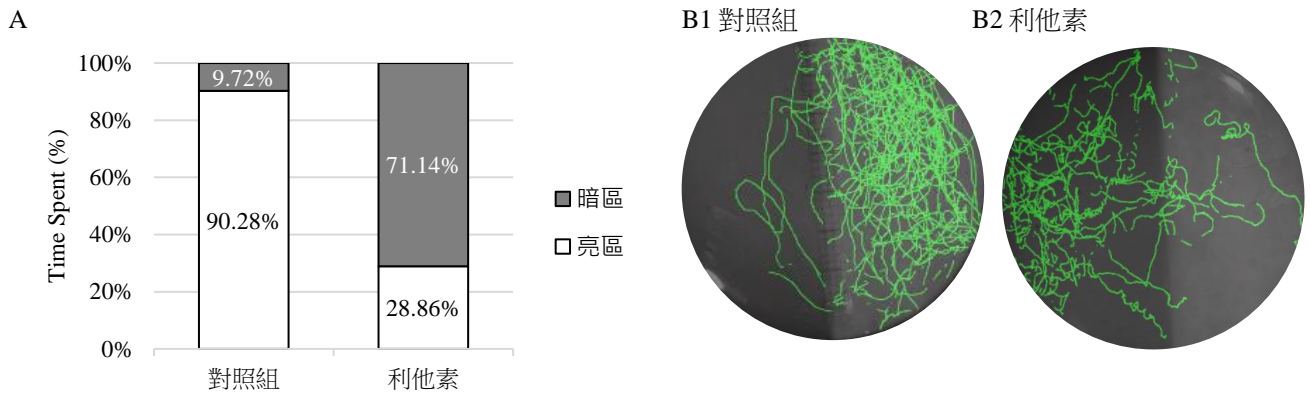


圖 34. 水蚤在利他素環境下趨光偏好測試結果。A. 水蚤在亮暗區停留時間比例(n=60)。B. 水蚤移動軌跡圖。

由圖 34 發現，當水蚤處於有利他素環境下，感知到掠食者的訊息，明顯轉變偏好在暗區移動，在亮區的比例僅有 28.86%。我們推測，水蚤透過利他素能改變對光的感知和行為反應，導致原先趨光反應受到抑制，這可能是因為暗區提供了更好的避免掠食者的保護。

運動分析：

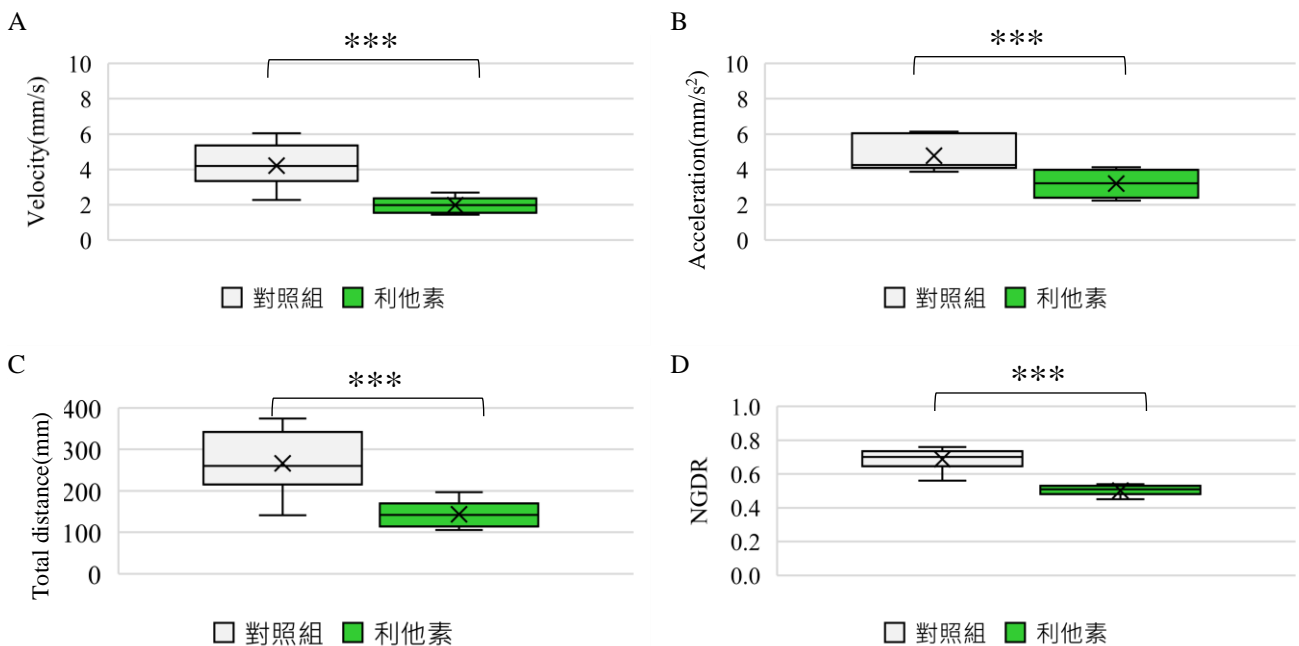


圖 35. 水蚤在利他素環境下趨光運動分析結果。A. 移動速度測試結果。B. 移動平均加速度。C. 一分鐘內移動總距離。D. NGDR。(n=18, T test, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)

平均速度 Velocity(mm/s)、平均加速度 Acceleration(mm/s²)：

圖 35 顯示，當水蚤暴露在利他素環境中其平均速度、加速度顯著低於對照組，速度約為 1.98mm/s；平均加速度約為 3.19mm/s。水蚤在利他素環境中表現出較低的活動水平，我們推測水蚤是為了不引起較大的擾動，因此速度較對照組慢。

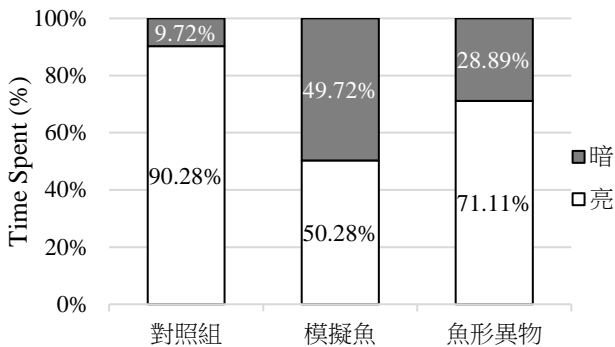
運動總距離 Total distance(mm)、NGDR：

在利他素環境下的水蚤移動總位移顯著低於對照組，約為 143.7mm，對照組為 266.1mm；NGDR 的降低顯示出移動路徑更為曲折，反應了行為模式的改變。綜合以上觀察，利他素的存在對水蚤的移動行為產生了明顯的影響。

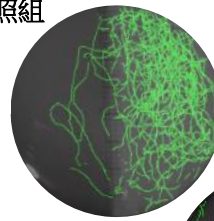
實驗 4-3 模擬掠食者進入環境下水蚤的趨光偏好

趨光偏好分析：

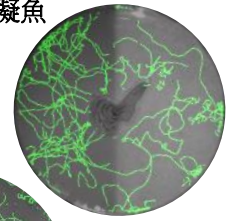
A



B1 對照組



B2 模擬魚



B3 魚形異物

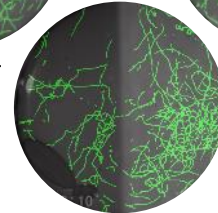
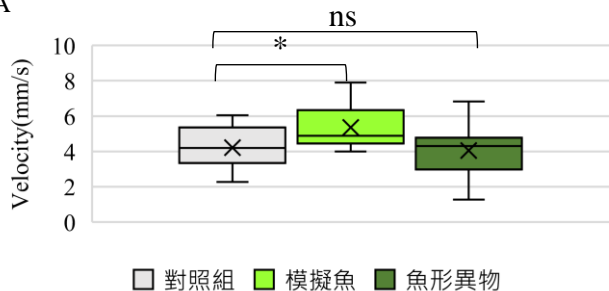


圖 36.水蚤在模擬魚環境下趨光偏好測試結果。A.水蚤在亮暗區停留時間比例(n=60)。B.水蚤移動軌跡圖。

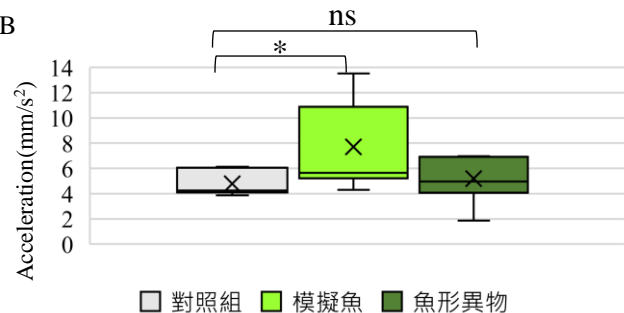
由圖 36 可知，在模擬魚環境下水蚤的停留在暗區時間相對增加，趨光行為受到抑制。由軌跡圖也可觀察到分布改變，這可能反應了水蚤對前在掠食者的適應性行為。

運動分析：

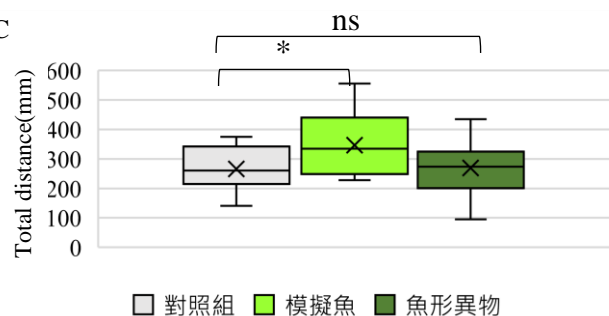
A



B



C



D

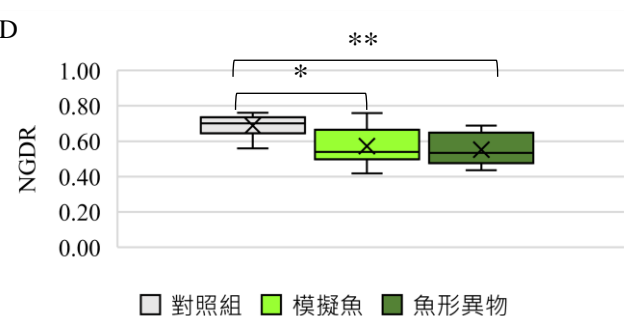


圖 37.水蚤在模擬魚環境下趨光運動分析結果。A.移動速度測試結果。B.移動平均加速度。C.一分鐘內移動總距離。D.NGDR。(n=18, T test, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)

平均速度 Velocity(mm/s)、平均加速度 Acceleration(mm/s²)：

水蚤在有模擬魚存在的環境下速度及加速度均高於對照組。水蚤在察覺到魚模型的存在後可能表現出更高的移動速度和加速度，以儘快遠離潛在的掠食者。而魚形異物卻沒有明顯差異，推測水蚤能以顏色偵測掠食者。

運動總距離 Total distance(mm)、NGDR：

水蚤在有模擬魚的環境下反映出較高的活動水平，移動總距離較長約 346.3mm 高於對照組的 266.1mm。而在有魚形異物的環境下並沒有明顯差異。在有模擬魚及魚形異物的環境下 NDGR 值均小於對照組，運動軌跡較曲折。

研究五、 探討趨光行為對於水蚤躲避掠食者是否有幫助？

實驗 5-1 掠食者對趨光及不趨光水蚤的捕食比較

捕食比較：

從圖 38 發現，趨光水蚤組的被捕食數量比不趨光水蚤組低，推論對光敏感的趨光水蚤對於孔雀魚的捕食更具有一定程度的避免性或者反應速度更快，從而減少了被捕食的機會

意外發現—繞圈行為：

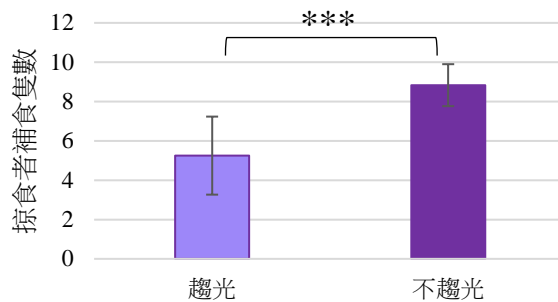


圖 38. 掠食者 10 分鐘內捕食隻數比較

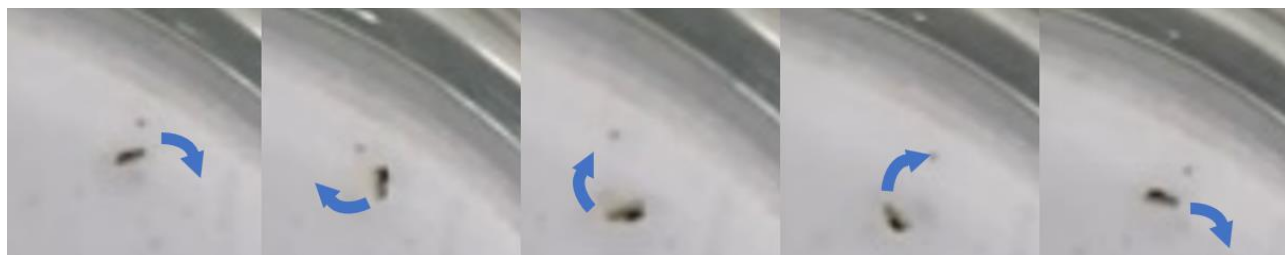


圖 39. 水蚤繞圈行為分鏡圖



圖 40. 水蚤繞圈運動軌跡圖

此外，我們在實驗 5-1 發現水蚤在有掠食者的環境下會出現持續規律繞圈的特殊行為。推測此行為是一種逃避策略，水蚤藉由使掠食者的視線混亂增加逃脫機率。經過分析，水蚤的繞圈運動可持續 17 秒左右，繞圈運動角速率約為 $90^\circ/s$ ，平均移動速度和加速度為 10.1mm/s 和 75.6mm/s^2 ，繞行圓周非常小，幾近自轉，NGDR 值僅 0.27，甚至在被掠食者攻擊後還會持續轉圈。這些結果指出水蚤繞圈行為是一種特殊的運動模式，其行為特徵（如繞行圓周小、高角速率、低 NGDR 值等）凸顯此行為與平常的游泳行為的差異，值得深入探討。

研究六、 生物資訊分析水蚤基因體中的感光蛋白序列

實驗 6-1：不同物種 rhodopsin 蛋白序列的相似性分析

表 1. 各物種 rhodopsin 蛋白序列與 *Daphnia pulex* 水蚤基因體比對分析

查詢的蛋白質序列	胺基酸長度	對應到的序列位置	對應到的長度	Identities	Positives	Gaps	E value
<i>rhodopsin</i> [<i>Daphnia magna</i>] 大型溞	541 aa	<i>D. pulex</i> chromosome9 1762485 to 1763801	466	72%	82%	5%	0
<i>rhodopsin</i> [<i>Hyalella azteca</i>] 糠鈎蝦	381 aa	<i>D. pulex</i> chromosome2 7970800 to 7971963	388	35%	51%	18%	1e-60
<i>rhodopsin</i> [<i>Trichonephila clavipes</i>] 金絲蜘蛛	418 aa	<i>D. pulex</i> chromosome9 4707749 to 4708483	245	39%	64%	9%	3e-55
<i>rhodopsin</i> [<i>Acyrtosiphon pisum</i>] 豌豆蚜	492 aa	<i>D. pulex</i> chromosome9 1755684 to 1756709	360	40%	59%	9%	8e-76
<i>rhodopsin</i> [<i>Anopheles gambiae</i>] 甘比亞瘧蚊	374 aa	<i>D. pulex</i> chromosome6 2930407 to 2930766	120	52%	70%	2%	9e-59
<i>rhodopsin</i> [<i>Danio rerio</i>] 斑馬魚	354 aa	<i>D. pulex</i> chromosome9 1762476 to 1763324	287	30%	51%	5%	1e-32
<i>rhodopsin</i> [<i>Homo sapiens</i>] 智人	348 aa	<i>D. pulex</i> chromosome9 1762461 to 1763342	298	28%	51%	6%	4e-32
<i>rhodopsin</i> [<i>Rattus norvegicus</i>] 褐色家鼠	348 aa	<i>D. pulex</i> chromosome9 1762461 to 1763342	298	28%	50%	6%	8e-32

從比對結果可以看出，水蚤與同屬的 *Daphnia magna* 的 rhodopsin 蛋白序列相似性最高，與其他節肢動物（如糠鉤蝦和金絲蜘蛛）相比，水蚤的相似性明顯降低，反映出一定的保守性。而與脊椎動物（如斑馬魚、智人、褐色家鼠）相比，水蚤的 rhodopsin 蛋白序列相似性最低，反映了在演化過程中，無脊椎動物與脊椎動物之間的顯著差異。也可以發現到在糠鉤蝦、瘧蚊感光蛋白對應到其他染色體其他位置，水蚤應有多種感光蛋白。

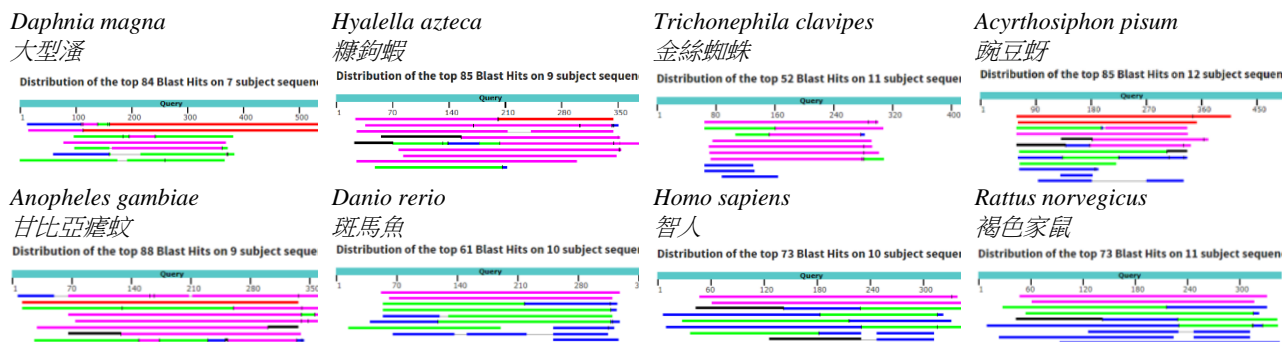


圖 41.各物種比對結果。Alignment Scores : ■ < 40 , ■ 40 – 50 , ■ 50 – 80 , ■ 80 - 200 , ■ >= 200

實驗 6-2：果蠅 rhodopsin1~7 與水蚤基因體的比對分析

表 2. 果蠅 rhodopsin 蛋白序列與 *Daphnia pulex* 水蚤基因體比對分析

果蠅感光蛋白	最大吸收波長	胺基酸長度	對應到的序列位置	對應到的長度	Identities	Positives	Gaps	E value
<i>Rhodopsin1</i>	綠藍光 480 nm	373 aa	<i>D. pulex</i> chromosome 6 2915479 to 2915880	134	51%	65%	1%	3e-61
<i>Rhodopsin2</i>	藍紫光 420 nm	381 aa	<i>D. pulex</i> chromosome 6 2930407 to 2930772	122	54%	70%	1%	4e-64
<i>Rhodopsin3</i>	紫外光 345 nm	383 aa	<i>D. pulex</i> chromosome 2 7980210 to 7981352	381	31%	47%	18%	9e-49
<i>Rhodopsin4</i>	紫外光 375 nm	378 aa	<i>D. pulex</i> chromosome 3 7127709 to 7128137	144	54%	76%	0%	3e-77
<i>Rhodopsin5</i>	藍光 442 nm	382 aa	<i>D. pulex</i> chromosome 6 2915494 to 2916015	174	39%	55%	12%	1e-55
<i>Rhodopsin6</i>	綠光 508 nm	369 aa	<i>D. pulex</i> chromosome 6 2920723 to 2921508	262	33%	47%	28%	3e-61
<i>Rhodopsin7</i>	藍光 紫外光	483 aa	<i>D. pulex</i> chromosome 9 4707743 to 4708489	252	36%	53%	15%	2e-38

實驗結果顯示，Rhodopsin2 和 Rhodopsin4 在相似性方面最高，Identities 分別為 54% 和 54%，顯示這些蛋白質在不同物種間具有一定的保守性。Rhodopsin3 和 Rhodopsin6 的相似性較低，Identities 分別為 31% 和 33%，反映出其在感光功能上的演化多樣性。七種感光蛋白的 E 值，均小於 1e-30，比對結果高度顯著，表示果蠅不同波長的感光蛋白與水蚤 *Daphnia pulex* 具有功能和結構上的相似性，可以進一步鑑定出水蚤中具備類似功能的光感受蛋白。

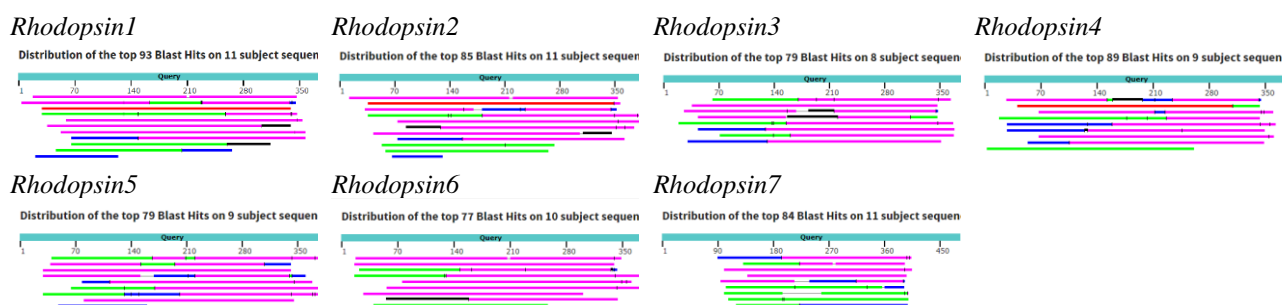
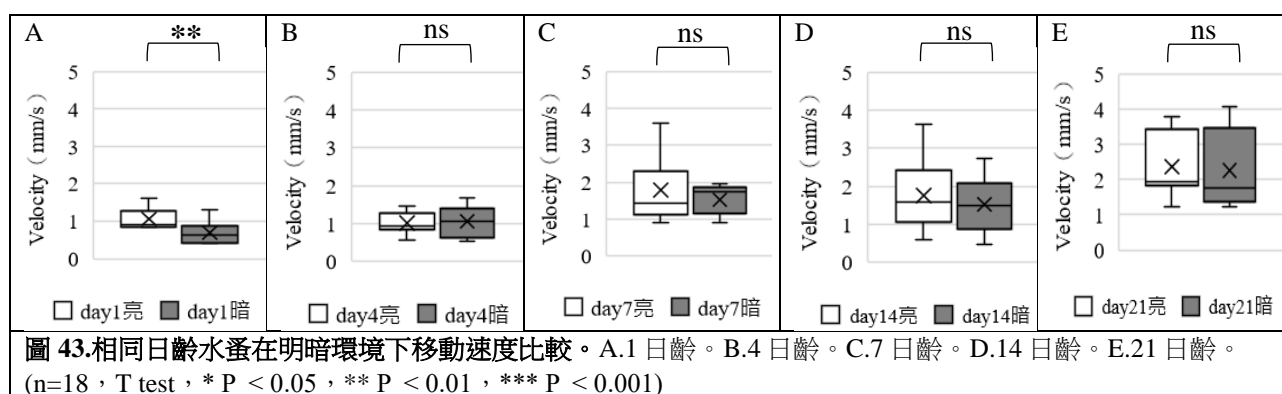


圖 42.果蠅感光蛋白比對結果。Alignment Scores : ■ < 40 , ■ 40 – 50 , ■ 50 – 80 , ■ 80 - 200 , ■ >= 200

柒、問題與討論

研究一、不同生活史階段的水蚤運動行為有不同嗎？

1. 水蚤在 1 日齡 ~ 21 日齡的體長有較顯著的變化，21 日齡後而漸緩。飼養過程中可能發現個體死亡，特別是要收集成長至三週以上的水蚤較為困難。
2. 由圖 43 發現，若比較同一日齡在亮暗環境下的運動速度，經分析後只有 1 日齡水蚤在明暗環境下速度上有顯著差異，其餘年齡較大的水蚤，都沒有差異。推測水蚤在不同發育階段對光照的敏感度有所不同，1 日齡水蚤可能對於光線的變化更為敏感，因此在明暗環境下表現出了明顯的速度差異。而隨著年齡增長，它們的運動模式變得更加穩定。



3. 實際偵測影片時，我們發現過程中模型可能會因水蚤姿態的改變，導致模型將水蚤識別為新的個體，這導致我們獲得的個體 x、y 座標數據會分為多筆 ID 資料，不易個別計算。後來我們改以繪製軌跡的方式呈現，能獲得測試盤中所有水蚤的運動軌跡，不限目標 ID 限制，成功解決問題，透過軌跡圖可以幫助了解水蚤的行徑及分布型態。

研究二、探討不同條件下水蚤的趨光行為的差異

1. 經實驗證實 *Daphnia pulex* 多半是表現出正趨光性，此偏好與國外 *Daphnia magna* 表現負趨光性(H. Nagel, 2022)的情況不同，顯示不同物種在行為上可能存在差異。查詢文獻發現，兩種物種的生活史策略也有所差異(Ebert, 2022)，*D. magna* 通常具有較大的體型，並且在繁殖時產生較少的後代；*D. pulex* 的體型較小，但每次繁殖產生的後代數量較多。
2. 實驗 2-2 發現相對於弱光，強光明顯激發水蚤的趨光反應，並提高水蚤運動速度。根據結果我們發現光線強度須達到一定的閾值，水蚤才會表現出明顯的趨光偏好。這值得進一步探討光線強度如何影響水蚤的感光細胞或神經系統的活性，如光受器的活性閾值，以及神經訊號在不同光線強度下的傳遞方式，了解如何影響趨光行為的觸發。

研究三、驗證水蚤趨光行為是否為遺傳基因控制

1. 水蚤族群幾乎都由雌蚤組成，一般為孤雌生殖，夏卵會在育兒室中直接發育為幼蚤。我們在飼養缸中觀察到水蚤以夏卵進行無性生殖時，大約 4~6 天即可產下幼蚤，夏卵無經過受精，與母體攜帶相同遺傳物質。飼養缸中亦有水蚤產生耐久卵，將耐久卵濾出嘗試孵化，但觀察 2 週以上，皆未順利孵化。

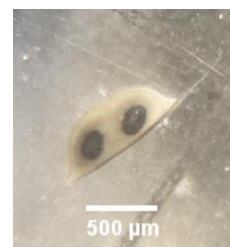


圖 44. 水蚤耐久卵

2. 由實驗 3-1 及實驗 3-2 由於能成長至 21 日大的子代個體過少，我們改以分析 7 日齡的子代個體。對於趨光族群而言，子代似乎更能夠適應全亮和全暗的生長環境，其運動表現與對照組無明顯差異，然而不趨光族群的子代在處於不同環境中生長後，其運動表現明顯受到影響，這可能表示其子代對全亮環境有較強的排斥反應，適應能力較差。在全亮環境下培養後，趨光子代產生較為趨光的反應，證明趨光行為可為後天所逆轉。

研究四、探討趨光行為是否能因後天逆轉？

1. 實驗 4-2 結果顯示暴露於利他素(Kairomone)的水蚤接受趨光刺激時會降低其游泳速度，此結果與(Langer,2021)的結果相似，然而前人研究是水蚤置於可見光及紅外光的穩定環境中測試，發現在利他素中的水蚤均有相似的降速表現，游泳緩慢的生物體較不吸引魚類的注意，因此降低速度可能會降低掠食者的偵測率，此次實驗的結果補充了先前的研究，進一步說明了水蚤在暴露於利他素中且受到光刺激時會採取相似策略，並抑制趨光反應。我們也可發現水蚤趨光行為是可以後天逆轉的。
2. 前人研究表明水蚤能感知環境中化學物質或利他素的存在，長期暴露於捕食者利他素下，水蚤可能形成保護性結構，例如尾刺、頭盔等(Ebert,2022)，而在我們實驗中觀察到，即使是短期的暴露於利他素環境中，也能引起水蚤行為明顯的變化，包含趨光反應及運動速度。

捌、 結論

1. 水蚤的體型在前三週成長幅度大，體長隨年齡增加，之後體長保持穩定。
2. 全亮或全暗環境中，日齡越大的水蚤移動速度和加速度都較大，21 日齡移動相對筆直。
3. 利用 YOLOv8 訓練自定義資料集，模型成效優良辨識正確率 94.33%，結合 ByteTrack 演算法進行影片可對水蚤進行多目標追蹤，並繪製運動軌跡圖。
4. 1 日齡及 7 日齡的水蚤趨光比例較 21 日齡高，受限於體型 1 日齡的速度及加速度較低。
5. 強光下水蚤趨光比例明顯提高，且運動表現上速度、加速度、總位移、NGDR 都較高。
6. 各種色光均能誘發水蚤趨光反應，但在波長較短的藍光下水蚤速度和加速度較低。
7. 無論是黑暗前置或常亮前置水蚤均表現對光的偏好，但黑暗前置時，水蚤的趨光運動較積極，運動的速度、加速度相對較大。
8. 水蚤的趨光習性受遺傳所控制，但幼蚤後天培養環境亦能改變其趨光偏好。
9. 連續 10 次刺激後，水蚤依然表現出趨光的偏好，與第一次相比移動速度無明顯差異。
10. 在利他素環境的水蚤趨性改變，偏好選擇暗區，速度、加速度明顯下降，軌跡較曲折。
11. 在有模擬掠食者環境的水蚤也降低對光的偏好，且移動速度會增加，可推測水蚤的趨光性會受掠食者而影響。

12. 不趨光水蚤被魚捕食的機率較趨光水蚤高。
13. 水蚤在面對掠食者時會出現特殊快速繞圈行為。
14. 水蚤與其他物種的 rhodopsin 蛋白序列存在顯著相似性，其趨光性可能受多種光感受蛋白的影響。

玖、 未來展望

- 1、 探討不同發育階段水蚤感光受器與神經系統的結構和功能變化。
- 2、 結合生化分析，探討趨光族群和不趨光族群的水蚤在不同光照條件下的生物化學特徵，如基因表達、蛋白質組成等，以探索其對光線刺激的生物學反應機制。
- 3、 通過遺傳學方法，如交配實驗或基因組分析，研究趨光族群和不趨光族群的水蚤是否存在遺傳差異，以及這些差異如何影響其對光線刺激的反應。
- 4、 探討不同環境污染物對水蚤趨光行為和生態適應性的影響，
- 5、 探討水蚤的趨光行為是否影響到其他種生物對棲息地的利用和競爭。
- 6、 探討水蚤的趨光行為對環境食物鏈的影響，如浮游藻類的分佈和密度。

拾、 參考資料

1. 游淵任、洪廷玠、周祺鈞(2008)。生死相「半」·你「農」我「濃」，040705。
2. 魏博滔、蕭奕佳、呂紹頡、高君諭、徐秉程、林澤鈞(2021)。「蚤」出「癩」形殺手--成癩物質對水蚤心搏之影響，080316。
3. 李佳螢、張碩珍(2009)。蚤尋活水，120003。
4. 羅芝瓴、梁筑庭、宮昕儀(2020)。塑膠微粒對大型蚤生殖的影響，052609。
5. 梁晏誠、甘閎燁、郭晏伶(2018)。「貝」受矚目--探究貝蚤的外形特徵與行為模式，030312。
6. 張博涵(2010)。米蚤懷卵的孵化機制及環境適應力，040701。
7. 張錫峙(2020)。水蚤移動方式在水環境教育之應用，
8. Anna Bednarska(2023) Effect of food quality on escape performance of Daphnia
9. Sina M. Langer(2021) On Daphnia's path: a semi-automatic system to analyze three-dimensional movement patterns
10. Andrew H. Nagel(2022) Effect of thallium on phototactic behaviour in Daphnia magna
11. EvoDevo(2022) Daphnia as a versatile model system in ecology and evolution

【評語】 030311

[以下評語已經過整合]

本研究探討水蚤的趨光行為及其可塑性，發現水蚤趨光性受年齡、光強度、光波長、遺傳及環境因素影響，且可在特定環境下改變。此研究對了解水蚤生態學具有意義外，環境與遺傳因素對於動物行為的改變也是重要且具挑戰性的議題。該團隊利用一個自行開發的 YOLOv8 模型追蹤多隻水蚤的移動軌跡，以多目標追蹤演算法用於微小生物的運動研究，是一個有創意的實驗設計。實驗組與對照組設計合理，涵蓋光強度、光波長、光照前置等多種環境變量，實驗數值擷取與紀錄完整。報告中對不同條件下水蚤的趨光行為進行詳細的數值紀錄與統計分析，包括速度、加速度、移動距離及 NGDR 值。數值統計分析充分，組間的顯著性分析合理，有效支持研究結論。以下為數點建議：

1. 問題與討論部分仍屬於實驗結果的延伸說明，缺乏與其他相關研究的比較。此部分建議應引用相關研究文獻。系統性地研究水蚤在不同條件下的趨光行為，探討遺傳和環境對其行為的影響。結果對水蚤生態學的理论基礎和水體生態監測具有學術價值和實用價值。

2. 研究方法使用多種實驗方法，包括多目標追蹤技術和光偏好測試，結合 YOLOv8 模型來追蹤水蚤的運動軌跡。數據統計分析充分，結果顯著性分析合理。
3. 利用 YOLOv8 建置水蚤游動辨識模型，確實可增加研究效率，本研究的許多實驗也仰賴此模型，惟建議可以多評估此模型計算與真實情況的正確率，以避免可能的誤差而造成的誤判。
4. 趨光的光源位置設計可再加強或思考。建議可以把光源固定在培養皿的某一側，而非全面照射。現有的結果比較像是因為光照促使水蚤移動性增加，但不一定是趨光。
5. 從行為觀察延伸到是否有基因遺傳性外，也探討了是否能因後天逆轉，增加了研究的深度。研究發現受不趨光性親代的遺傳影響，全亮環境中的幼蚤表現出顯著的趨光性，可能是全亮環境中成長的幼蚤對光的依賴性大幅增加，對環境光線適應的結果，顯示出後天培養環境在塑造水蚤趨光行為中起重要作用。審查者好奇，那後天培養環境所塑造出趨光行為的水蚤後代，其趨光性又是如何呢？這也是個未來可以探討的有趣議題。

作品簡報



蚤必投光？



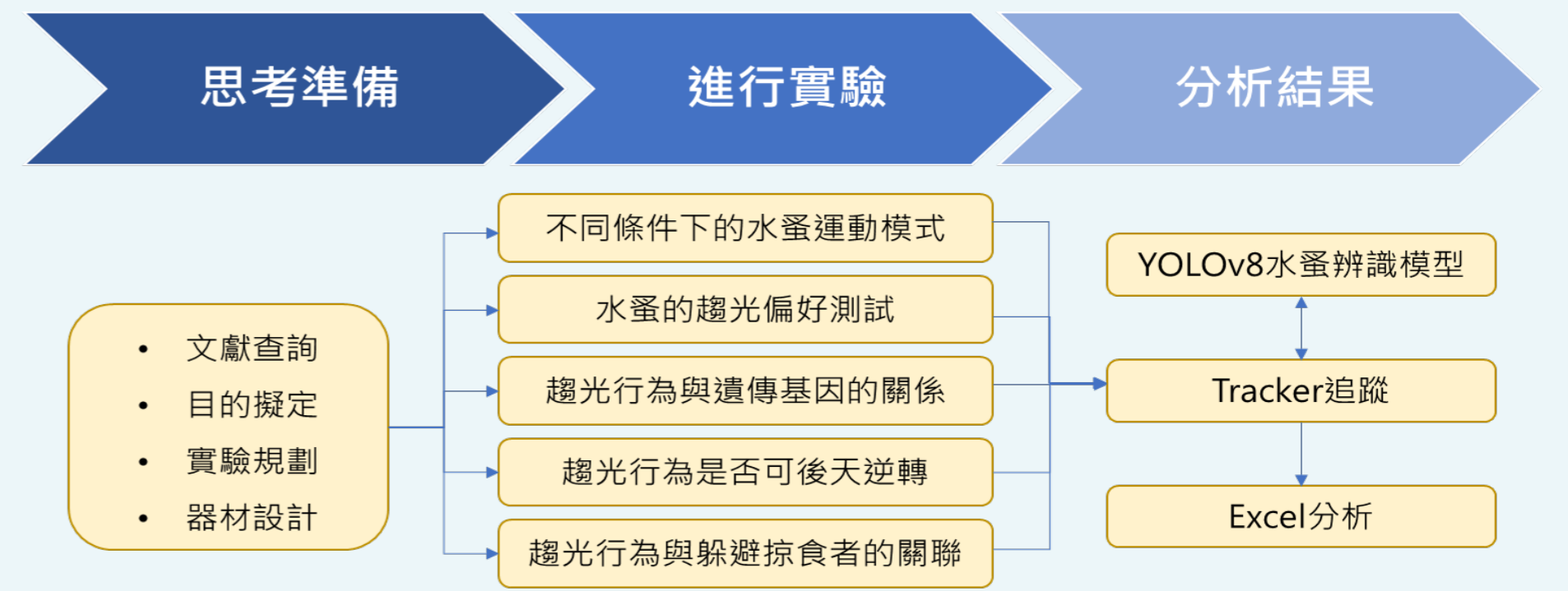
水蚤趨光行為及可塑性研究

壹、摘要

本研究探討水蚤(*Daphnia pulex*)趨光行為的可塑性與各運動數值差異，藉由自行開發的YOLOv8模型追蹤多隻水蚤的移動軌跡，並使用Tracker軟體分析各項數據。研究顯示水蚤傾向趨光，水蚤日齡越大、光照度越強、光波長越長，和黑暗前置都會使水蚤在趨光測試中移動速度增快。遺傳和生長環境皆會影響到水蚤對光線刺激的行為反應，並發現水蚤在利他素或模擬掠食者的環境下，發生趨光行為和運動表現的轉變。最後比較趨光與不趨光個體面對掠食者的逃脫率，意外發現了水蚤禦敵時會行繞圈運動，這些發現為水蚤行為學提供了新的理解和視角。此外，在水蚤基因體中發現多處與果蠅的rhodopsin蛋白高度相關的序列，值得未來進一步研究。

貳、研究目的

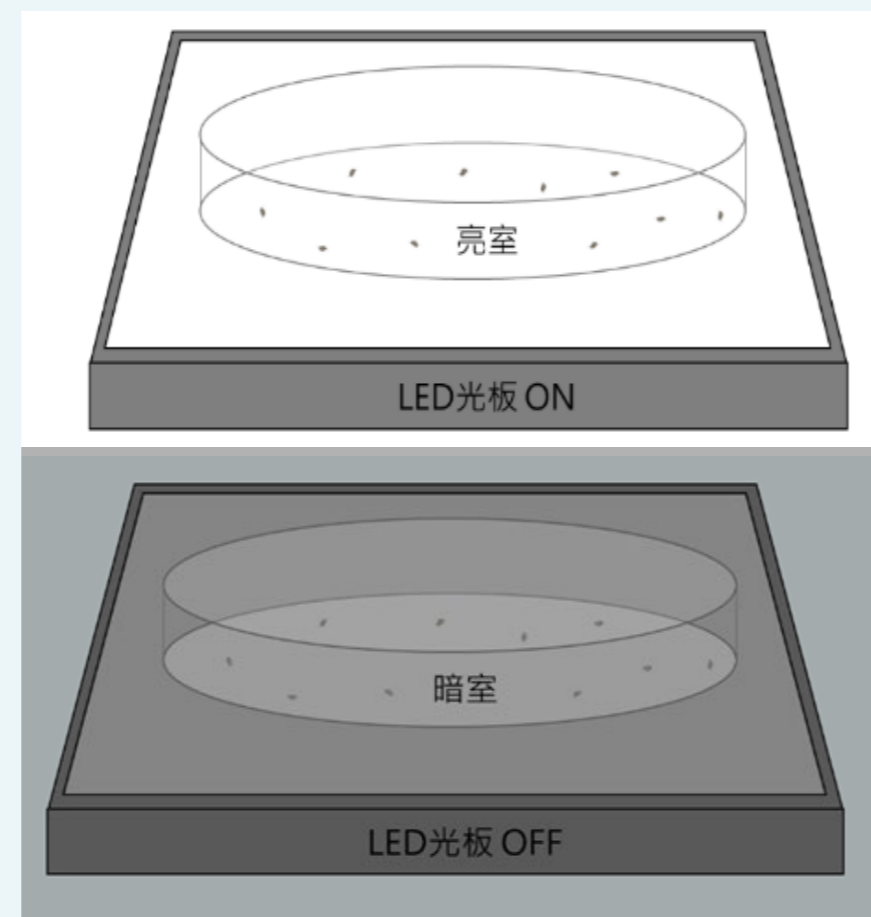
- 研究一、不同水蚤生活史階段的運動行為有不同嗎？
- 研究二、探討不同條件下水蚤的趨光行為的差異
- 研究三、驗證水蚤趨光行為是否為遺傳控制
- 研究四、探討趨光行為是否能因後天逆轉？
- 研究五、探討趨光行為對於水蚤躲避掠食者是否有幫助？



參、研究過程與方法

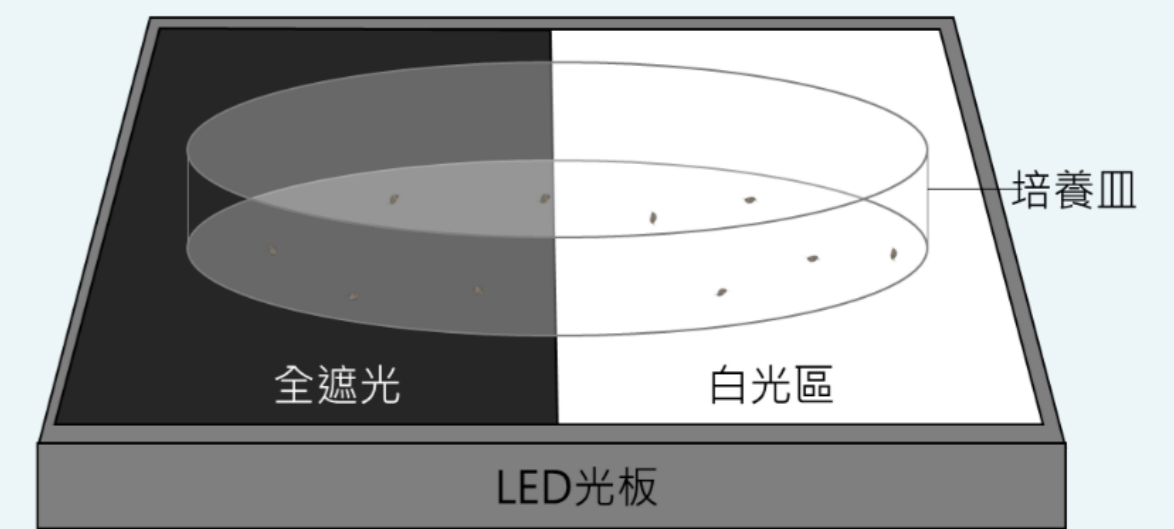
二維運動分析 (2D Movement Analysis)

使用紅外線攝影機，自上方俯拍記錄，其後擷取1分鐘水蚤運動影片，匯入Tracker手動追蹤物體水蚤的運動軌跡和姿態，獲得有關運動特徵和動作的詳細資訊。



趨光偏好測試 (Light-Preference Assay)

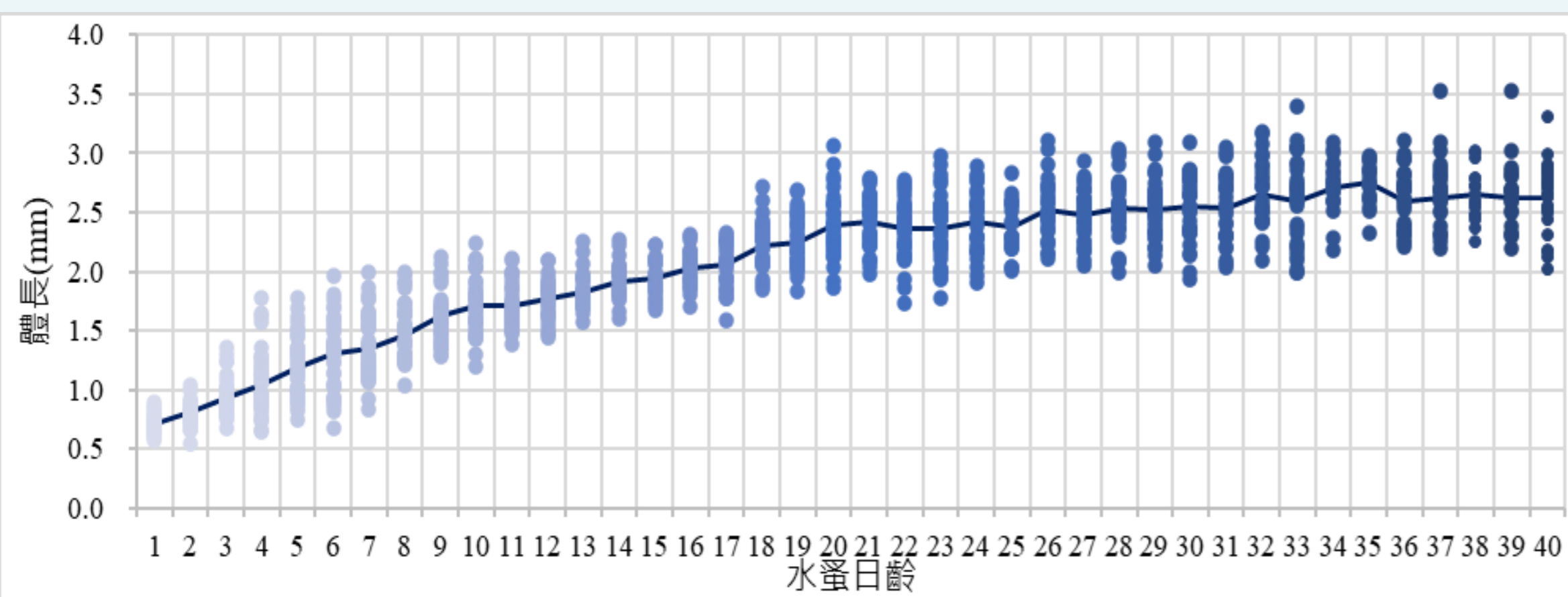
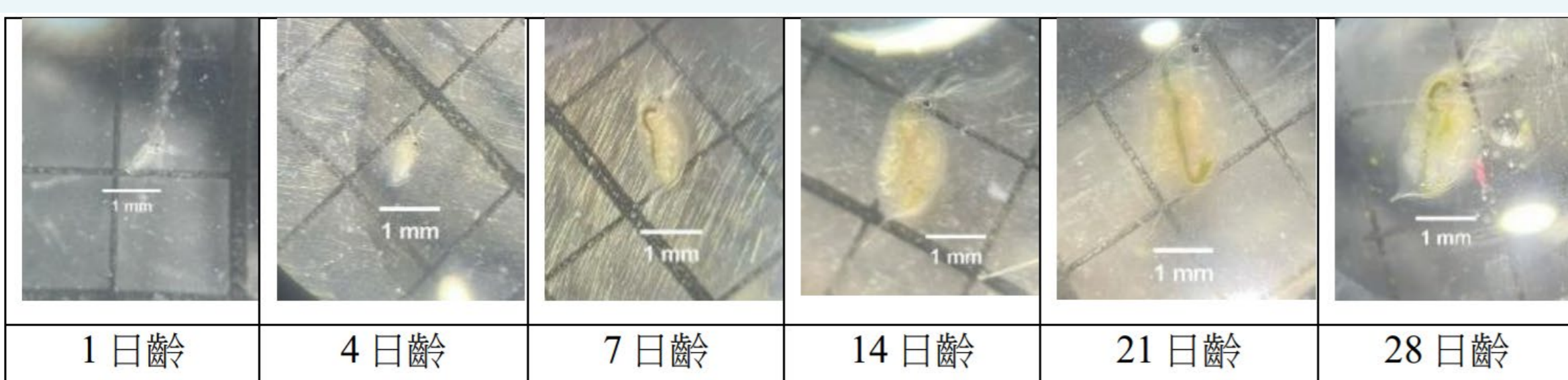
此實驗全程於特製暗室行為房觀察，確保在黑暗條件下進行，選擇體型一致的20隻個體，將水蚤置於測試培養盤中，將一半底板區域貼上全遮光貼膜，並鋪上白紙，使明暗區外觀一致。前5分鐘黑暗期作為水蚤適應期，使其自由移動不予分析，其後開啟LED光板自裝置下方投射白光，進行趨光試驗。擷取燈源開啟後第1分鐘影片，匯入電腦分析。評估水蚤在明/暗區域花費的時間和速度。



肆、研究結果

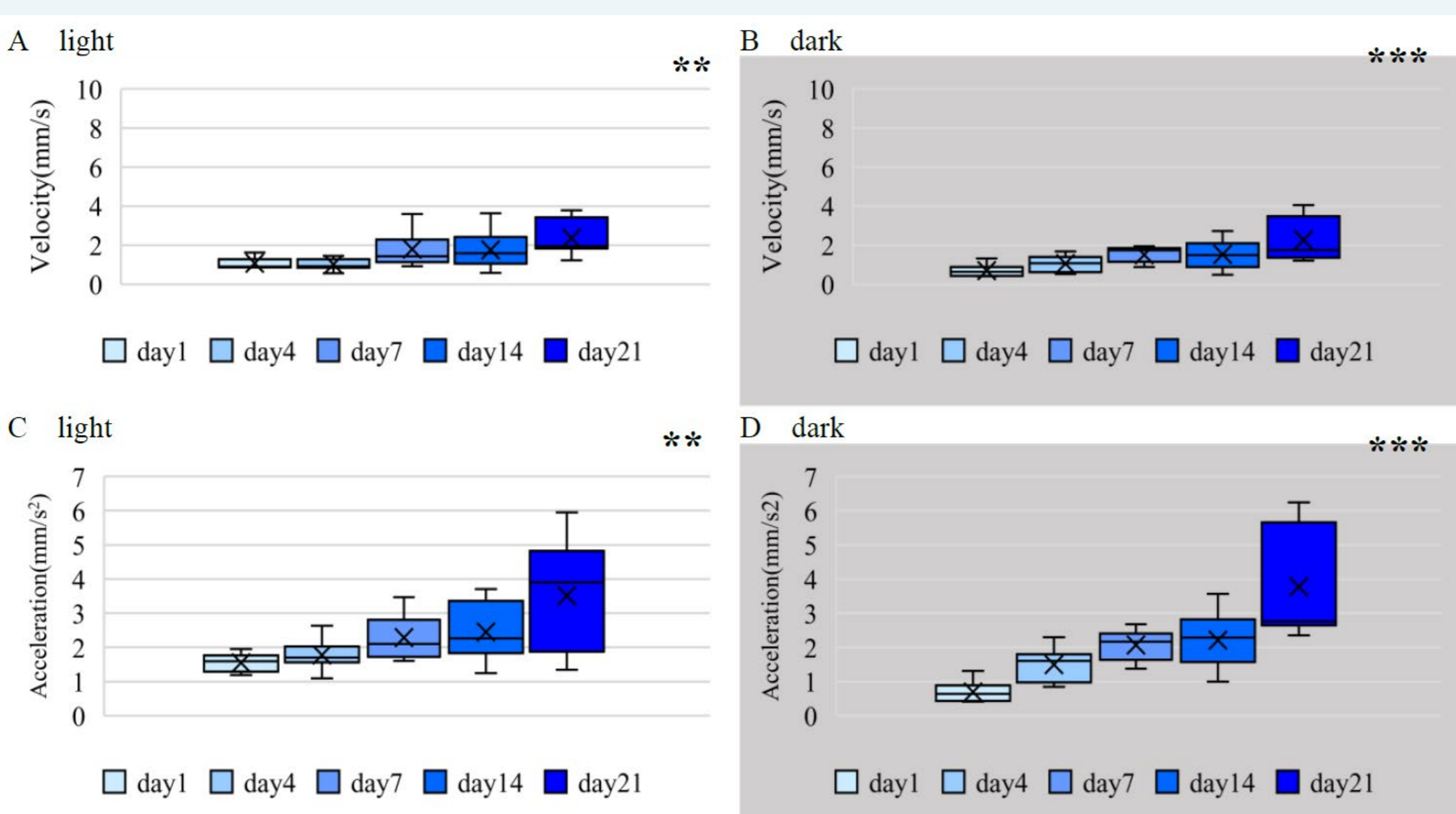
研究一、不同生活史階段水蚤的運動行為

實驗1-1：水蚤的體型和年齡有沒有相關？

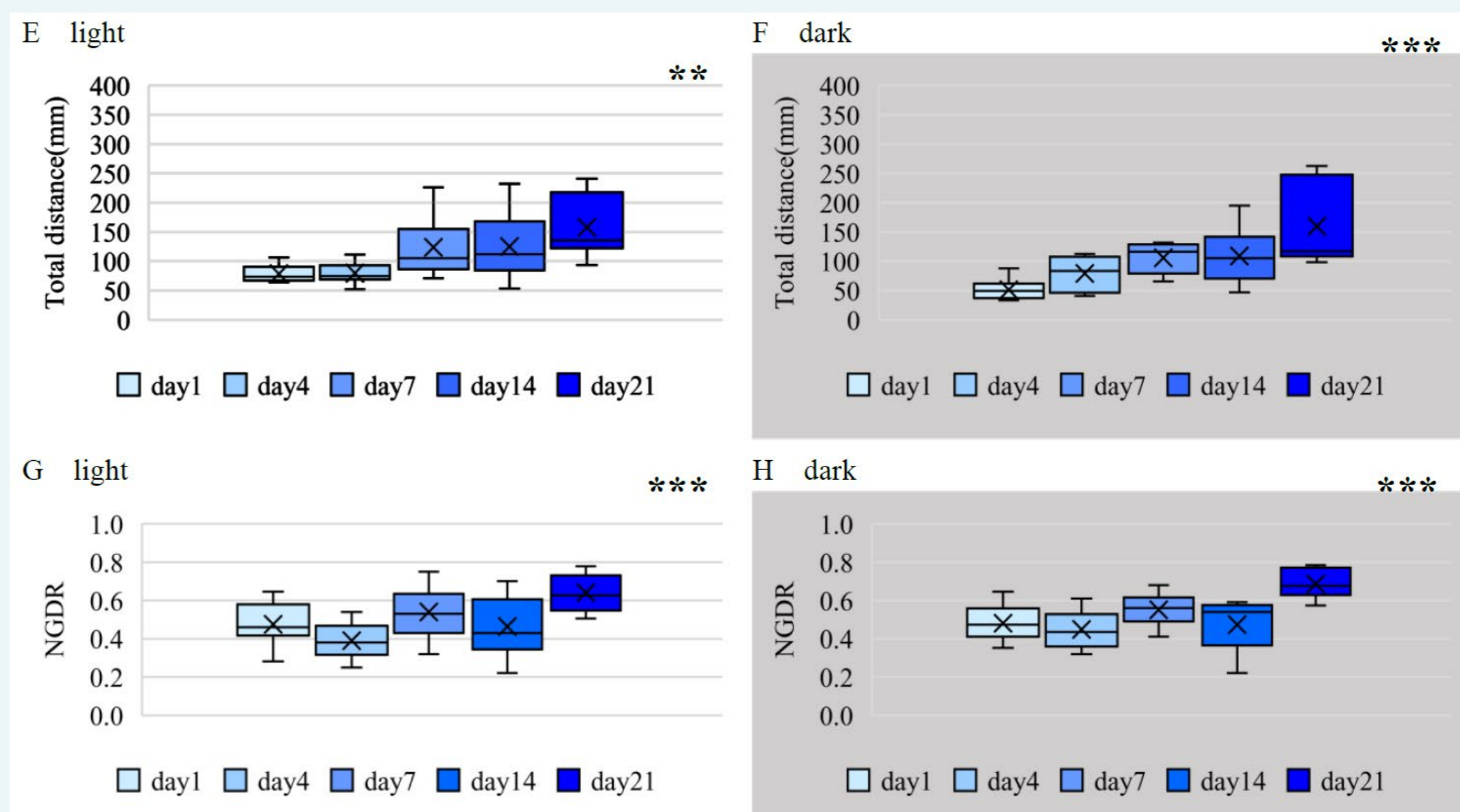


在前三週，水蚤的體型與年齡呈現正相關，隨著年齡增長，水蚤的體長也逐漸增加，第三週後水蚤體長不再明顯成長。

實驗1-2：不同日齡水蚤運動行為的差異

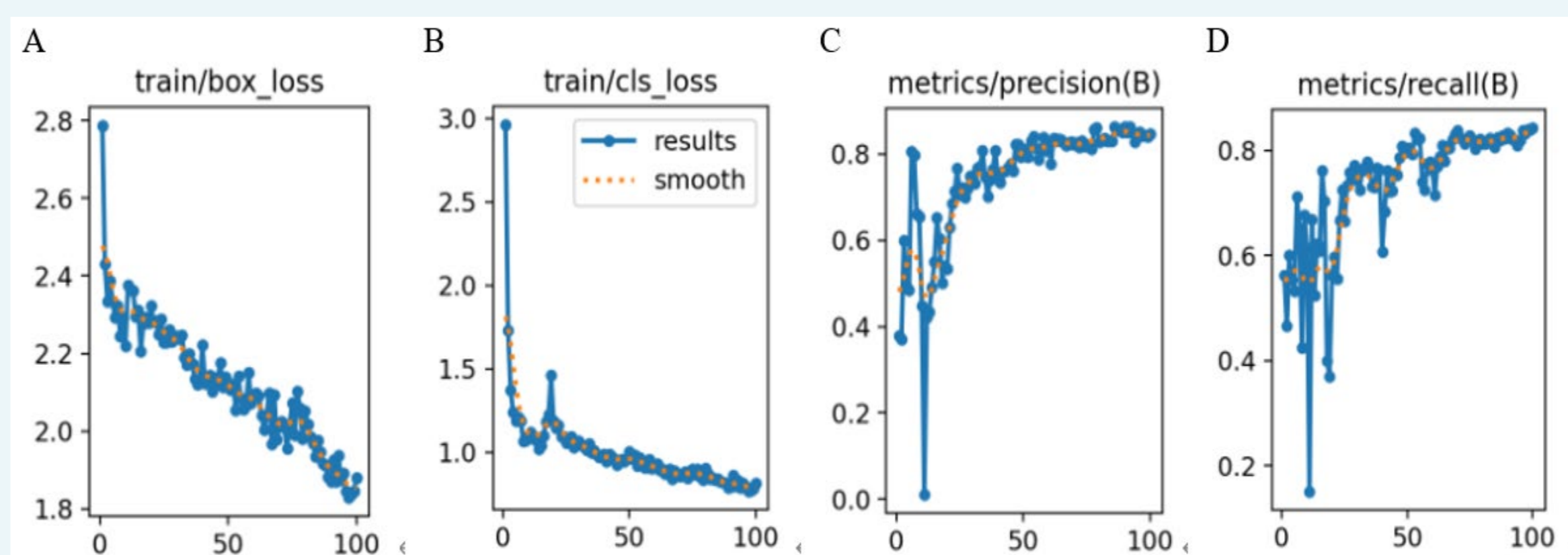


水蚤幼期個體間運動速度較為接近，隨著成長後個體速度差異增大，年齡越大的水蚤其移動速度及加速度越大。

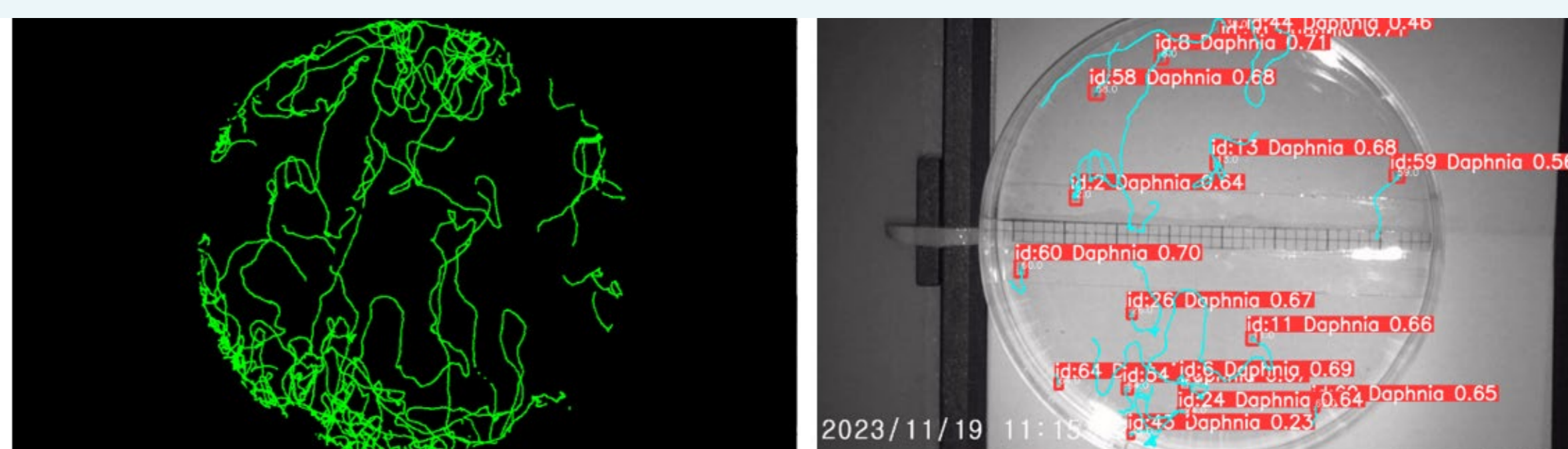


21日齡的NGDR較高，顯示其移動路徑較為筆直，其餘四組年齡較小的水蚤差異不大，NGDR值偏小，移動較為曲折。

實驗1-3：利用YOLOv8建置水蚤辨識模型



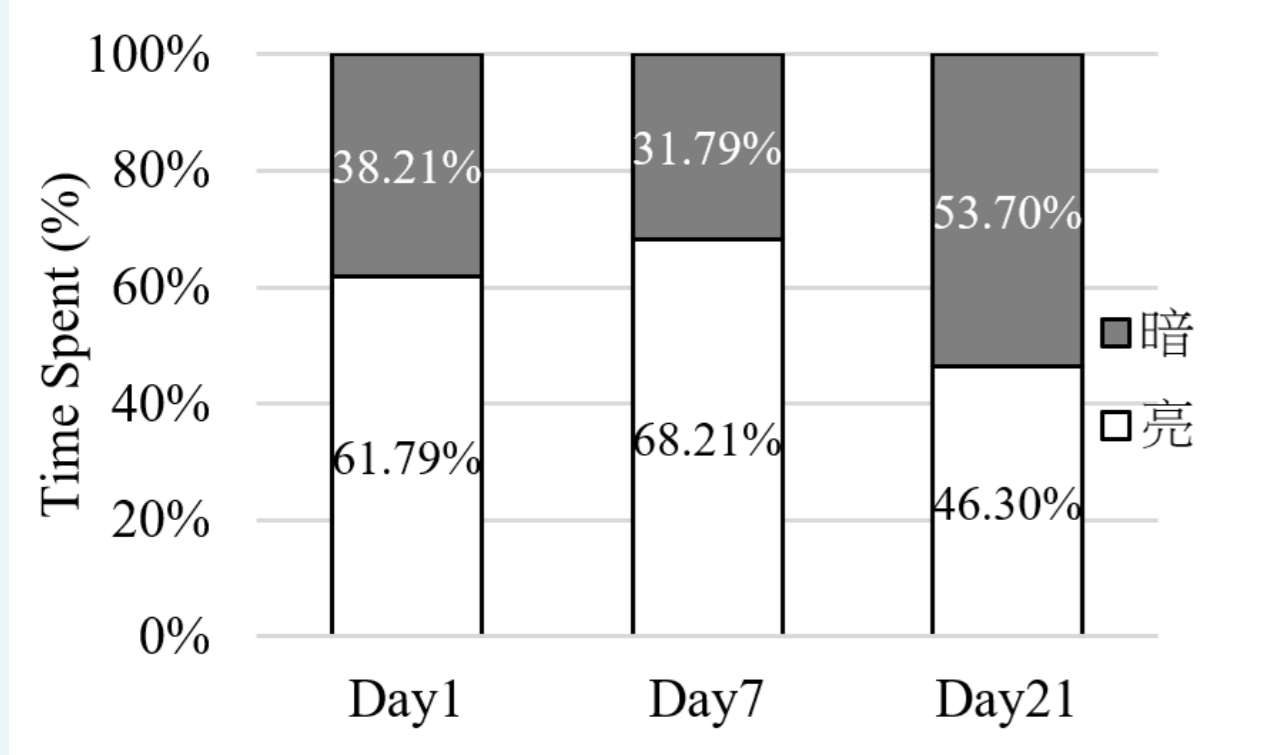
模型訓練成效優良。利用測試集(testing set)進行試驗，模型辨識正確率達94.33%。



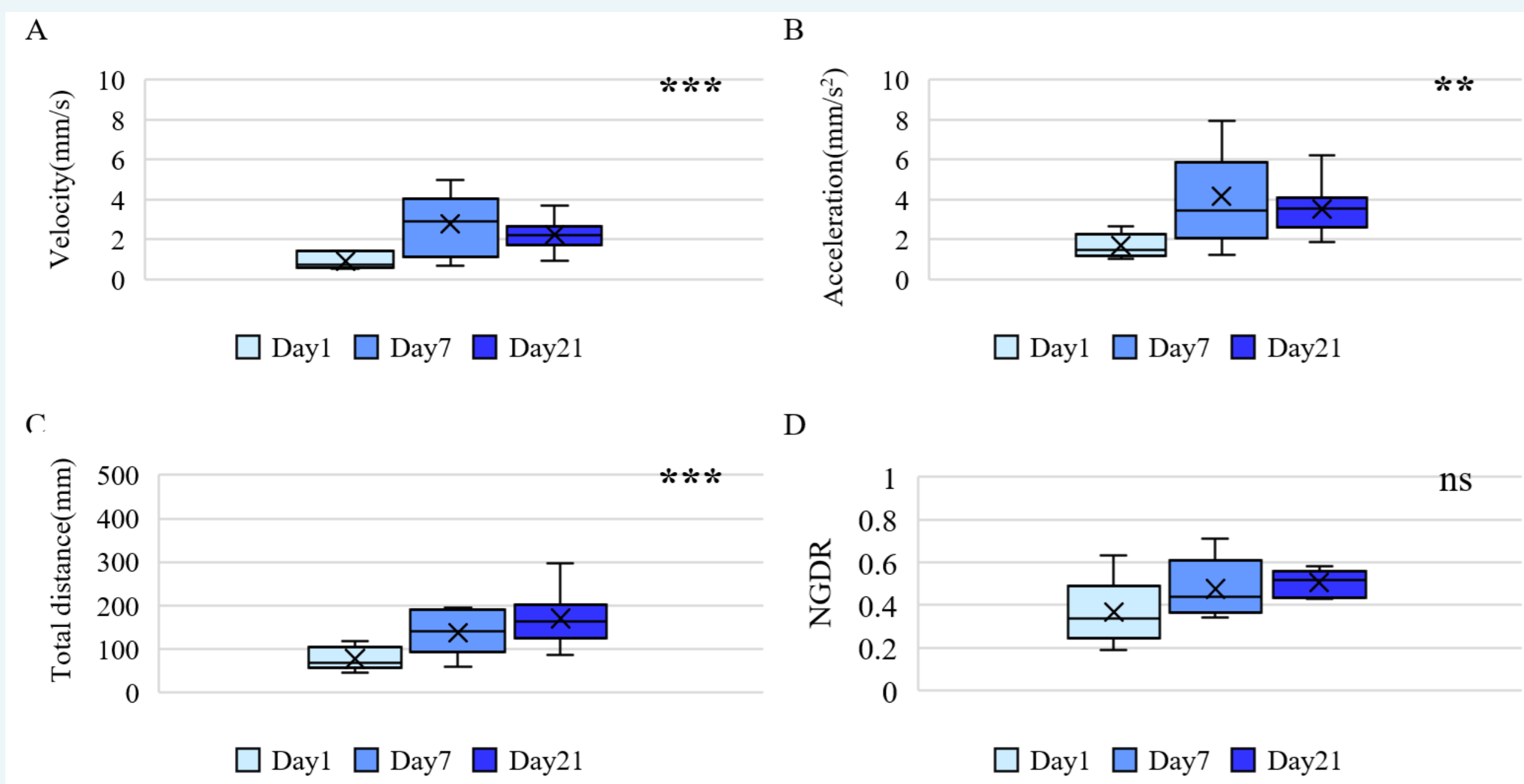
YOLOv8的ByteTrack多目標追蹤演算法能克服Tracker一次僅追蹤單一目標的限制，對於生物研究中運動學分析，此乃實用且高效的新興技術。由自行訓練的水蚤模型成功出繪製水蚤運動軌跡。

研究二、 探討不同條件下水蚤的趨光行為的差異

實驗2-1：水蚤年齡對趨光反應的影響

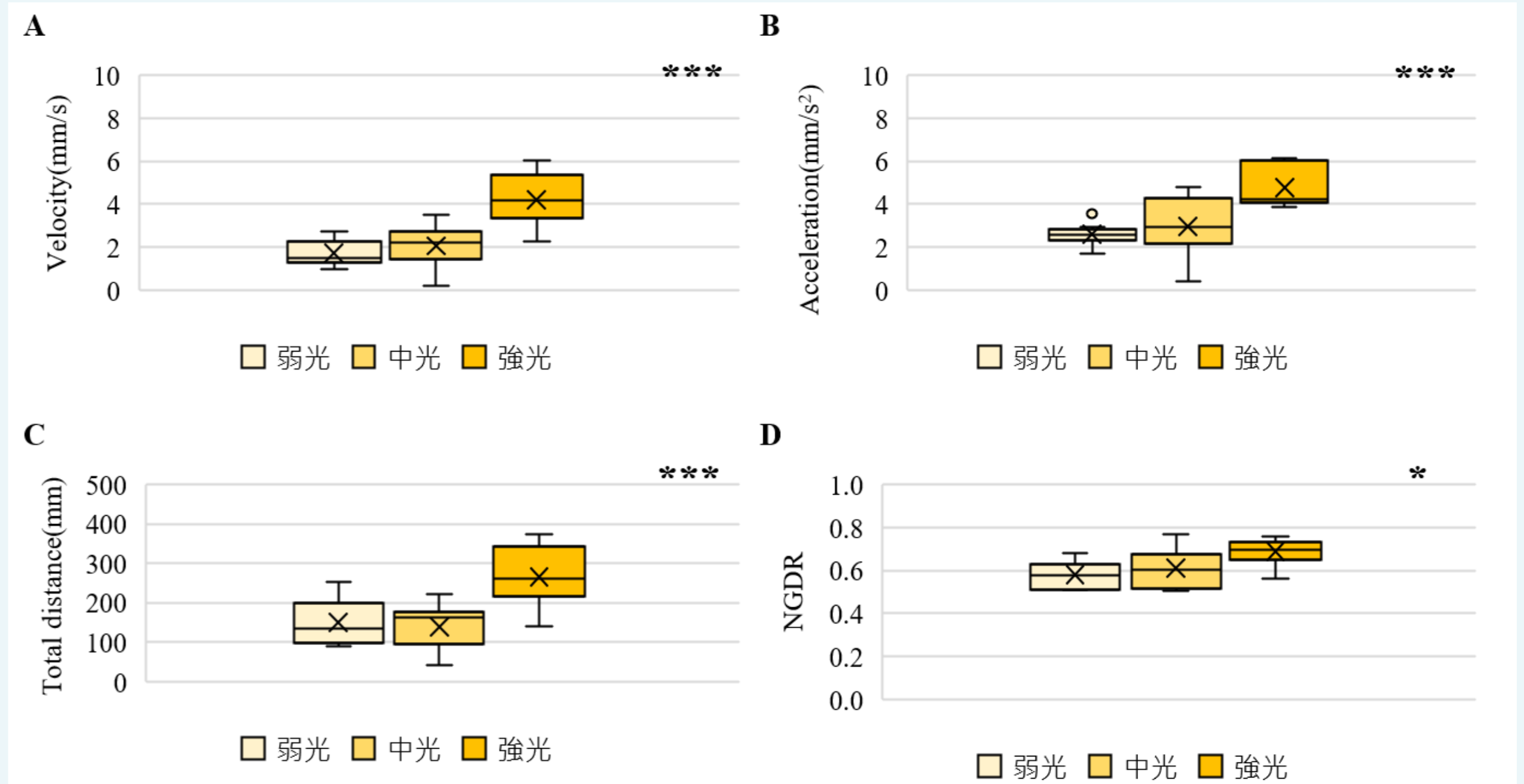
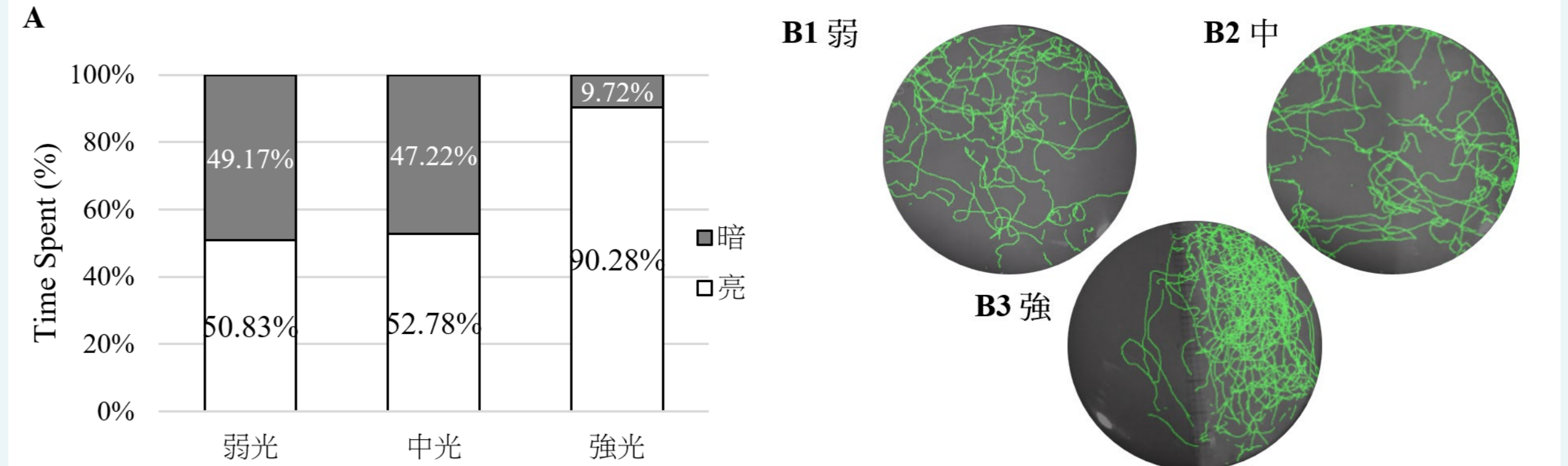


1日齡及7日齡的水蚤皆偏好選擇亮區，21日齡反而沒有明顯的趨光表現，推測年齡層較小的水蚤對光的敏感度較高。



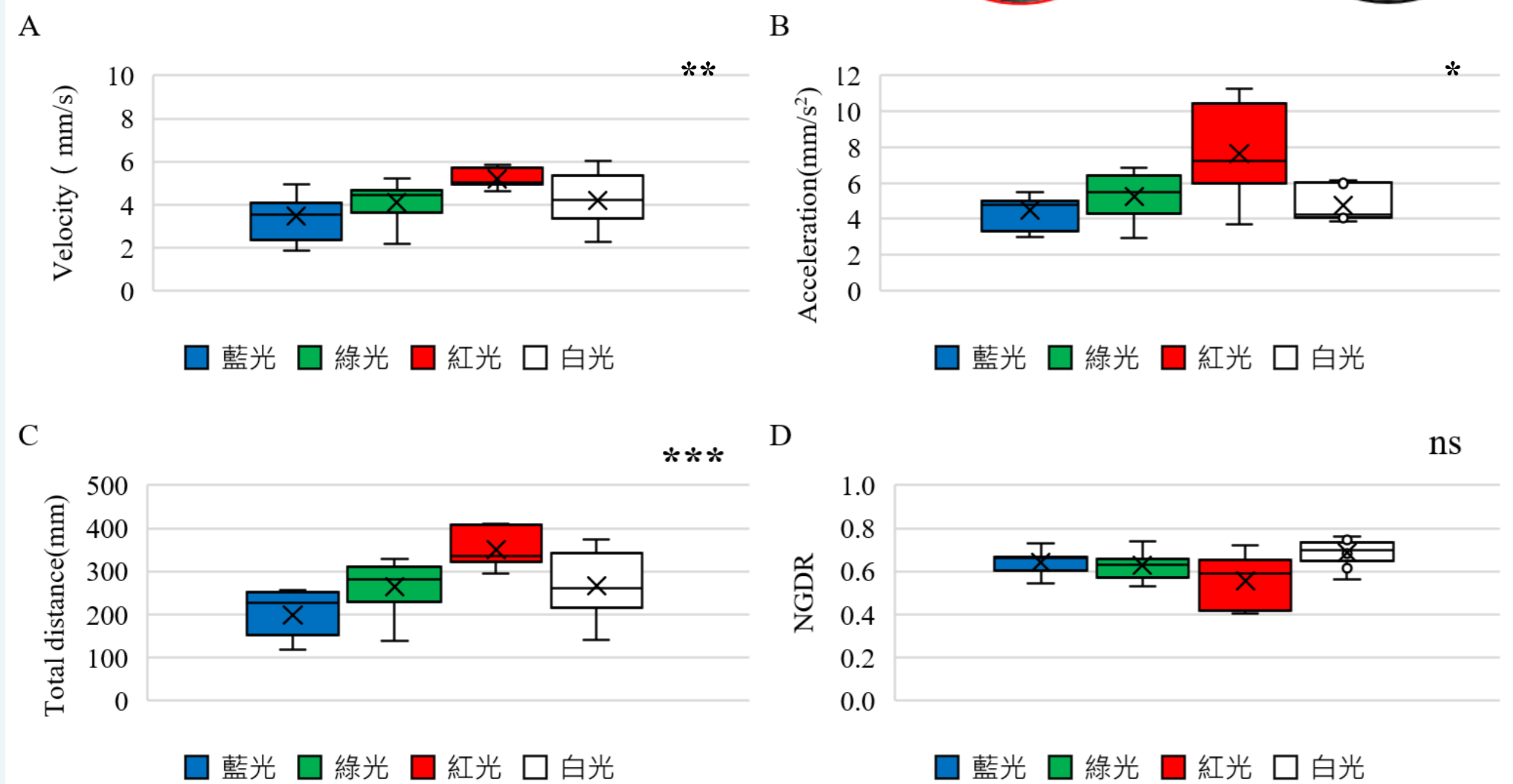
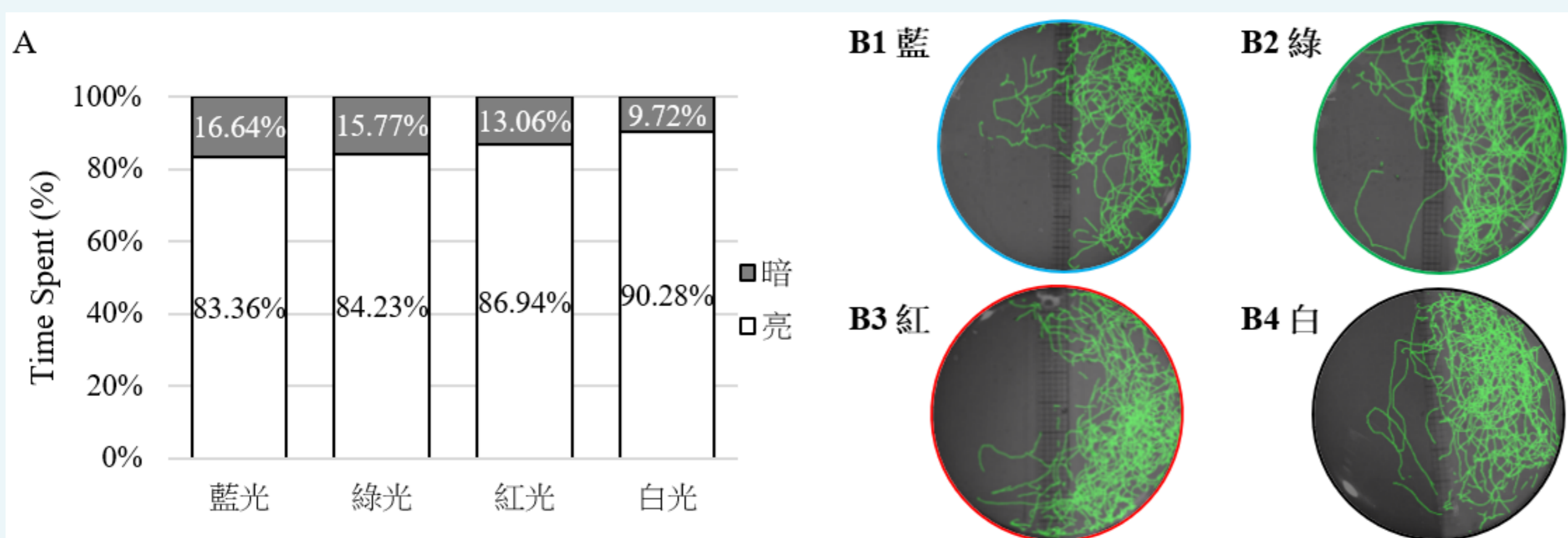
由上圖中可看到，受限於體型，1日齡水蚤的速度及加速度較低。

實驗2-2：不同光照度對水蚤趨光反應的影響



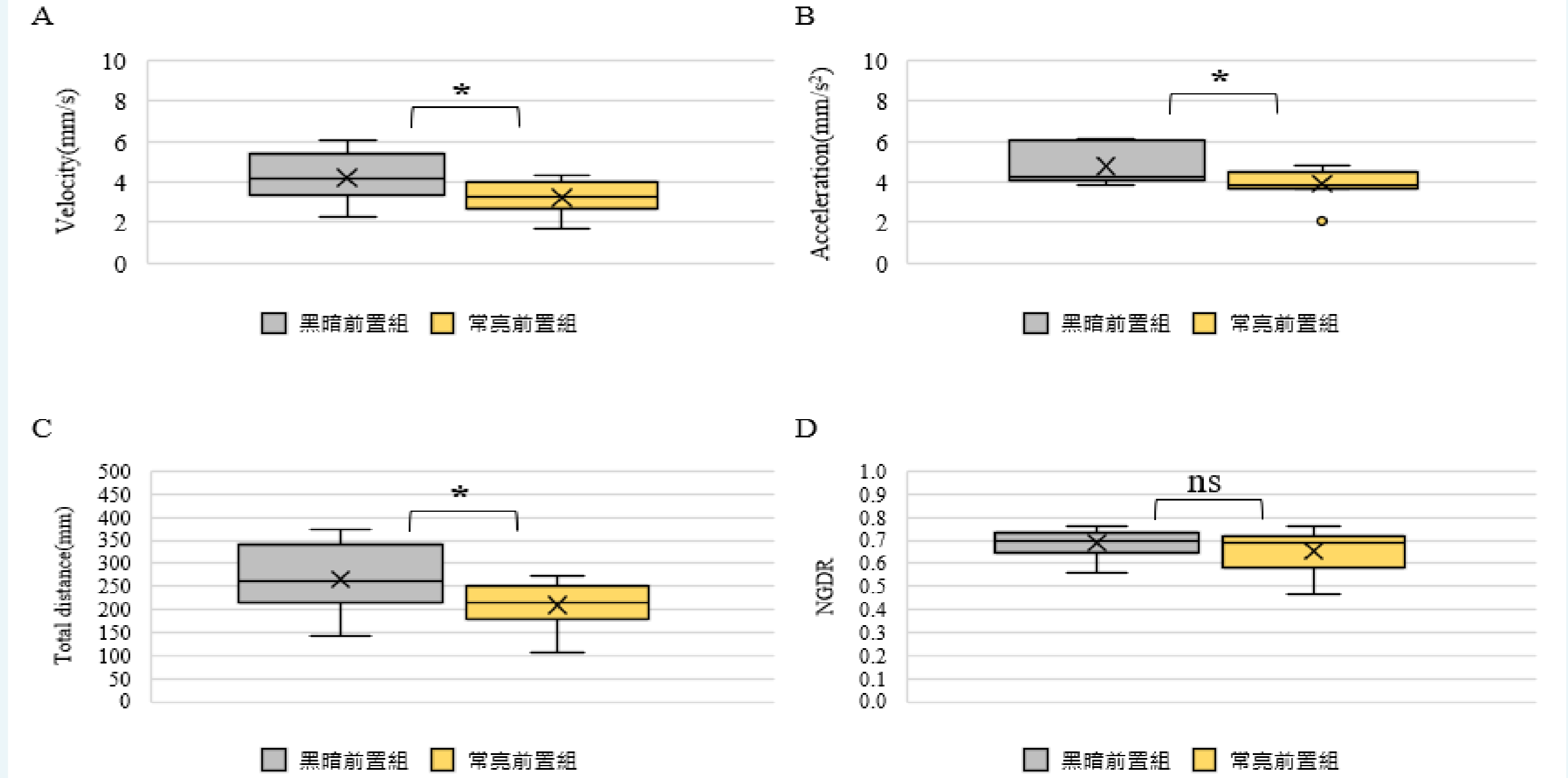
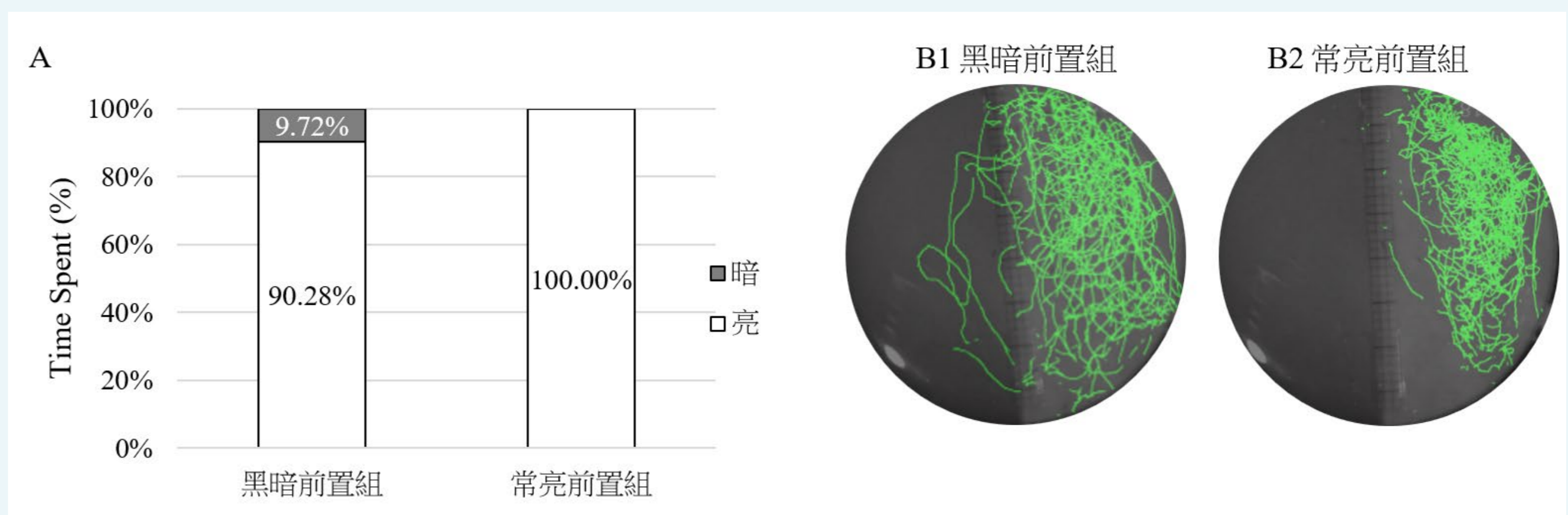
從圖中可以看到，強光下水蚤趨光比例明顯提高，且運動表現上速度、加速度、總位移、NGDR都較高。

實驗2-3：不同光波長對水蚤趨光反應的影響



各種色光均能誘發水蚤趨光反應，但在波長較短的藍光下水蚤速度和加速度較低。

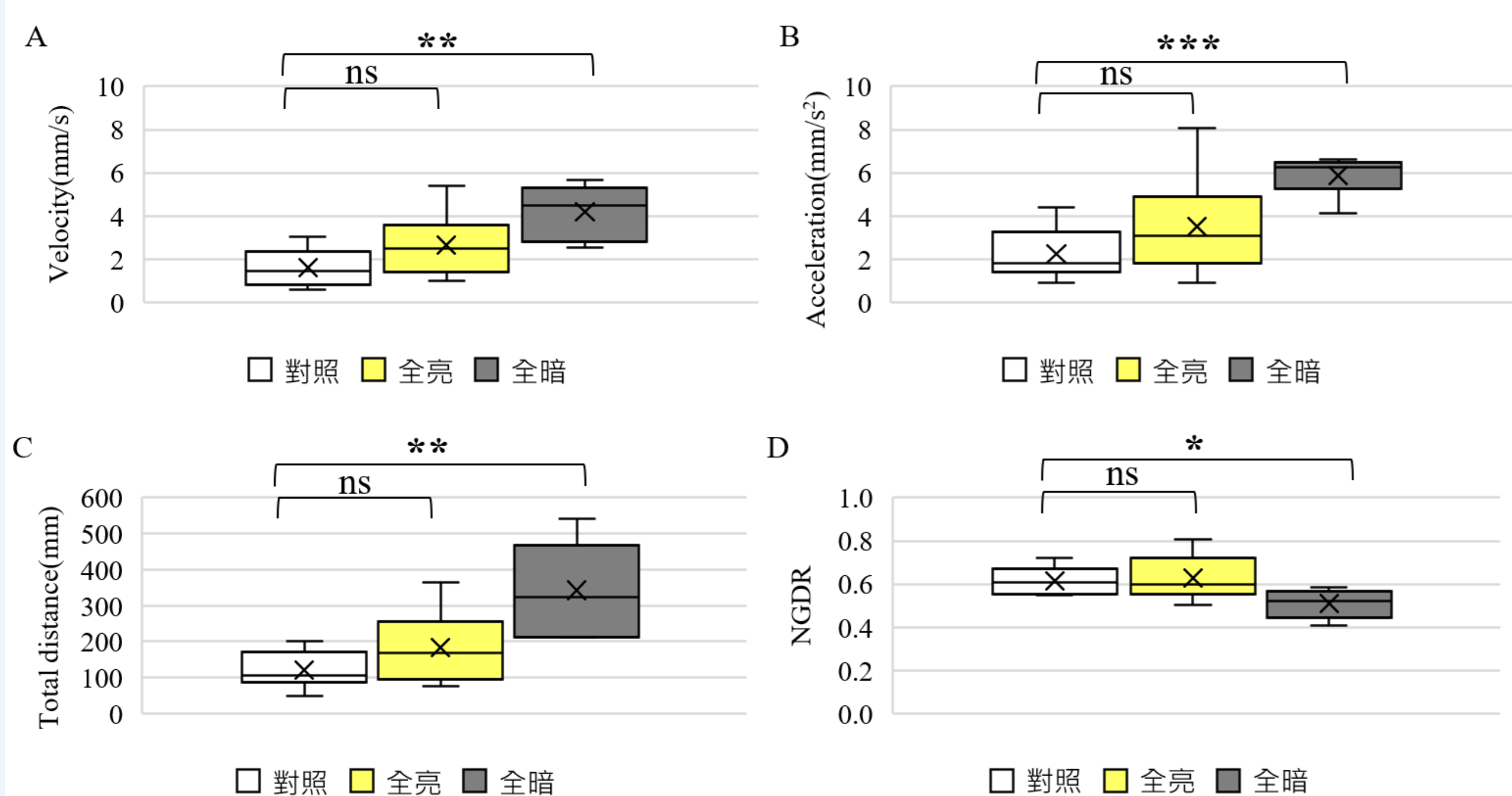
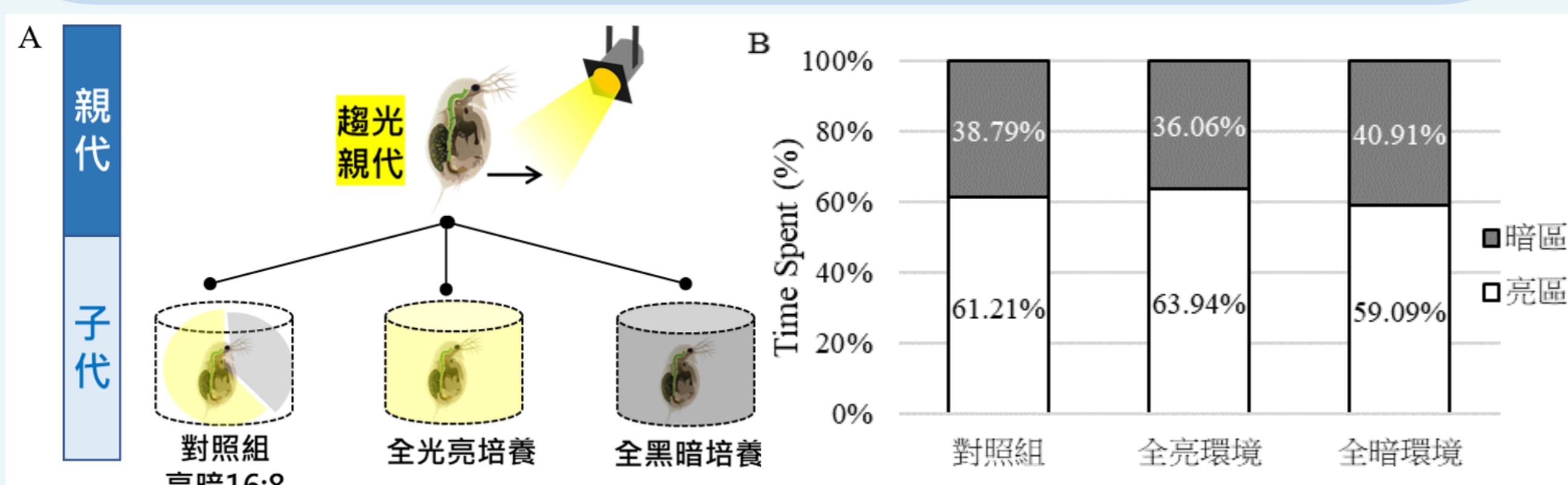
實驗2-4：光照前置對水蚤趨光反應的影響



黑暗前置或常亮前置水蚤均表現對光的偏好，但黑暗前置時，水蚤的趨光運動較積極。

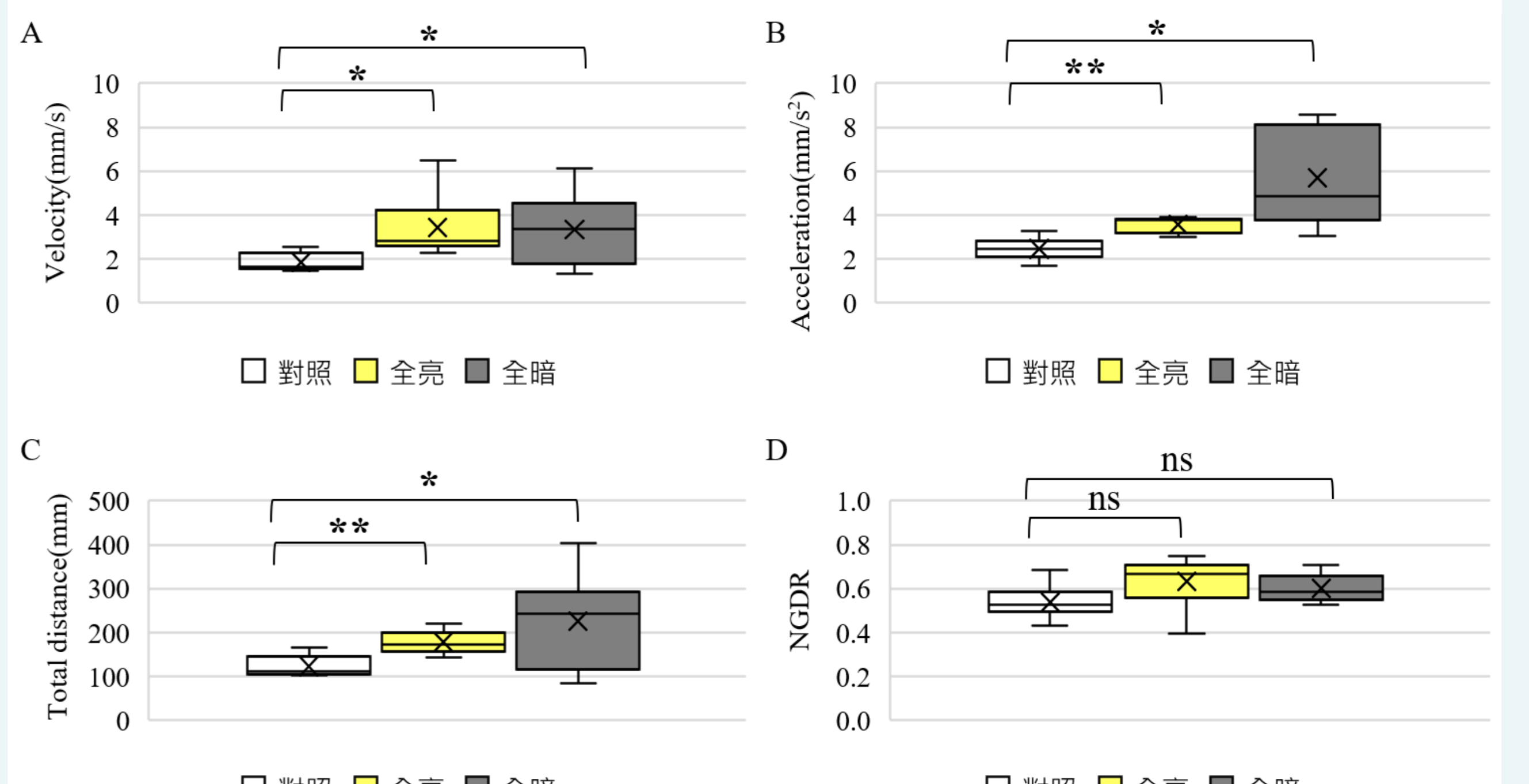
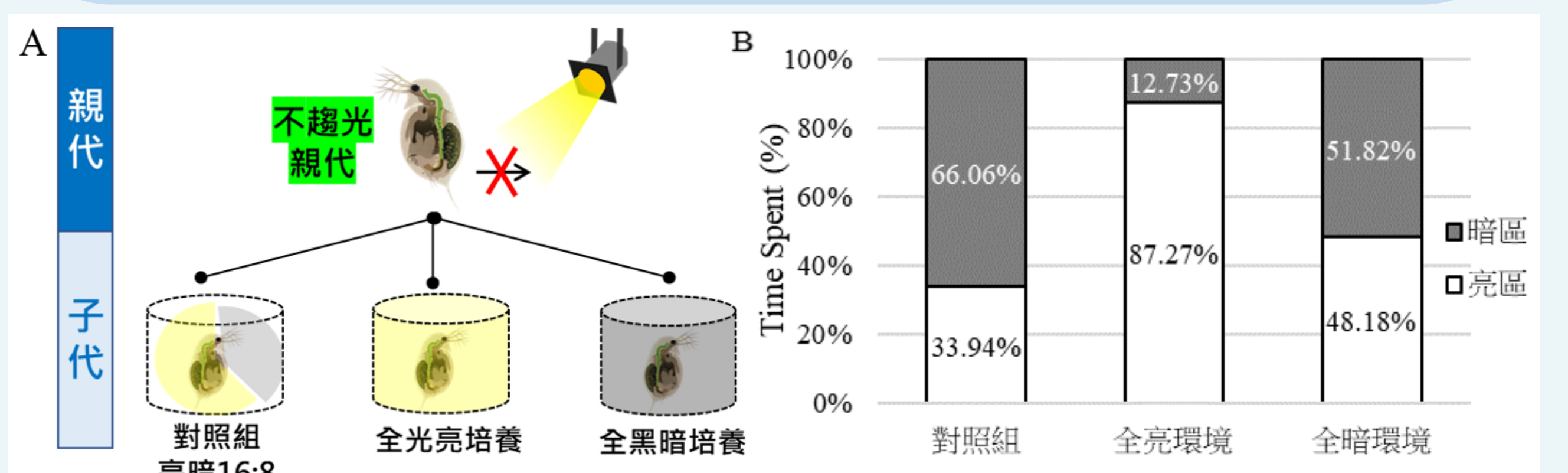
研究三、 驗證水蚤趨光行為是否為遺傳基因控制

實驗3-1：收集有趨光行為的水蚤，其子代具有趨光行為的比例及運動分析



不同組別幼蚤的偏好相近，顯示趨光性具有一定的遺傳性，其中全暗組表現出更活躍且較不直線的運動模式。

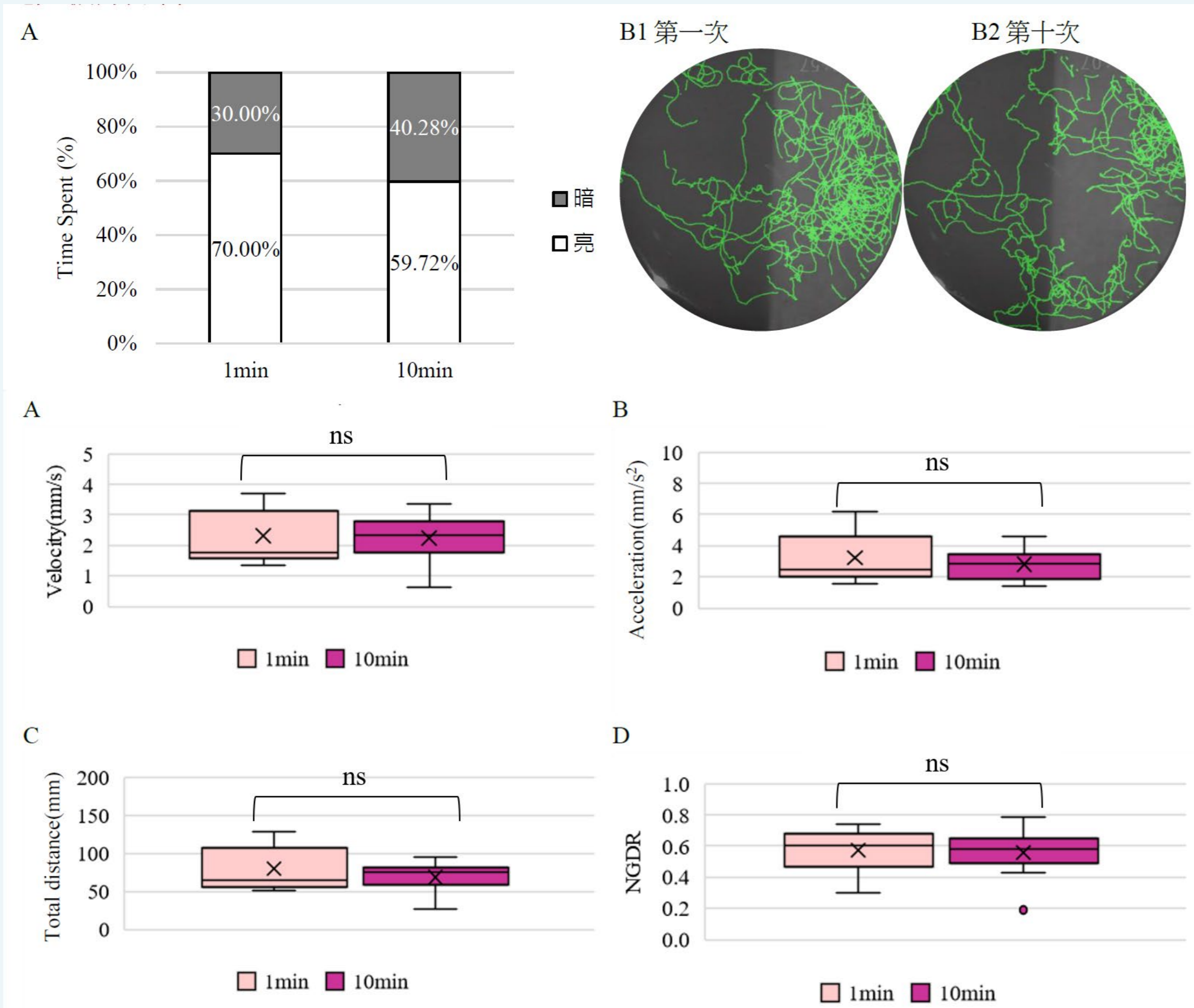
實驗3-2：收集無趨光行為的水蚤，其子代具有趨光行為的比例及運動分析



受遺傳影響，對照組及全暗組的幼蚤無明顯的趨光偏好，全亮組卻表現出趨光性，顯示出後天培養環境的重要性。

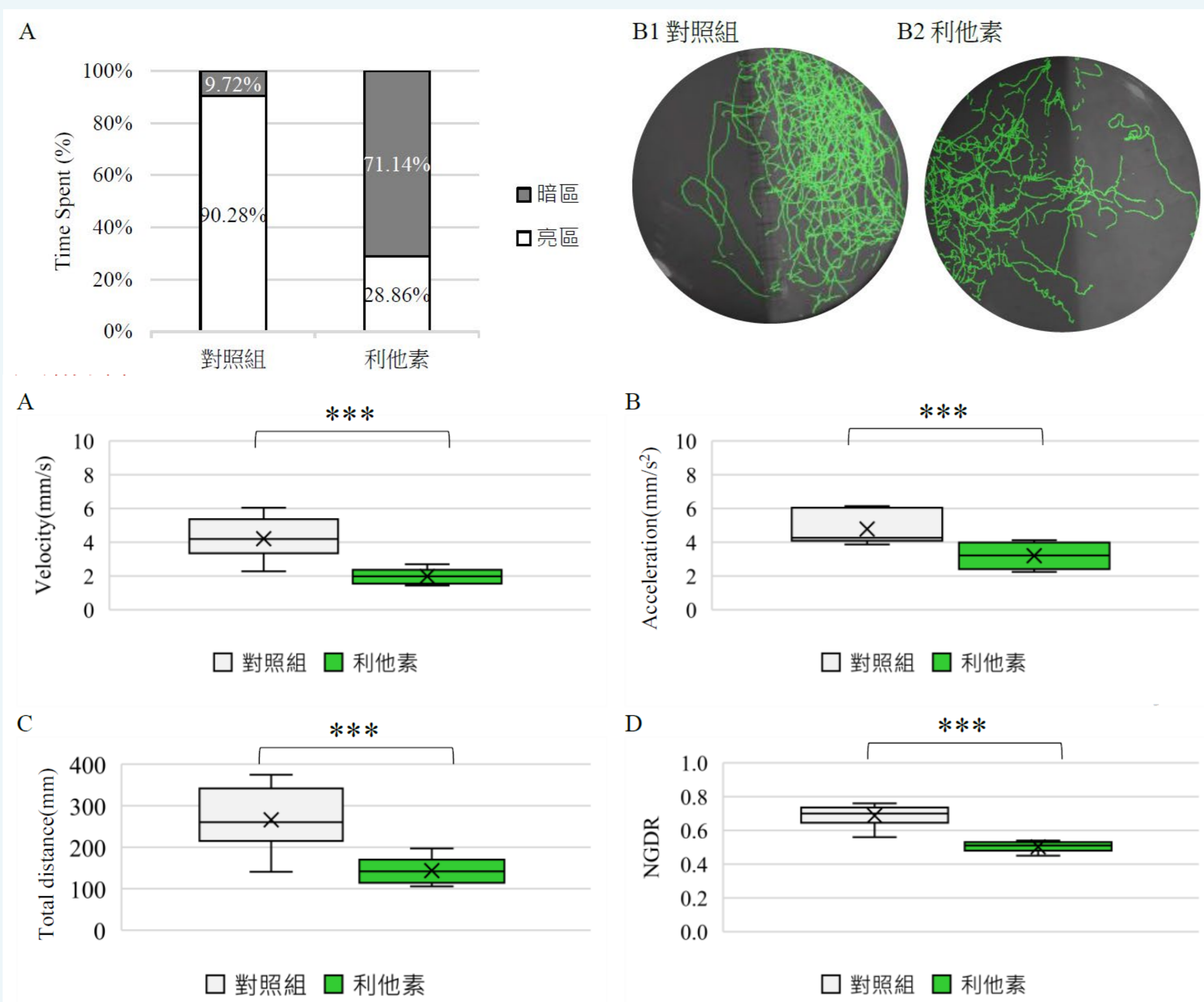
研究四、探討趨光行為是否能因後天逆轉？

實驗4-1：趨光行為是否會疲勞或形成記憶？



由上圖可知，經過反覆刺激，第十次時水蚤停留在亮區的比例微幅下降至59.72%。移動速度及加速度表現上第一次與第十次並無明顯差異。

實驗4-2 在掠食者利他素環境下水蚤的趨光行為

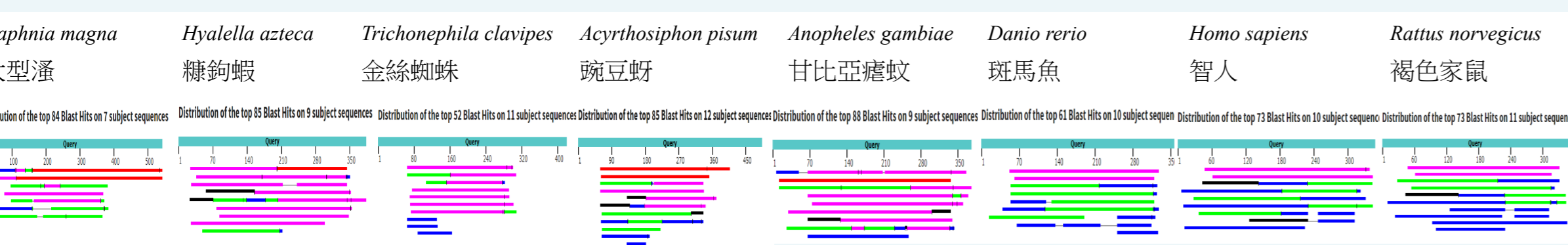


當水蚤處於利他素環境下，明顯轉變偏好在暗區移動，其平均速度、加速度顯著低於對照組。

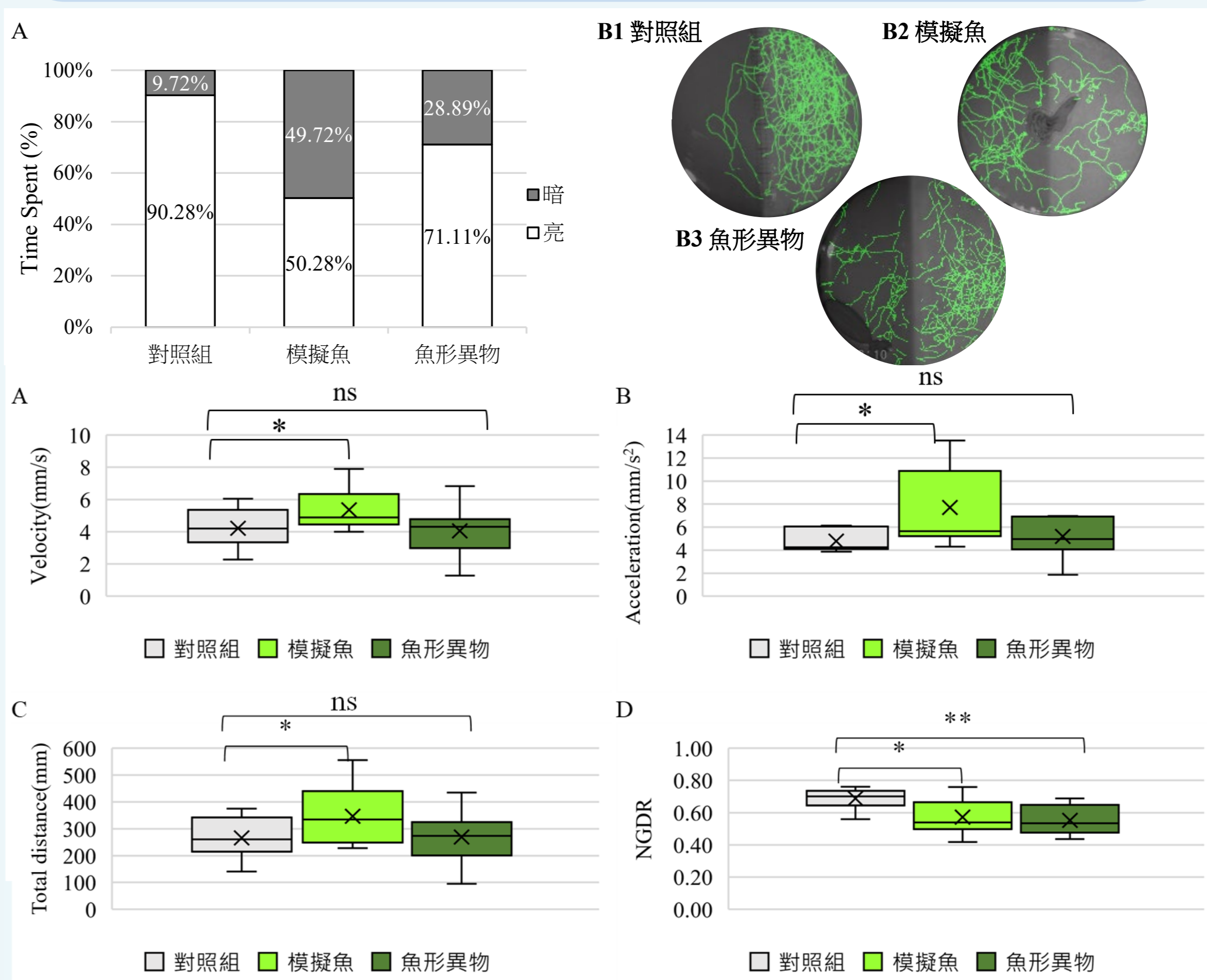
研究六、生物資訊分析水蚤基因體中的感光蛋白序列

實驗6-1 不同物種rhodopsin蛋白序列的相似性分析

查詢的蛋白質序列	胺基酸長度	對應到的序列位置	對應到的長度	Identities	Positives	Gaps	E value
rhodopsin[Daphnia magna] 大型溞	541 aa	D. pulex chromosome9 1762485 to 1763801	466	72%	82%	5%	0
rhodopsin [Hyalella azteca] 糠鈎蝦	381 aa	D. pulex chromosome2 7970800 to 7971963	388	35%	51%	18%	1e-60
rhodopsin [Trichonephila clavipes] 金絲蜘蛛	418 aa	D. pulex chromosome9 4707749 to 4708483	245	39%	64%	9%	3e-55
rhodopsin [Acyrtosiphon pisum] 豌豆野	492 aa	D. pulex chromosome9 1755684 to 1756709	360	40%	59%	9%	8e-76
rhodopsin [Anopheles gambiae] 甘比亞瘧蚊	374 aa	D. pulex chromosome6 2930407 to 2930766	120	52%	70%	2%	9e-59
rhodopsin [Danio rerio] 斑馬魚	354 aa	D. pulex chromosome9 1762476 to 1763324	287	30%	51%	5%	1e-32
rhodopsin [Homo sapiens] 智人	348 aa	D. pulex chromosome9 1762461 to 1763342	298	28%	51%	6%	4e-32
rhodopsin [Rattus norvegicus] 褐色家鼠	348 aa	D. pulex chromosome9 1762461 to 1763342	298	28%	50%	6%	8e-32



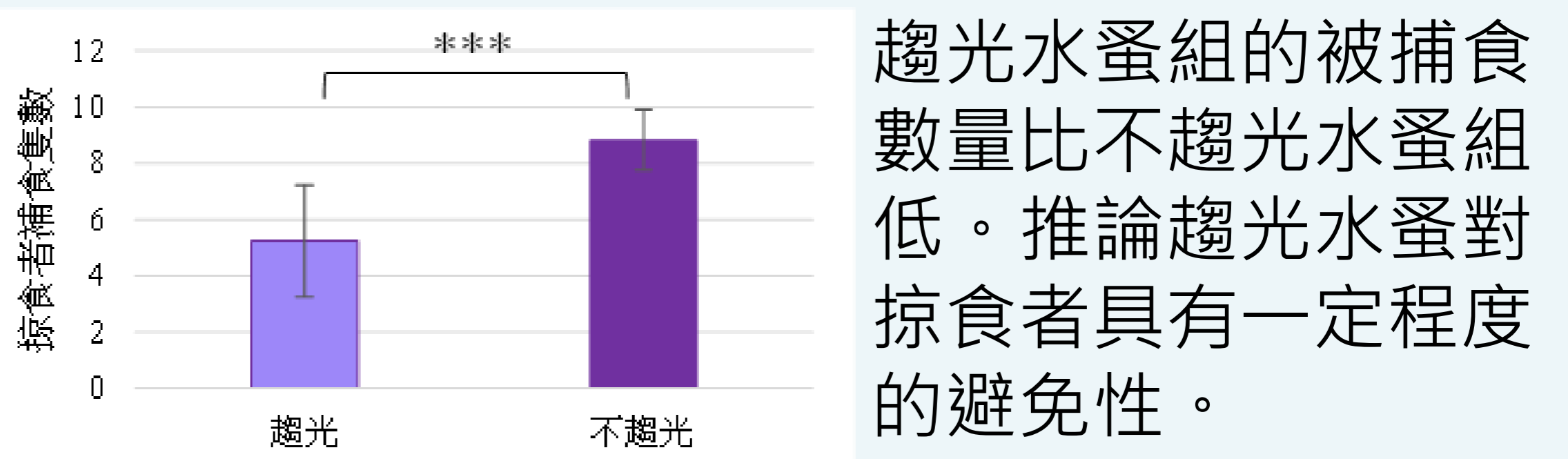
實驗4-3 模擬掠食者進入環境下水蚤的趨光行為



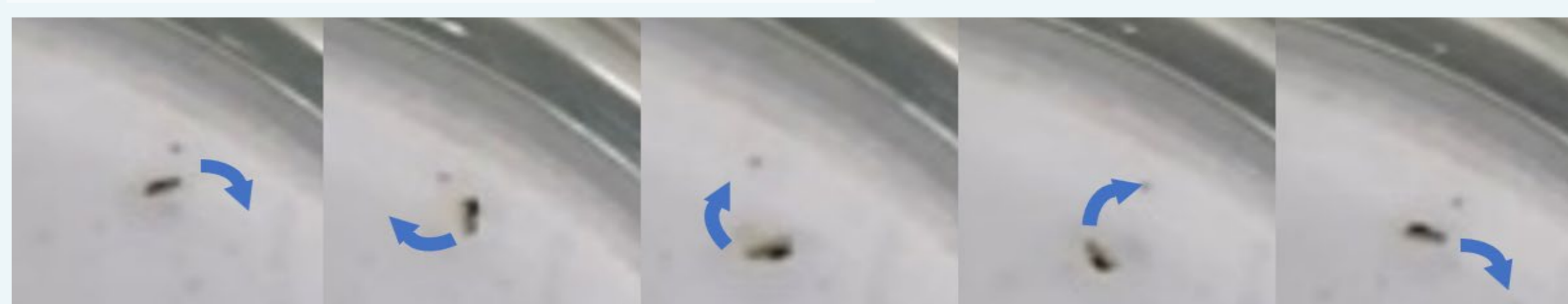
在模擬魚環境下水蚤的停留亮區時間明顯減少，趨光行為受到抑制；速度及加速度均高於對照組，運動軌跡曲折，以儘快遠離潛在的掠食者。

研究五、掠食者對趨光及不趨光水蚤捕食

實驗5-1 比較掠食者對趨光及不趨光水蚤的捕獲時間



趨光水蚤組的被捕食數量比不趨光水蚤組低。推論趨光水蚤對掠食者具有一定程度的避免性。

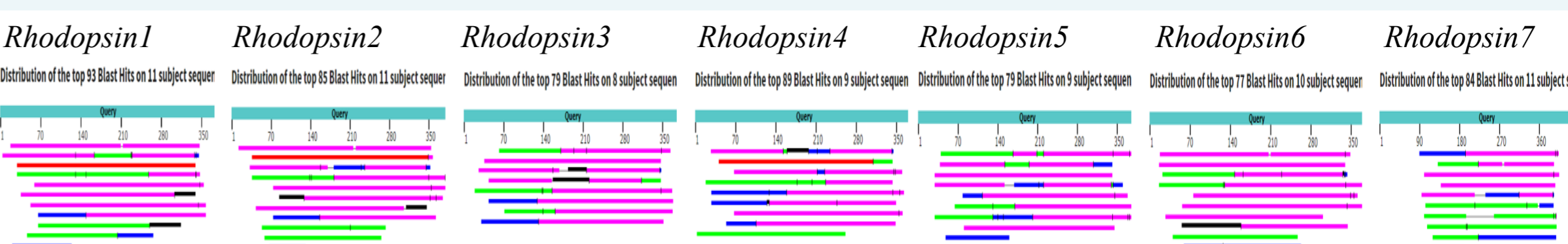


實驗5-1發現水蚤在有掠食者的環境下出現持續規律繞圈的特殊行為，繞圈運動的角速率為90°/s，平均速度10.1mm/s，加速度75.6mm/s²，NGDR值僅0.27，繞行半徑小，是一種特殊的運動模式。



實驗6-2 果蠅rhodopsin1~7與水蚤基因體的比對分析

果蠅感光蛋白	最大吸收波長	胺基酸長度	對應到的序列位置	對應到的長度	Identities	Positives	Gaps	E value
Rhodopsin1	綠藍光 480 nm	373 aa	D. pulex chromosome 6 2915479 to 2915880	134	51%	65%	1%	3e-61
Rhodopsin2	藍紫光 420 nm	381 aa	D. pulex chromosome 6 2930407 to 2930772	122	54%	70%	1%	4e-64
Rhodopsin3	紫外光 345 nm	383 aa	D. pulex chromosome 2 7980210 to 7981352	381	31%	47%	18%	9e-49
Rhodopsin4	紫外光 375 nm	378 aa	D. pulex chromosome 3 7127709 to 7128137	144	54%	76%	0%	3e-77
Rhodopsin5	藍光 442 nm	382 aa	D. pulex chromosome 6 2915494 to 2916015	174	39%	55%	12%	1e-55
Rhodopsin6	綠光 508 nm	369 aa	D. pulex chromosome 6 2920723 to 2921508	262	33%	47%	28%	3e-61
Rhodopsin7	藍光 紫外光	483 aa	D. pulex chromosome 9 4707743 to 4708489	252	36%	53%	15%	2e-38



柒、結論與未來展望

【結論】

1. 水蚤的體型在前三週成長幅度大，之後體長保持穩定。
2. 全亮或全暗環境中，日齡越大的水蚤移動速度和加速度都較大。
3. 利用YOLOv8訓練自定義資料集，模型辨識正確率高，約為94.33%。
4. 1日齡及7日齡的水蚤趨光比例較21日齡高。
5. 強光下水蚤趨光明顯，且表現出更快的移動速度、加速度。
6. 水蚤的趨光習性受遺傳所控制，幼蚤後天培養環境亦能改變其偏好。
7. 在利他素環境的水蚤趨光性改變，偏好選擇暗區，速度、加速度明顯下降，軌跡較曲折。有模擬掠食者環境下，水蚤對光的偏好亦降低。
8. 不趨光水蚤被魚捕食的機率較趨光水蚤高。

【未來展望】

1. 探討不同發育段水蚤感光受器與神經系統的結構和功能變化。
2. 探討不同環境污染物對水蚤趨光行為和生態適應性的影響。
3. 探討水蚤趨光行為是否影響他種生物對棲息地的利用和競爭。