

台灣二〇〇五年國際科學展覽會

科 別：動物學

作品名稱：蟋蟀的聲音分析與聲音行爲探討

得獎獎項：大會獎第一名

美國正選代表:參加美國第 56 屆國際科技展覽會

學 校：臺北市立建國高級中學

作 者：吳哲榕

評語與建議事項：

- 1.能發現分辨蟋蟀親源關係的新穎方法，並進行深入的行爲與基因序列之探討。
- 2.文字、圖表及口語解說清晰。
- 3.建議加入其他品系蟋蟀特性及物種遷移相關性之探討。
- 4.生殖行爲模式，以主要三科感覺爲依據，爲影響生殖行爲之因子，內外分泌等因子也被重要因素，宜納入說明。

中文摘要

蟋蟀聲音與行為的關係密不可分。取北部四種蟋蟀樣本，以數位錄音筆錄製及電腦軟體分析蟋蟀的聲音，並用 PCR 技術萃取蟋蟀的粒線體 DNA(16S)加以分析，藉此和傳統的形態學分類相互比較。結果發現蟋蟀聲音的頻率特性中主頻率的差異在親緣遠近有關聯性，但聲音的時間特性方面則沒有特定關聯，不過聲學分析圖仍可作為單一種的鑑定指標。此外，研究發現此 4 種蟋蟀的聲音頻率範圍有重疊現象，但主頻率、脈衝比、唧聲率及唧聲長不同，推測雌蟋蟀應是綜合這些特性辨別同種。另一方面，以黑蟋蟀作為研究對象，進行干擾實驗，觀察並繪製出其聲音行為模式；並將此作為對照，結果發現蟋蟀的生殖行為主要受到雄蟋蟀的聲音支配，而雄蟋蟀則以嗅覺辨別雌蟋蟀位置，決定下一步行動，與視覺較無關係。

English summary

Cricket's voice is closely related to the behavior. We select four species of crickets from the northern Taiwan to study the acoustic and mating behaviors. The digital sound recorder and acoustic software are used to analyze their acoustic characters. Furthermore, the PCR technology is used to amplify and sequence parts of mtDNA sequences and the results were compiled as the comparison to the traditional morphological character. The result shows that the resolution in acoustic characters of main frequency, pulse number, chirp rate, and the length of chirp are different among four species, though the minor frequency pattern is overlapping. Moreover, we find that frequency characteristic difference among four species is partly related to their phylogenetic relationship, yet is not seen in time characteristic. It is obvious that difference of acoustic behavior can be regarded as identified index among species. Results of acoustic analysis impel us to infer that the female crickets take the comprehensive acoustic behavior to distinguish their specific male. In addition, behavior pattern and model of *Gryllus bimaculatus* are established as the comparison of interfering experiment is undertaken. Which results suggest that the mating behavior in cricket is dominated by males' acoustic behavior, and is initiated by male's olfactory sense rather than that of sight.

壹、前言

一、蟋蟀簡介

蟋蟀在生物分類學上屬於動物界、節肢動物門的昆蟲綱直翅目螞蟥亞目蟋蟀總科。全世界已知的蟋蟀種類估計約有 3,000 種，臺灣地區約有 80 多種，其中又以地棲蟋蟀較為人所熟知。臺灣的地棲蟋蟀，已知有蟋蟀科 36 種，地蟋科 2 屬 11 種，毛翅蟋科 5 種及蟻蟋科 1 種，共計 53 種。本土蟋蟀的研究方面，台灣大蟋蟀(*Brachytrupes portentosus*)、黃斑黑蟋蟀(*Gryllus bimaculatus*)、白緣眉紋蟋蟀(*Teleogryllus mitratus*)、烏頭眉紋蟋蟀(*Teleogryllus occipitalis*)等，皆有形態學及聲學的研究(楊,1993)。

二、蟋蟀的聲音行爲

蟋蟀等直翅目昆蟲自二疊紀起便靠聲音溝通，聲音行爲即是指以聲音為溝通訊號的行爲，聲音成為現代分類學之重要特徵。雄蟋蟀羽化成熟時會將前翅豎起，由左翅後緣增厚的彈器來刮右翅下方齒狀突起的弦器，當前翅一張一合之際發出聲音。一般來說，蟋蟀發聲的曲目可分為：呼喚聲音(calling sound)、求偶聲音(courtship sound)、求偶中斷聲音(courtship interruption sound)、交尾後聲音(post-copulatory sound)、攻擊性聲音(aggressive sound)及辨識聲音(recognition sound)，一般研究多著重在呼喚聲音，生物學家 Fulton 曾強調呼喚聲音是共域種間生殖隔離作用的重要機制(楊,1999)。

野外蟋蟀是輪流鳴叫的，而雌蟋蟀會被其中最強的唧聲吸引，但她只對會同種的聲音有反應。她們能分辨出聲音訊號中極細微的差異，甚至能辨別出雜交種間聲音的不同。科學家相信其腦部的神經細胞具有模式產生器(pattern generator)，且受到遺傳影響，使她們能精準擇偶(Hart,1999)。

此外，雄蟲前翅的翅基有杯狀突起，稱為漢考克氏腺，會分泌費洛蒙。科學家相信，在雄蟲振動前翅鳴叫的同時，也在周圍散出費洛蒙(矢島稔,1999)。

三、聲學特徵分析

聲學描述的方式，較為詳盡且明確的為同時呈現頻譜圖、波形圖及聲紋圖三種。而描述聲學特徵的術語包括

- 1、時間特性：唧聲(chirp)：由數個脈衝(pulse)組成的一段聲音，兩個脈衝間為脈衝間隔(pulse interval)在兩個唧聲間為唧聲間隔(chirp interval)，而唧聲長度稱為唧聲長(chirp length)，一段時間內唧聲出現的次數則稱為唧聲率(chirp rate)。
- 2、頻率特性：主頻率(main frequency)為頻譜中能量最強之處，該處最大頻率範圍為主頻寬(main frequency range)(楊,1999)。

一般的文獻多半限於呼喚叫聲，未提及其他叫聲，而在行爲模式中描述求偶特性，卻未見求偶聲音的描述。文獻證實蟋蟀會對特定頻率的聲音產生反應，但此實驗僅限於單一頻率的單音，未有針對脈衝及唧聲等其他聲學上的探討(Faulkes and Pollack, 2001)。

綜合以上各點，蟋蟀的聲音接收與頻率或節奏有關，然而在同一個區域生活的共域種，如：白緣眉紋蟋蟀及烏頭眉紋蟋蟀，其聲音頻率範圍也有重疊處，其聲音差異或許與頻峰、脈衝比、唧聲長、唧聲間隔不同有關，於是想就此點設計實驗驗證。利用數位化的錄放音裝置，其不論在體積、錄音品質及聲音修改方面，都比傳統的錄音設備精密

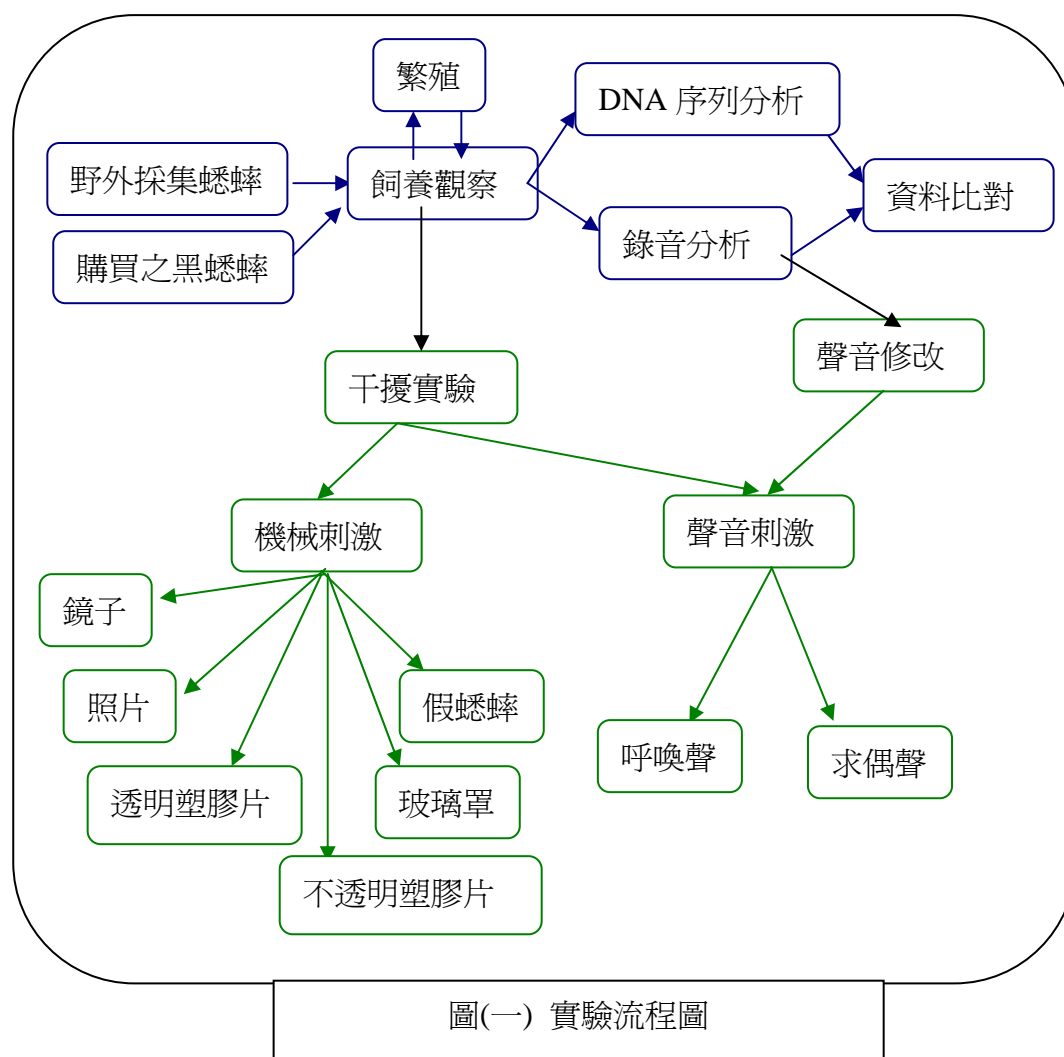
許多，使我們得以簡單的方式錄製並分析蟋蟀的聲音，希望能辨別不同種蟋蟀與其聲紋及頻譜的異同，並將傳統的形態學分類及 DNA 序列分析比較，建立蟋蟀的聲紋分類檢索表。

此外，關於一般研究並未把聲音及行為做整合探討，希望藉由此實驗了解彼此間的關聯，希望能用新科技對蟋蟀的整套生殖行為做較完整的描述，建立蟋蟀交配的行為模式，並以機械干擾及修改聲音等方式，進一步了解蟋蟀的生殖行為及聲音的意義。

四、 研究目的

- 1、 辨別不同種蟋蟀與其聲紋及頻譜的異同，以便未來建立蟋蟀的聲學分類檢索表。
- 2、 在原有蟋蟀系統分類基礎上，提供 DNA 序列分析結果，作為輔助分類特徵。
- 3、 探討蟋蟀的生殖行為主要受何種感官影響。
- 4、 探討雌蟋蟀受其他聲音干擾之反應。

貳、 研究方法



一、研究設備與器材

1、活體材料

- (1) 黃斑黑蟋蟀 (*Gryllus bimaculatus* De Geer,1773)
- (2) 白緣眉紋蟋蟀 (*Teleogryllus mitratus* Burmeister,1838)
- (3) 烏頭眉紋蟋蟀 (*Teleogryllus occipitalis* Serville,1839)
- (4) 小扁頭蟋蟀 (*Loxoblemmus equestris* Saussure,1877)

2、飼養觀察器材

- (1) 塑膠罐(直徑 9.6 cm、高 12.1 cm)
- (2) 塑膠瓶(直徑 1.28 cm、高 4.3 cm)
- (3) 河沙
- (4) 高麗菜、狗飼料(寶路幼犬飼料)
- (5) 棉花、鑷子、酒精
- (6) 塑膠飼養觀察箱、水缸、加熱墊。
- (7) 錄音筆(Cenix VR—P280, SAMSUNG BR-1640, SAFA SR-M292F)
- (8) 數位相機(Sony DSC—V1)
- (9) 電腦、聲音處理軟體 Cool Edit2000(於 Toget 下載試用版)、印表機

3、核酸序列分析實驗儀器

- (1) Pipetteman (Gilson)
- (2) 電泳槽(Mupid-2)
- (3) 離心機(Sigma-2K15)
- (4) 循環定溫箱(GeneAmp 2700)
- (5) 紫外線照相設備(MuitilMage)
- (6) 其他實驗室必備物品

4、干擾實驗器材

- (1) 鏡子
- (2) 照片
- (3) 透明塑膠片
- (4) 不透明塑膠片
- (5) 玻璃罩
- (6) 塑膠蟋蟀假體。

5、溶液配方

- (1) 膠片：2% agarose、0.5%TAE buffer
- (2) Working solution：0.5%TAE buffer



圖(二) 若蟲飼養裝置



圖(三) 成蟲飼養裝置



圖(四) 若蟲飼養箱



圖(五) 保溫裝置



圖(六) 實驗用觀察箱

二、 蟋蟀的取得與飼養

1、 蟋蟀來源

購買水族館飼養之餵魚用黑蟋蟀。野外採集烏頭眉紋蟋蟀(台北新莊近郊、花蓮、高雄)、白緣眉紋蟋蟀(台北新莊近郊、花蓮、高雄)、小扁頭蟋蟀(台北新莊近郊、中和近郊、墾丁)

2、 飼養器材

塑膠罐(直徑 9.6 cm、高 12.1 cm)、塑膠瓶(直徑 1.28 cm、高 4.3 cm)、河沙、高麗菜、狗飼料(寶路幼犬飼料)、棉花、鑷子、酒精、塑膠飼養觀察箱、水缸、加熱墊。

3、 蟋蟀飼養

將若蟲群體飼養於水缸及飼養觀察箱內，以寶特瓶蓋及棉花餵水，幼犬飼料 餵食。有翅芽之老熟若蟲，移至直徑 9.6 cm、高 12.1 cm之塑膠罐單獨飼養，罐底鋪細沙、以小塑膠瓶裝水供水，餵食幼犬飼料。以自製加熱墊將溫度控制在 20°C~30°C 間。

三、 錄音與分析

1、 呼喚聲音

- (1) 隔絕週遭雜音。
- (2) 在成熟雄蟲養殖罐內懸掛麥克風，離罐底 8 公分左右，以避免錄音受阻。
- (3) 待蟋蟀發出呼喚叫聲時，開始錄音。
- (4) 將錄好之聲音以電腦程式剪裁修改並記錄。

2、 攻擊聲音

- (1) 隔絕週遭雜音。
- (2) 取二成熟雄蟲，放置在同一養殖罐內，中懸掛麥克風，離罐底 8 公分左右以避免聲音受阻。
- (3) 待其互相發出攻擊警戒聲時，開始錄音。
- (4) 將錄好之聲音以電腦程式剪裁修改並記錄。

3、交配聲音 (含求偶、交配中斷、交配結束等)

- (1) 隔絕週遭雜音。
- (2) 取成熟雄、雌蟲，放置在同一養殖罐內，中懸掛麥克風，離罐底 8 公分左右，在其進行交配時錄音。
- (3) 待其互相發出交配叫聲時，開始錄音。
- (4) 將錄好之聲音以電腦程式剪裁修改並記錄。

四、 核酸序列分析實驗

1、蟋蟀 DNA 的萃取 (使用 Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega)

- (1) 拔取蟋蟀樣本中足，放到研磨器中。
- (2) 加入 120 μ l 0.5M EDTA 及 500 μ l Nuclei Lysis。
- (3) 將中足磨碎。
- (4) 將樣本倒入離心管中。
- (5) 加入 17.5 μ l Proteinase K.混和均勻。
- (6) 於 55°C 下水浴 12 小時。
- (7) 加入 3 μ l RNase 於樣本中，上下翻轉 2~5 次。
- (8) 於 37°C 下水浴 30 分鐘。
- (9) 於冰上靜置 5 分鐘。
- (10) 加入 200 μ l Protein Precipitation，震動 20 秒。
- (11) 於冰上靜置 5 分鐘。
- (12) 以 ≥ 13000 rpm 速率離心 4 分鐘。
- (13) 取新的離心管，加入 600 μ l 的 isopropanal
- (14) 用 pipette 取樣本上清液 600 μ l 至新的離心管中。
- (15) 上下倒轉數次。
- (16) 以 ≥ 13000 rpm 速率離心 10 分鐘。
- (17) 加入 600 μ l、75%酒精，上下倒轉數次。
- (18) 以 ≥ 13000 rpm 速率離心 2 分鐘。
- (19) 倒掉上清液，真空乾燥。
- (20) 加入 100 μ l 二次水保存於零下 20°C

2、PCR

(1) 藥品與含量

藥品	體積(μ l)	藥品	體積(μ l)
dd H ₂ O	46.5	dNTP(2.5 μ M)	5
10X Reaction Buffer	5	Ex Taq	0.5
16S21(100 μ M)	1	蟋蟀樣本(1ng/ μ l)	1
16S22(100 μ M)	1		

(16S21 : 5'CGCCTGTTTAACAAAAACAT3' (Kocher et al., 1989))

(16S22: 5'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT3' (Palumbi,1996))

(2) 反應條件

94°C	2 分鐘	反應 30 次
94°C	50 秒	
50°C	40 秒	
72°C	50 秒	
72°C	10 分鐘	

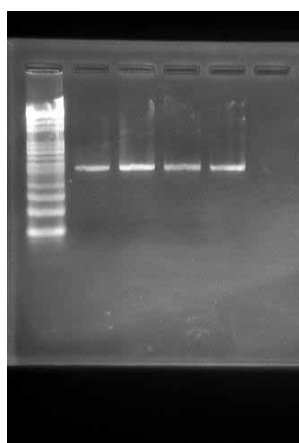
(3) 以 2% agarose 膠片，注入 PCR 產物，電泳並染色拍照。

3、DNA 回收（使用 Viogene Kit）

- (1) 以 2% agarose 膠片，注入 PCR 產物，電泳。
- (2) 紫外光照射下，切下所需的 gel band，放入 quick spin column。
- (3) 以加入 GEX buffer 700ml，並於 50°C 下水浴以溶解 agarose。
- (4) 離心 2 分鐘，到掉下層液。
- (5) 加入 WF buffer 500ml，離心 2 分鐘，到掉下層液。
- (6) 加入 WS buffer 700ml，離心 2 分鐘，到掉下層液。
- (7) 換新的離新管，以 60 μ l 二次水回溶。
- (8) 保存於零下 20°C。
- (9) 外送定序。

primers

16SR21 & 16S22



左起

1. Marker
2. 烏頭眉紋蟋蟀
3. 白緣眉紋蟋蟀
4. 黑蟋蟀
5. 小扁頭蟋蟀

圖(七) PCR 產物

五、 機械干擾實驗



1、 鏡子

- (1) 取一透明箱，中間以一厚紙板分隔，先分別將雄蟲、雌蟲放入透明箱之兩端，放置 10 分鐘，使其熟悉環境。
- (2) 抽出紙板，改以鏡子在上預備。
- (3) 待雄蟲靠近雌蟲 2~3 cm 時，放下鏡子(正面朝向雄蟲)。
- (4) 隔絕雄、雌蟲，觀察雌、雄蟲行動。

2、 照片

研究過程同上，改以照片刺激。

3、 透明塑膠片

研究過程同上，改以透明塑膠片隔絕兩蟋蟀(雄蟲可看見雌蟲，但卻被阻隔，仍聞得到氣味)。

4、 不透明塑膠片

研究過程同上，改以不透明塑膠片隔絕兩蟋蟀(雄蟲看不見雌蟲，仍聞得到氣味)。

5、 玻璃罩

(1) 罩住雄蟲

- A. 取一透明箱，中間以一厚紙板分隔，分別將雄蟲、雌蟲放入透明箱之兩端，放置 10 分鐘，使其熟悉環境。
- B. 抽出紙板，改以玻璃罩在雄蟲上預備。
- C. 待雄蟲發出求偶叫聲，並開始靠近雌蟲，當雌蟲之觸角靠近雄蟲 2~3 cm 時，以玻璃罩住。隔絕雄、雌蟲，觀察雌、雄蟲的後續行動。

(2) 罩住雌蟲：過程同上，改以玻璃罩住雌蟲。

6、蟋蟀假體

(1) 準備一蟋蟀假體。

(2) 取一透明箱，中間以一厚紙板分隔，先分別將雄蟲、雌蟲放入透明箱之兩端放置 10 分鐘，使其熟悉環境。

(3) 抽出紙板，改以蟋蟀假體在上預備，待雄蟲發出求偶叫聲，並開始靠近雌蟲。

(4) 在雄蟲之觸角靠近雌蟲 5 cm 時，以雌蟋蟀假體取代雌蟲原位，觀察雄蟲下一步行動。

六、聲音干擾實驗

1、聲音干擾-呼喚

(1) 取一透明箱，中間以一厚紙板分隔。

(2) 先分別將公蟲、母蟲放入透明箱之兩端。

(3) 母蟲端放入擴音器。

(4) 放置 10 分鐘，使其熟悉環境。

(5) 抽出紙板，使公蟲得以靠近母蟲。

(6) 待公蟲靠近母蟲 2~3 cm 時放出該蟋蟀之呼喚聲。

(7) 觀察公、母蟲下一步行動。

2、聲音干擾-求偶

(1) 取一透明箱，中間以一厚紙板分隔

(2) 先分別將公蟲、母蟲放入透明箱之兩端

(3) 母蟲端放入擴音器

(4) 放置 10 分鐘，使其熟悉環境

(5) 抽出紙板，使公蟲得以靠近母蟲

(6) 待公蟲靠近母蟲 2~3 cm 時放出該蟋蟀之求偶聲

(7) 觀察公蟲下一步行動

3、聲音干擾-攻擊

(1) 取一透明箱，中間以一厚紙板分隔攻擊

(2) 先分別將公蟲、母蟲放入透明箱之兩端

(3) 母蟲端放入擴音器

(4) 放置 10 分鐘，使其熟悉環境

(5) 抽出紙板，使公蟲得以靠近母蟲

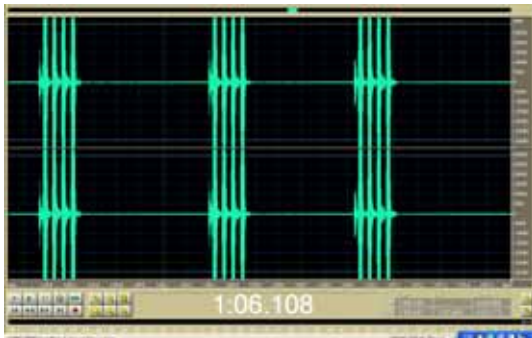

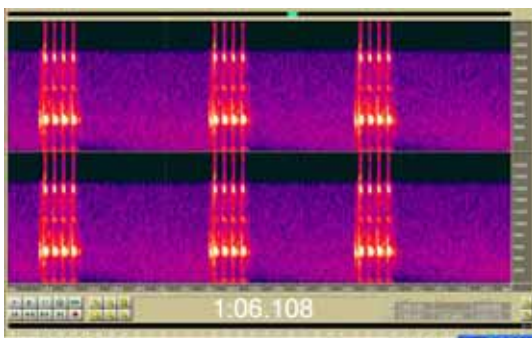
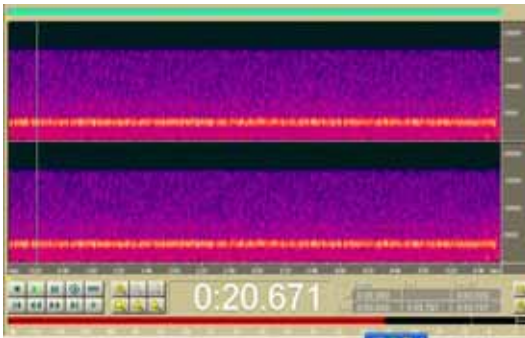

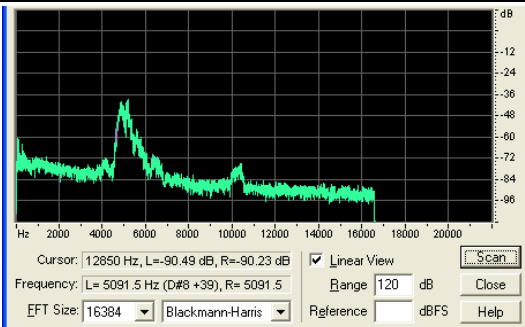
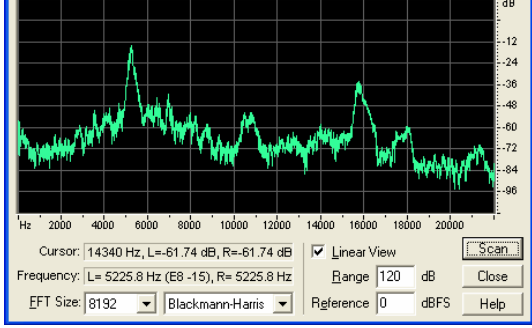
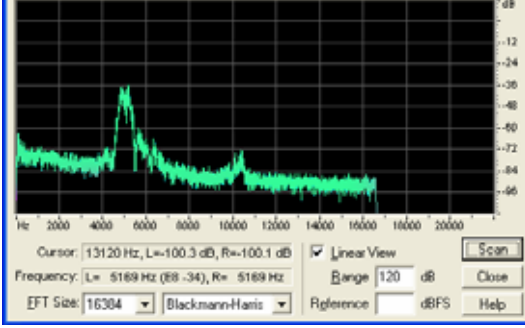
(6) 待公蟲靠近母蟲 2~3 cm 時放出該蟋蟀之攻擊聲

(7) 觀察公蟲下一步行動



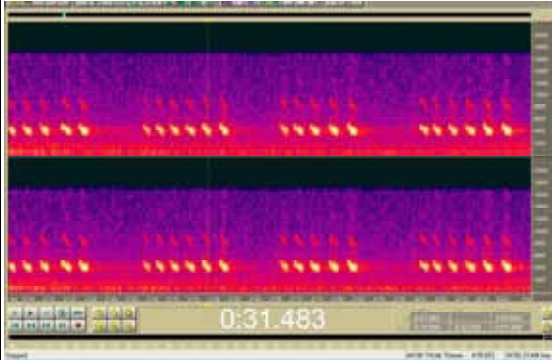
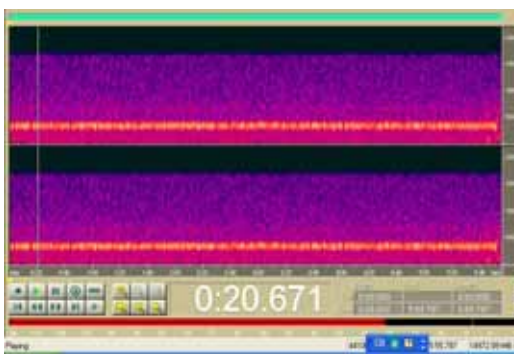
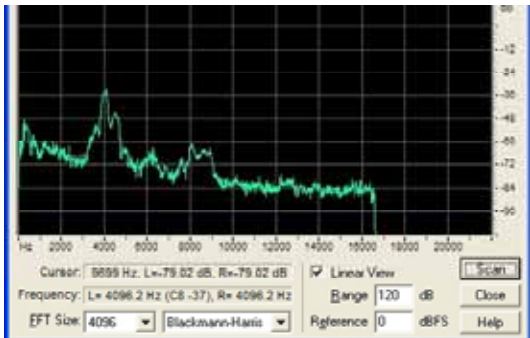
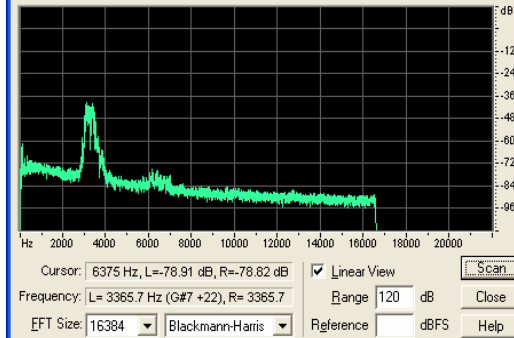
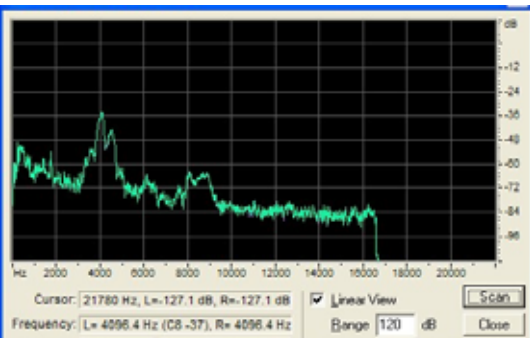
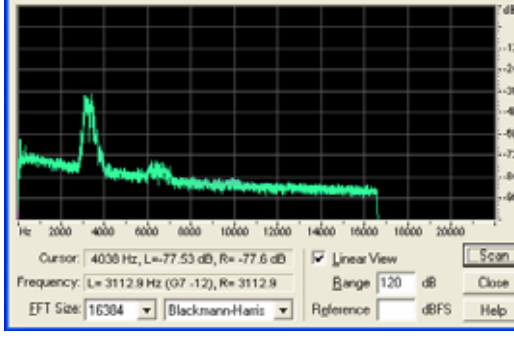
參、 研究結果

一、 蟋蟀的聲學特徵

1、 蟋蟀的聲音之比較

	黑蟋蟀	小扁頭蟋蟀
波形圖		
聲紋圖		
頻譜圖 1		
頻譜圖 2		

圖(九) 黑蟋蟀與小扁頭蟋蟀聲音分析圖

	烏頭眉紋蟋蟀	白緣眉紋蟋蟀
波形圖		
聲紋圖		
頻譜圖 1		
頻譜圖 2		

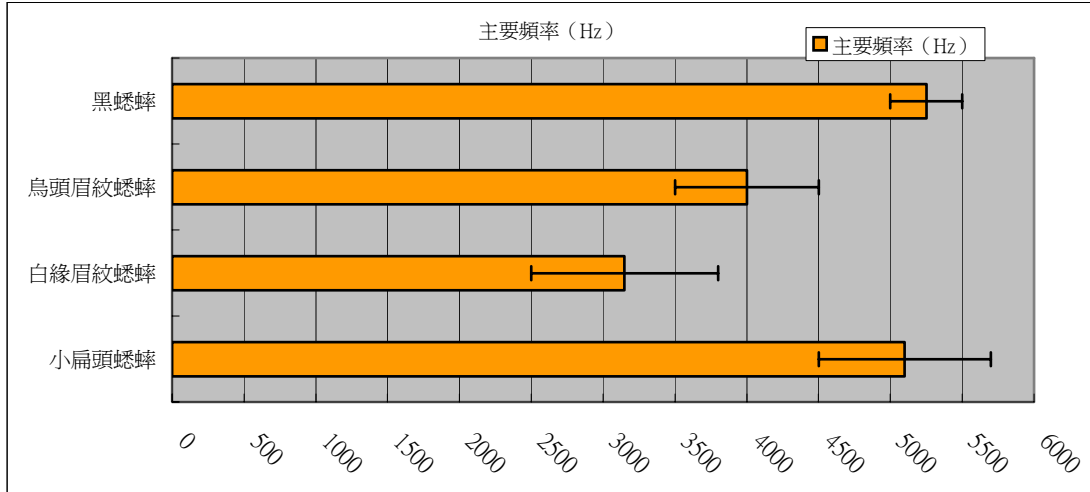
圖(十) 烏頭眉紋蟋蟀與白緣眉紋蟋蟀聲音分析圖。

表(一) 聲音分析數據整理

蟋蟀種類	頻率特性			時間特性		
	主頻率 (Hz)	頻率範圍 (Hz)	第一共振頻率 平均值 (Hz)	唧聲率 (個/1 秒)	脈衝比 (個/1 唧聲)	唧聲長 (秒)
黃斑黑蟋蟀	5250	5000~6000	10950	3.4	4~7	0.20
烏頭眉紋蟋蟀	4000	3500~5500	8000	2.1	6~7	0.20
白緣眉紋蟋蟀	3150	2500~3500	約6500左右 (微弱不明顯)	1.3	4~6	0.28
小扁頭蟋蟀	5100	4500~6000	10000	3.0	1~7	0.10

- (1) 黃斑黑蟋蟀 (*Gryllus bimaculatus*)
 頻率特性：主頻率為 5250 Hz，主頻寬大約在 5000~6000 Hz 之間。
 時間特性：脈衝比在 4~7 之間，唧聲長 0.20 秒。
- (2) 烏頭眉紋蟋蟀 (*Teleogryllus occipitalis*)
 頻率特性：主頻率為 4000 Hz，主頻寬大約在 3500~5500 Hz 之間。
 時間特性：脈衝比在 6~7 之間，唧聲長 0.20 秒。
- (3) 白緣眉紋蟋蟀 (*Teleogryllus mitratus*)
 頻率特性：主頻率為 3150 Hz，主頻寬大約在 2500~3500 Hz 之間。
 時間特性：脈衝比在 4~6 之間，唧聲長 0.28 秒。
- (4) 小扁頭蟋蟀 (*Loxoblemmus equestris*)
 頻率特性：主頻率為 5100 Hz，主頻寬大約在 4500~6000 Hz 之間。
 時間特性：脈衝比在 1~7 之間，唧聲長 0.12 秒。
- (5) 綜合圖(九)、圖(十)，就波形圖而言，烏頭眉紋蟋蟀與黑蟋蟀相近，白緣眉紋蟋蟀與小扁頭蟋蟀相近。白緣眉紋蟋蟀與小扁頭蟋蟀的頻譜圖看似相近，實際上差了 2000 Hz。
- (6) 表(一)中以頻率特性來看，黃斑黑蟋蟀與小扁頭蟋蟀的頻率較高，烏頭眉紋和白緣眉紋較低。
- (7) 表(一)中以時間特性來看，前三種蟋蟀的脈衝比為 4~7，而小扁頭蟋蟀則為 1~7，變異較大。

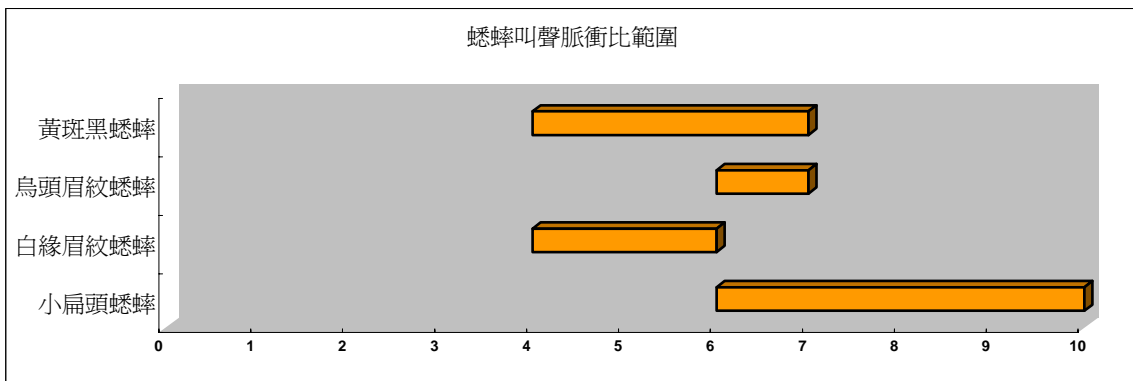
2、蟋蟀主要頻率的比較



圖(十一) 蟋蟀叫聲主頻率比較圖。

- (1) 黃斑黑蟋蟀與小扁頭蟋蟀的頻率較高，烏頭眉紋和白緣眉紋較低。
- (2) 黑蟋蟀的主頻範圍較其他蟋蟀窄。

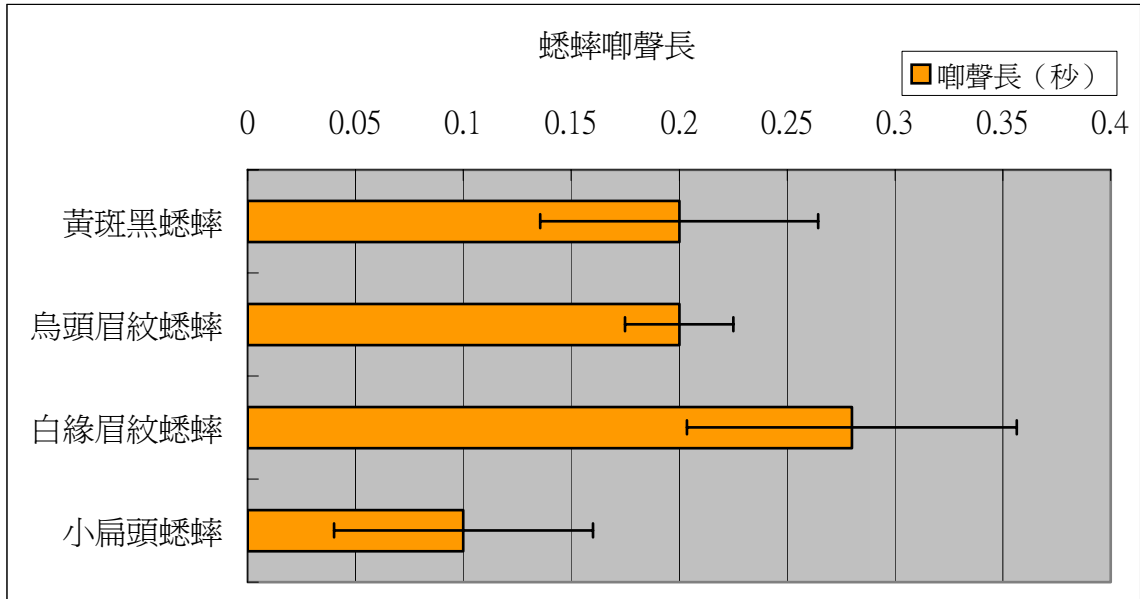
3、蟋蟀叫聲脈衝比範圍的比較



圖(十二) 蟋蟀叫聲脈衝比範圍比較圖。

- (1) 小扁頭蟋蟀的脈衝比從 1~7 都有，其他三種大約都在 4~7 的範圍中。

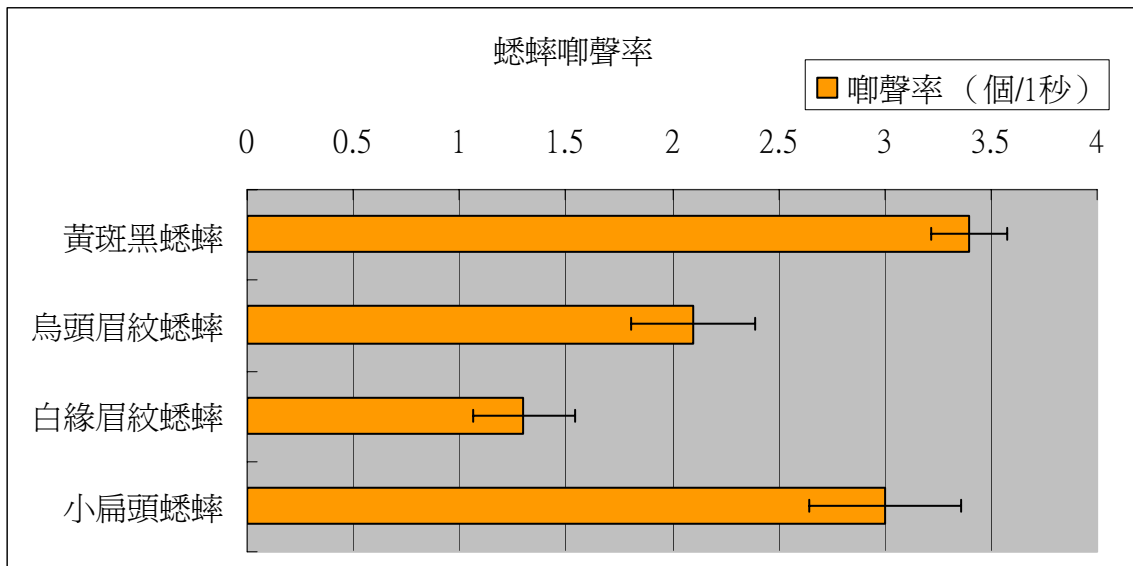
4、蟋蟀唧聲長的比較



圖(十三) 蟋蟀唧聲長比較圖。

- (1) 烏頭眉紋蟋蟀與黃斑黑蟋蟀的唧聲長度接近，而小扁頭與其他蟋蟀差異最多。

5、蟋蟀唧聲率的比較



圖(十四) 蟋蟀唧聲率比較圖。

- (1) 黃斑黑蟋蟀與小扁頭蟋蟀的唧聲率較大，且唧聲密集；而烏頭眉紋蟋蟀和白緣眉紋蟋蟀的唧聲率較小，唧聲間隔較大。

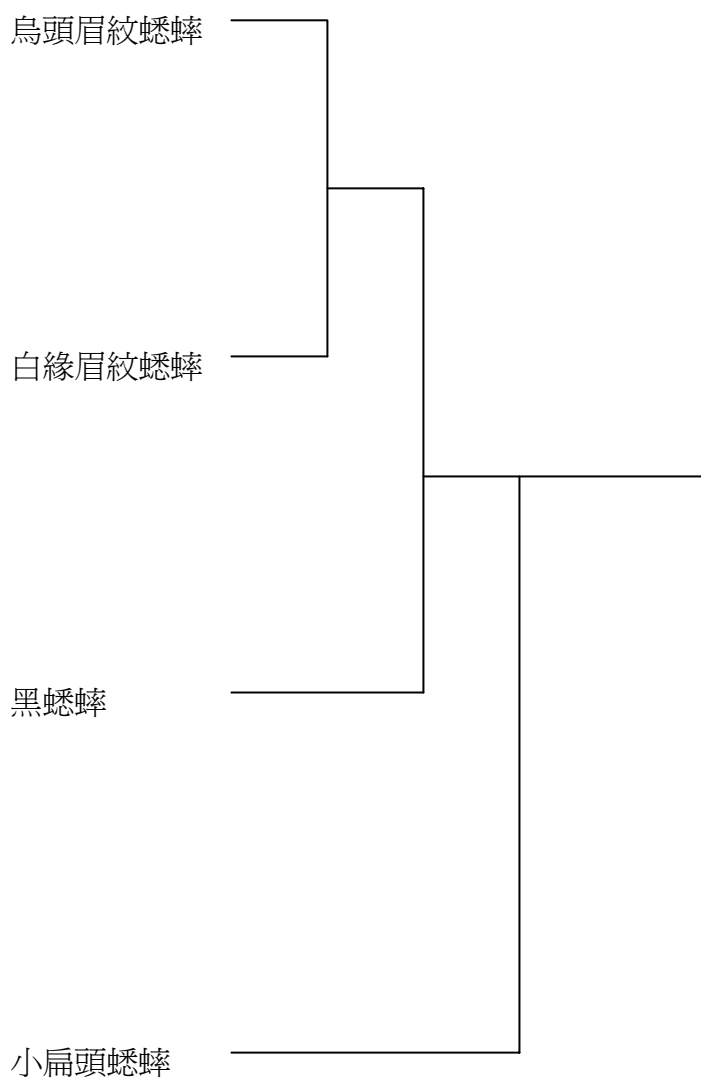
二、蟋蟀形態學分類親緣關係

1、四種蟋蟀形態特徵比較

表(二) 蟋蟀形態特徵比較

形態特徵	白緣眉紋蟋蟀	烏頭眉紋蟋蟀	黃斑黑蟋蟀	小扁頭蟋蟀	
顏色	體為淡棕色至紅棕色；前胸背板下緣白色；具眉紋	體為深棕色至黑色；具眉紋	體黑色；翅基部有鮮黃或金黃色斑塊	體棕色	
成蟲體型(mm)	20~29	19~23	20~27	11~14	
頭部					
頭側面觀	半圓形(A)；三角形(B)	A	A	A	B
頭前面觀	圓形(A)；菱形(B)	A	A	A	B
頭前面觀	可見三單眼(A)；僅見中單眼(B)	A	A	A	B
頭背面觀	可見中單眼(A)；不可見(B)	B	B	B	B
額	突出(A)；凹陷(B)	A	A	A	B
頭頂	微凸(A)；平坦(B)	A	B	B	B
觸角柄節	不具突起(A)；具小角形突起(B)；具長突起(C)	A	A	A	B
胸部					
前胸背板兩側緣	向後靠併(A)；互相平行(B)；向後外張(C)	B	B	A	B
前胸背板前緣中央	凹入(A)；平直(B)；凸出(C)	A	A	A	B
前胸背板後緣中央	凹入(A)；平直(B)；凸出(C)	B	C	C	C
前翅	長翅型超過或未達腹末(A)；伸近腹末(B)	A	A	A	B
前翅琴脈區	長四邊形(A)；菱形(B)；三角形(C)	B	B	B	A
前翅具琴脈幾條		7	5	4	3
前翅琴脈區	$a > c$ (A)； $a = c$ (B)； $a < c$ (C)	B	B	C	C
前翅鏡區	四邊形(A)；橢圓形(B)；三角形(C)	A	A	B	A

2、蟋蟀形態學分類親緣關係



圖(十五) 蟋蟀形態學分類親緣關係枝狀圖

三、 16S rDNA 序列分析結果 (以烏頭眉紋蟋蟀作為對照)

1、四種蟋蟀 16S rDNA 序列之比對結果

	1	50
烏頭眉紋蟋蟀	TGCCTGCCCA ATGAGTATTT GAATGGCCGC GGTATACTGA CCGTGCAAAG	
白緣眉紋蟋蟀	TGCCTGCCCA ATGAATATTT GAATGGCCGC GGTATACTGA CCGTGCAAAG	
黑蟋蟀	TGCCTGCCCA CTGAAGTATT AAATGGCCGC GGTATATTGA CCGTGCAAAG	
小扁頭蟋蟀	-GCCTGCCCA CTGAGGAATT AAATGGCCGC GGTATTTTGA CCGTGCAAAG	
Consensus -	GCCTGCCCA -TGA----TT -AATGGCCGC GGTAT--TGA CCGTGCAAAG	
	51	100
烏頭眉紋蟋蟀	GTAGCATAAT CATTAGTCTC TTAATTGGAG GCTGGAATGA ATGGTTTGAC	
白緣眉紋蟋蟀	GTAGCATAAT CATTAGTCTC TTAATTGGAG GCTGGAATGA ATGGTTTGAC	
黑蟋蟀	GTAGCATAAT CATTAGTCTT TTAATTGAAG GCTGGAATGA ATGGTTTGAC	
小扁頭蟋蟀	GTAGCATAAT CATTAGTCTT TTAATTGGAG GCTGGAATGA AAGGTTTGAC	
Consensus	GTAGCATAAT CATTAGTCT- TTAATTG-AG GCTGGAATGA A-GGTTTGAC	
	101	150
烏頭眉紋蟋蟀	GAAACAATTA CTGTCTCTTG ATAATGG-TT TGAATTTTAC TTTTGAGTTA	
白緣眉紋蟋蟀	GAAGCAATTA CTGTCTCTTA ATAATGA-TT TGAATTTTAC TTTTGAGTTA	
黑蟋蟀	GAAACAATAA CTGTCTCGGT GTAATTA-AT TGAATTTTAT TTTTAAGTCA	
小扁頭蟋蟀	GAAGCAACTA CTGTCTCGAT TTAATAATAT TGAATTTTAC TTTTAAGTCA	
Consensus	GAA-CAA--A CTGTCTC---- -TAAT-----T TGAATTTTA- TTTT-AGT-A	
	151	200
烏頭眉紋蟋蟀	AAAGGCTCAA ATGTTGATAG GGGACGAGAA GACCCTATAG ATCTTGATAA	
白緣眉紋蟋蟀	AAAGGCTCAA ATGTTGATAG GGGACGAGAA GACCCTATAG ATCTTGATAA	
黑蟋蟀	AAAAGCTTAA ATAATAACAG GGGACGAGAA GACCCTATAG ATCTTAATAT	
小扁頭蟋蟀	AAAGGCTTAA ATAATAATAG GGGACGAGAA GACCCTATAG ATCTTGAAAT	
Consensus	AAA-GCT-AA AT--T-A-AG GGGACGAGAA GACCCTATAG ATCTT-A-A-	
	201	250
烏頭眉紋蟋蟀	TTTATATTAA TTTTTTGTG TGGATGGTAT TTATTGAATT TTAGTATATT	
白緣眉紋蟋蟀	TTTATATTGA TTTTTTGTG TGGATGGTAT TTAATAAATT TTAGTATATT	
黑蟋蟀	TATTATATTA AAATATATGT TTGGTAGTAT TTAATTTATT TTATTGTATA	
小扁頭蟋蟀	GTTATTATGA TATATAAGTA TATGGTTGTG TGAAGTTATT ATTATAATAA	
Consensus	--T----T-A ----- T----- T-A---ATT -T--T-----	
	251	300
烏頭眉紋蟋蟀	GTATTT-GGT TGGGGTGACA AGGGAATATG ATAACTTCTT ATTATTTAAC	
白緣眉紋蟋蟀	GTATTT-GGT TGGGGTGACA GGGGAATATA ATAACTTCTT ACTATTTAAC	
黑蟋蟀	ATGTTTT-GT TGGGGTGACA AGGGAATAAT TTAACTTCTT TTTATTTTAC	
小扁頭蟋蟀	CATTTTTGGT TGGGGTGACA GGAGAATAGA AAAACTTCTT TAATTTAAAC	
Consensus	---TTT-GT TGGGGTGACA- G-GAATA-- --AACTTCTT ----TT--AC	
	301	350

烏頭眉紋蟋蟀 TATGATGATT GGTTAATTGA TCCT-ATATT ATGGAATAAA GATAAAGATA
 白緣眉紋蟋蟀 TATGATGATT GGTTAATTGA TCCT-ATATT ATGGAATAAA GATAAAGATA
 黑蟋蟀 TATGATGATT GGTTTATTGA TCCTGTTATT ATGGAATAAA GATAAAGATA
 小扁頭蟋蟀 TATGATAATT GGTTTATGGA TCCT-ATTTT ATGGAATAAA GATGAAGATA
 Consensus TATGATGATT GGTT-AT-GA TCCT--T-TT ATGGAATAAA GAT-AAGATA
 351 400

烏頭眉紋蟋蟀 CCTTAGGGAT AACAGCGTAA TGTTATTGGA GAGTTCCTTAT TGATAATAAA
 白緣眉紋蟋蟀 CCTTAGGGAT AACAGCGTAA TGTTATTGGA GAGTTCCTTAT TGATAATAAA
 黑蟋蟀 CCTTAGGGAT AACAGCGTAA TATTATTGGA GAGTTCATAT TGATAATAAG
 小扁頭蟋蟀 CCTTAGGGAT AACAGCGTAA TTTTATTGGA GAGTTCATAT TGATAATGAA
 Consensus CCTTAGGGAT AACAGCGTAA T-TTATTGGA GAGTTC-TAT TGATAAT-A-
 401 450

烏頭眉紋蟋蟀 GATTGCGACC TCGATGTTGG ATTAAGAAAA TTATTAGGTG CAGAAGCTTA
 白緣眉紋蟋蟀 GATTGCGACC TCGATGTTGG ATTAAGAAAA TTATTAAGTG CAGAAGCTTA
 黑蟋蟀 GATTGCGACC TCGATGTTGG ATTAAGAAAA TTATTGGGTG CAGGAGCTCA
 小扁頭蟋蟀 GATTGCGACC TCGATGTTGG ATTAAGAATA TAATTAGATG CAGGAGTTTA
 Consensus GATTGCGACC TCGATGTTGG ATTAAGAA-A T-ATTGT--G CAG-AGCT-A
 451 500

烏頭眉紋蟋蟀 ATTTATTGGT CTGTTTCGACC ATTAATTCT TACATGATCT GAGTT
 白緣眉紋蟋蟀 ATTTATTGGT CTGTTTCGACC ATTAATTCT TACATGATCT GAGTT
 黑蟋蟀 ATATATTGGT CTGTTTCGACC ATTAATTCT TACATGATCT GAGTT
 小扁頭蟋蟀 ATTTATTGGT CTGTTTCGACC ATTAATTCT TACATGATCT GA-TT
 Consensus AT-TATTGGT CTGTTTCGACC ATTAATTCT TACATGATCT GA-TT

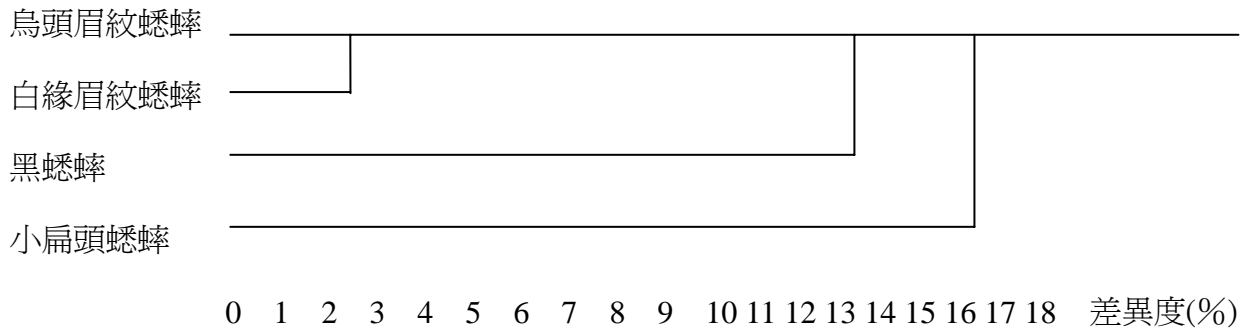
2、蟋蟀 16S rDNA 序列的比較

表(三) 不同種蟋蟀與烏頭眉紋蟋蟀的序列比較

	與烏頭眉紋差異鹼基	與烏頭眉紋相同鹼基	差異百分比
烏頭眉紋蟋蟀	0	495	0%
白緣眉紋蟋蟀	11	484	2.27%
黑蟋蟀	69	426	13.94%
小扁頭蟋蟀	85	410	17.17%

表(四) 不同種蟋蟀之 A、T、C、G 鹼基比例

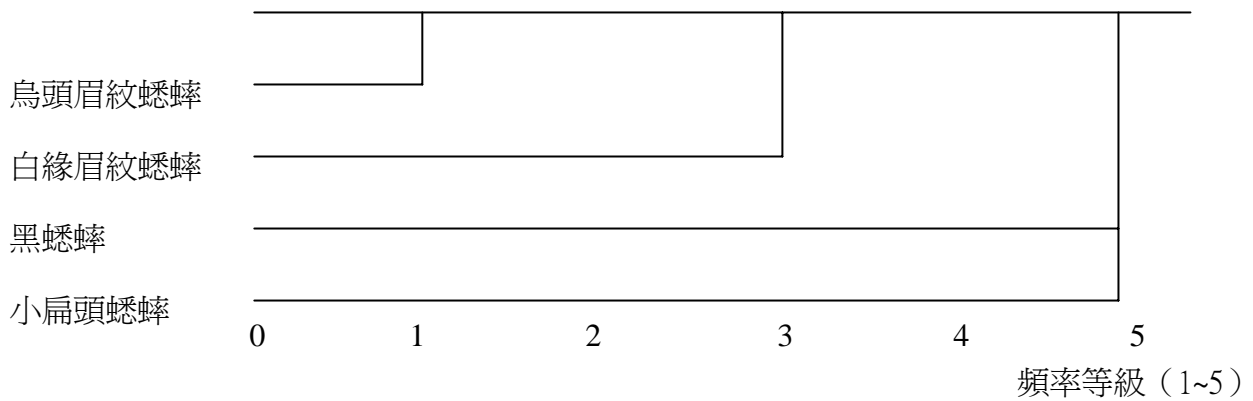
	A(%)	T(%)	C(%)	G(%)
烏頭眉紋蟋蟀	30.28	36.99	10.98	21.75
白緣眉紋蟋蟀	31.10	36.59	11.18	21.14
黑蟋蟀	32.25	36.71	10.95	20.08
小扁頭蟋蟀	33.13	34.76	10.98	21.14
平均	31.69	36.26	11.02	21.03



圖(十六) 16S rDNA 序列分析差異度樹狀圖

- (1) 由表(二)得知白緣眉紋蟋蟀與烏頭眉紋蟋蟀的核酸序列最為相近，其次是黑蟋蟀，小扁頭蟋蟀則差最遠。
- (2) 由圖(十六)16S rDNA 序列演化圖來看，白緣眉紋蟋蟀與烏頭眉紋蟋蟀的關係最接近。

3、蟋蟀頻率等級的比較



圖(十七) 蟋蟀頻率等級樹狀圖。

註：蟋蟀頻率等級計算方式

根據表(一)各種蟋蟀主頻率最高者〔(黑蟋蟀 5250 Hz)－最低者(白緣眉紋 3150 Hz)〕÷採樣數(4)，取得間距=525，並由最小值起每隔一建距，等級差一。

- (1) 由圖(十七)頻率等級顯示白緣眉紋蟋蟀與烏頭眉紋蟋蟀頻率較接近，而黑蟋蟀與小扁頭蟋蟀則坐落在同一等級區內。

四、不同地區烏頭眉紋蟋蟀 COI DNA 序列分析結果

1、東部及北部地區烏頭眉紋蟋蟀之 COI DNA 序列之比對

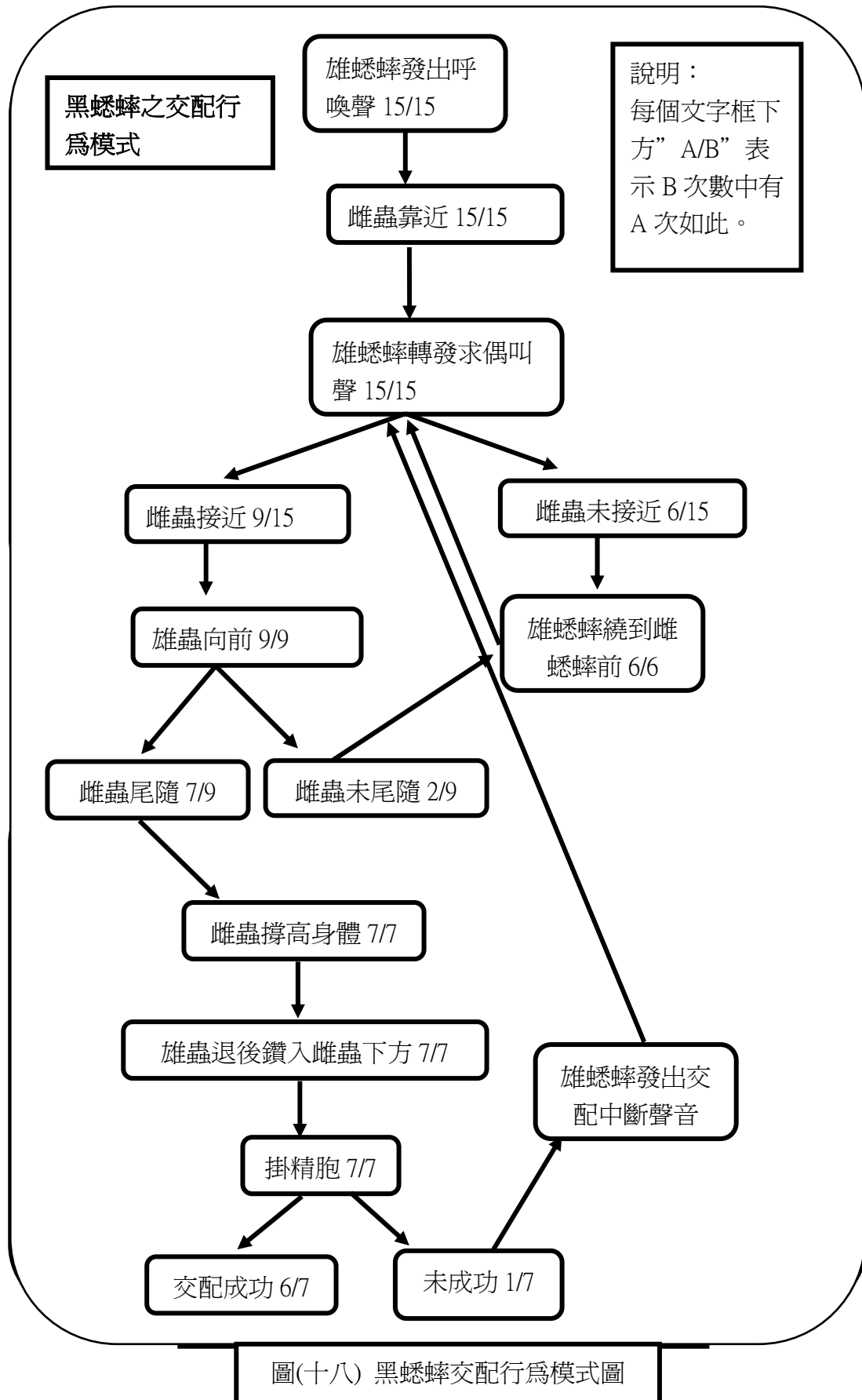
1	60
台北地區	GATATAGCATTTCACGGATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCACCATCATTAAC
花蓮地區	GATATAGCATTTCACGGATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCACCA
	TCATTAAC
61	120
台北地區	CTCCTATTAACCAGAAGAATAGTTGAAAATGGTGCAGGAACAGGATGAACAGTATATCCA
花蓮地區	CTCCTATTAATCAGAAGAATAGTTGAAAATGGTGCAGGAACAGGATGAACAGTATATCCA
121	180
台北地區	CCTTTATCAACTGGTATTGCCCATGCAGGAGCATCGGTTGATCTAGCCATTTTCTCGTTA
花蓮地區	CCTTTATCAACTGGTATTGCCCATGCAGGAGCATCGGTTGATCTAGCCATTTTCTCGTTA
181	240
台北地區	CATTTAGCGGGAATTTCTTCGATTCTAGGAGCTGTAATTTTATTACAACCATAATCAAT
花蓮地區	CATTTAGCGGGAATTTCTTCGATTCTAGGAGCTGTAATTTTATTACAACCATAATCAAT
241	300
台北地區	ATACGAGCACCTGGAATATCAATAGATCAAACACCTTTATTTGTATGAGCTGTTGGTATT
花蓮地區	ATACGAGCACCTGGAATATCAATAGATCAAACACCTTTATTTGTATGAGCTGTTGGTATT
301	360
台北地區	ACTGCTCTTTTACTATTGTTATCACTACCAGTATTAGCTGGTGCATTACTATATTATTA
花蓮地區	ACTGCTCTTTTACTATTGTTATCACTACCAGTATTAGCTGGTGCATTACTATATTATTA

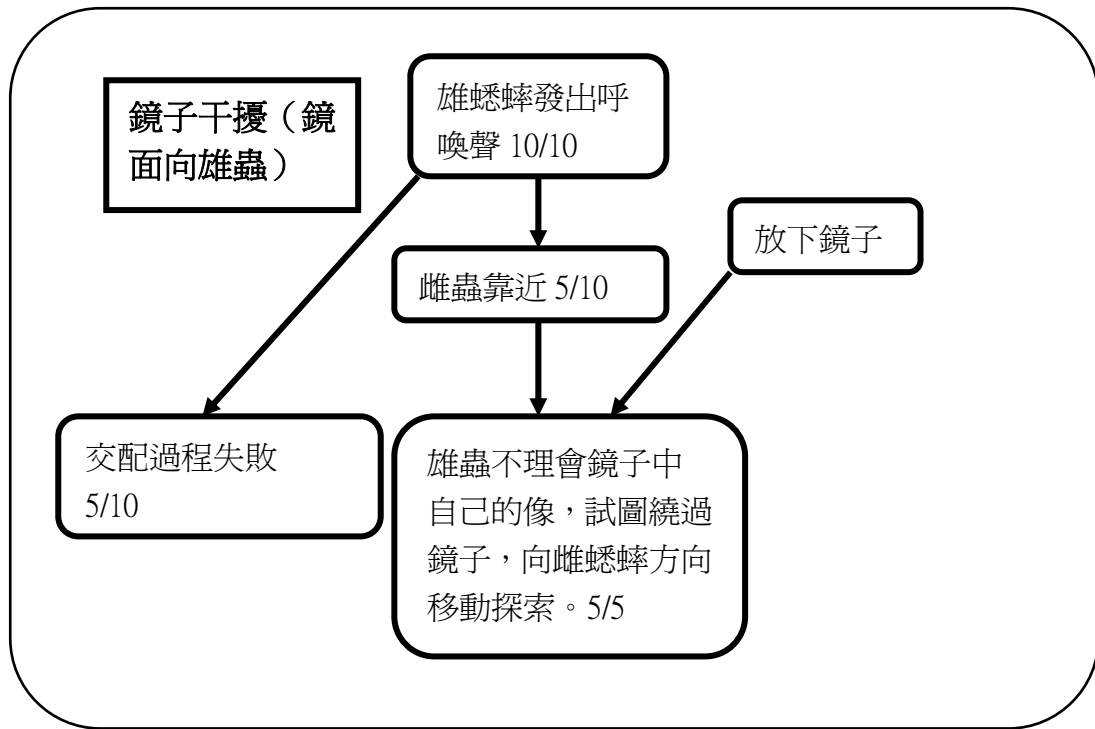
表(五) 不同地區烏頭眉紋蟋蟀蟋蟀之 A、T、C、G 鹼基比例

	A(%)	T(%)	C(%)	G(%)
台北地區	31.11	34.44	18.33	16.11
花蓮地區	31.11	34.72	18.05	16.11

- (1) 北部地區的樣本和東部地區的樣本在 COI DNA 序列上有一個含氮鹽基的變異，位於第 71 個位置。

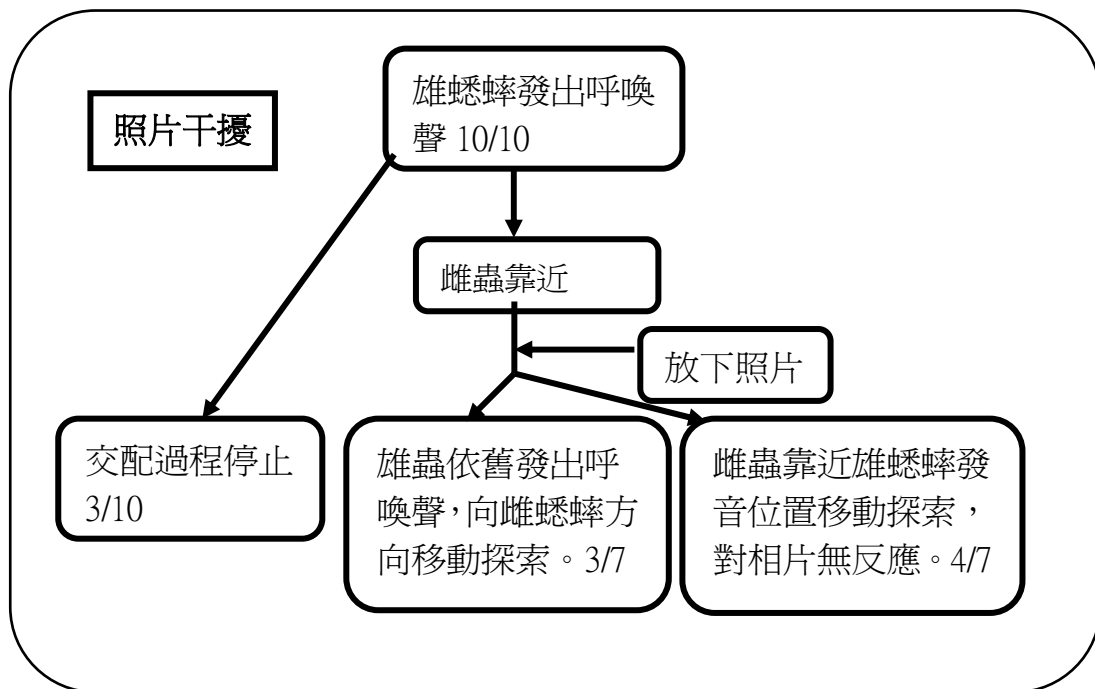
五、蟋蟀交配行為模式：統計黑蟋蟀的在未受干擾下的交配行為，歸納出下列各圖





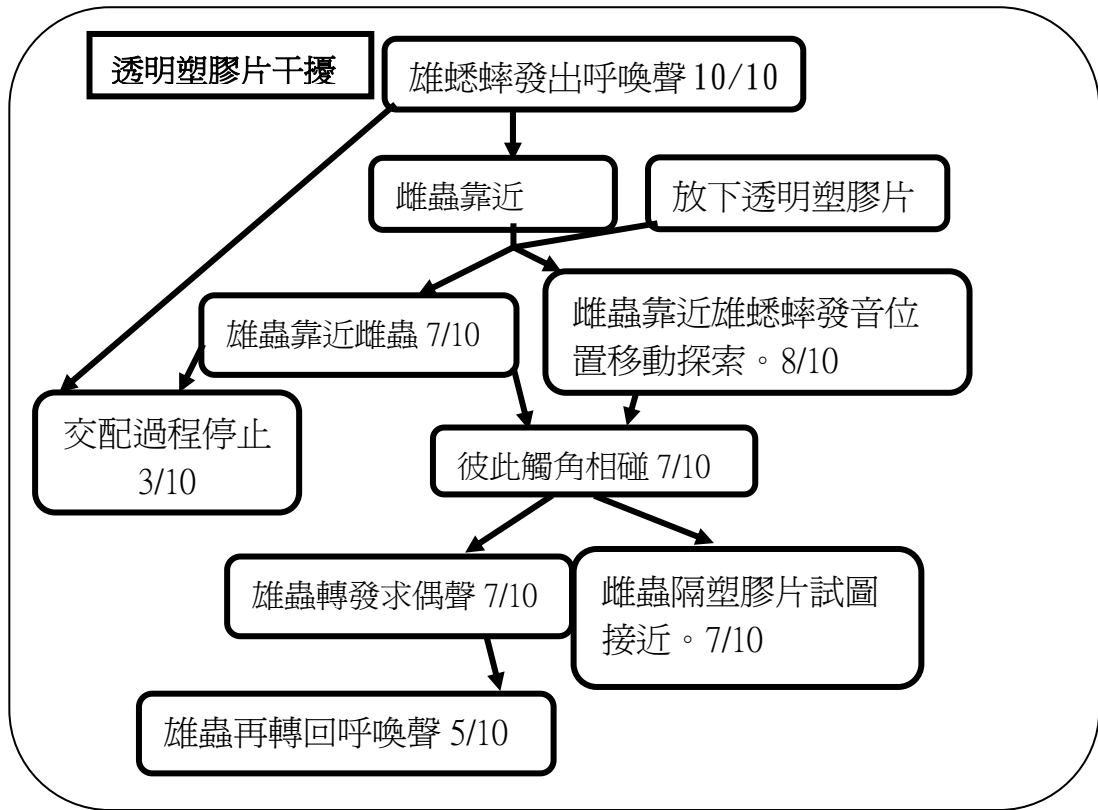
圖(十九) 在鏡子干擾下，蟋蟀生殖行為圖

- (1) 在鏡子干擾下，蟋蟀可以看見鏡中反射的影像。
- (2) 蟋蟀不受影響。



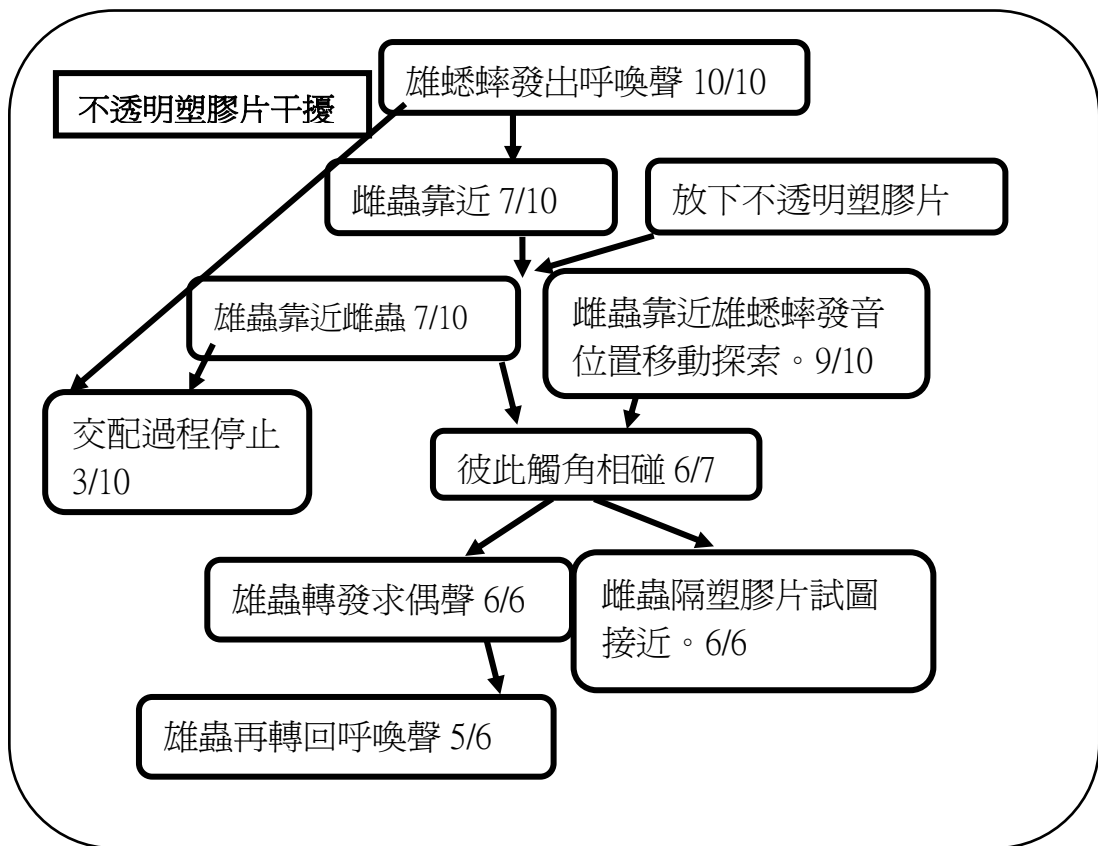
圖(二十) 在照片干擾下，蟋蟀生殖行為圖

- (1) 在照片干擾下，蟋蟀可以看見照片顯示的蟋蟀影像。
- (2) 蟋蟀不受影響。



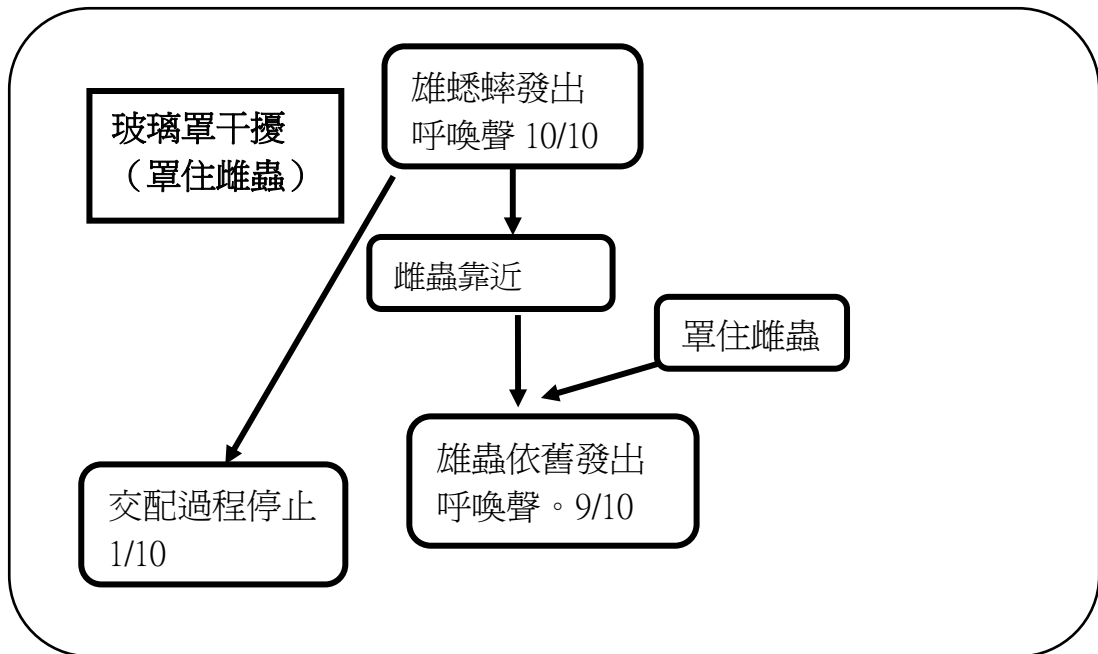
圖(二十一) 在透明塑膠片干擾下，蟋蟀生殖行為圖

(1) 以透明塑膠片干擾，蟋蟀彼此可以互相看到，也可以聞到彼此氣味，但無法接近。



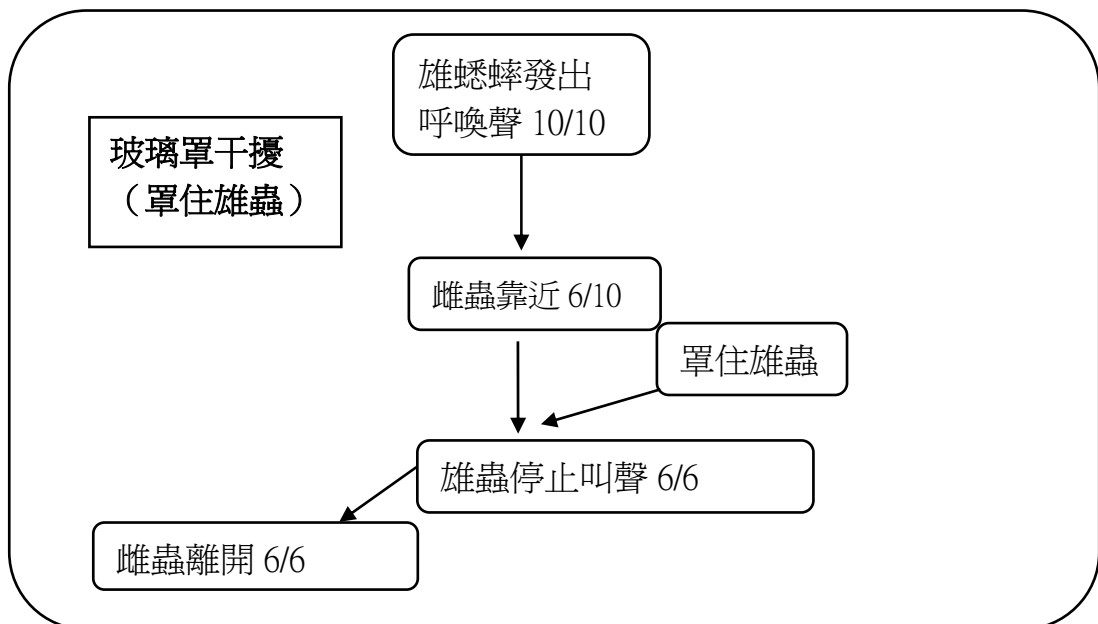
圖(二十二) 在不透明塑膠片干擾下，蟋蟀生殖行為圖

(1) 以不透明塑膠片處理，蟋蟀看不到彼此，也無法接觸，但仍可以聞到氣味。



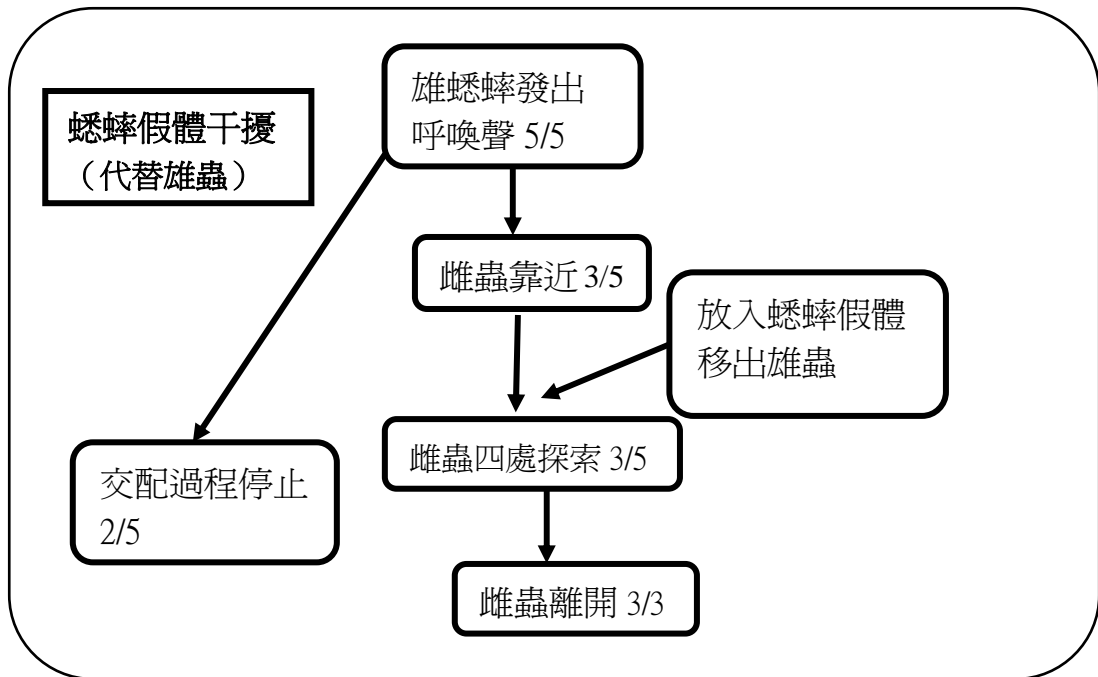
圖(二十三) 在玻璃罩干擾(罩住雌蟲)干擾下，蟋蟀生殖行為圖

- (1) 以玻璃罩罩住雌蟲，使雄蟲無法聞到雌蟲氣味，但仍可以看見雌蟲。
- (2) 雄蟋蟀多半原地徘徊，發出叫聲。



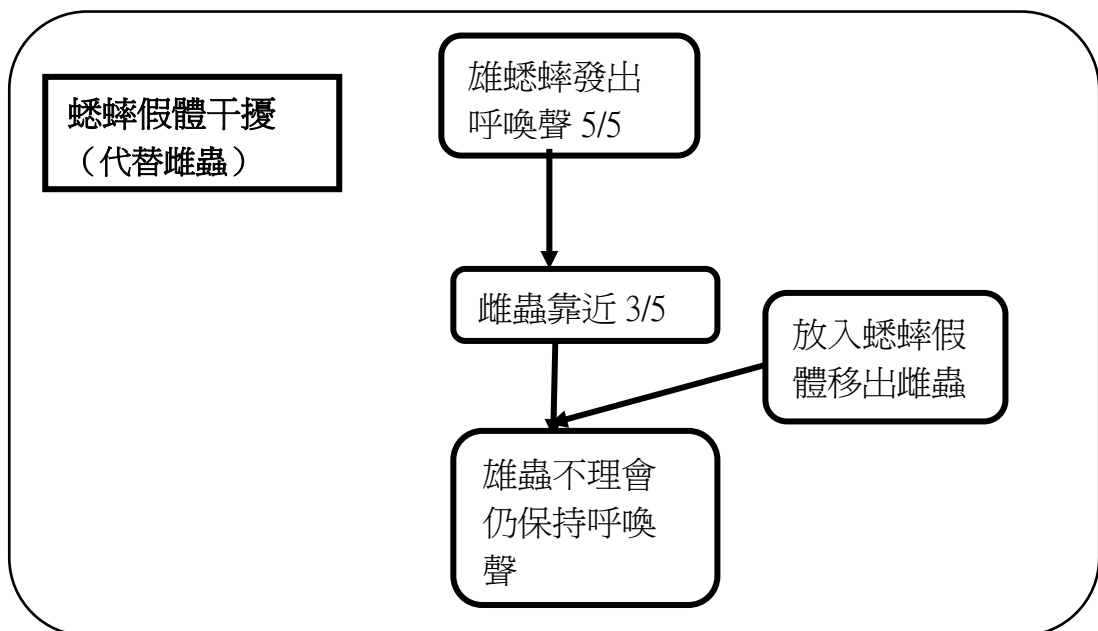
圖(二十四) 在玻璃罩干擾(罩住雄蟲)干擾下，蟋蟀生殖行為圖

- (1) 以玻璃罩罩住雌蟲，使雄蟲無法聞到雌蟲氣味，但仍可以看見雌蟲。
- (2) 雄蟋蟀在玻璃罩罩下後停止叫聲。



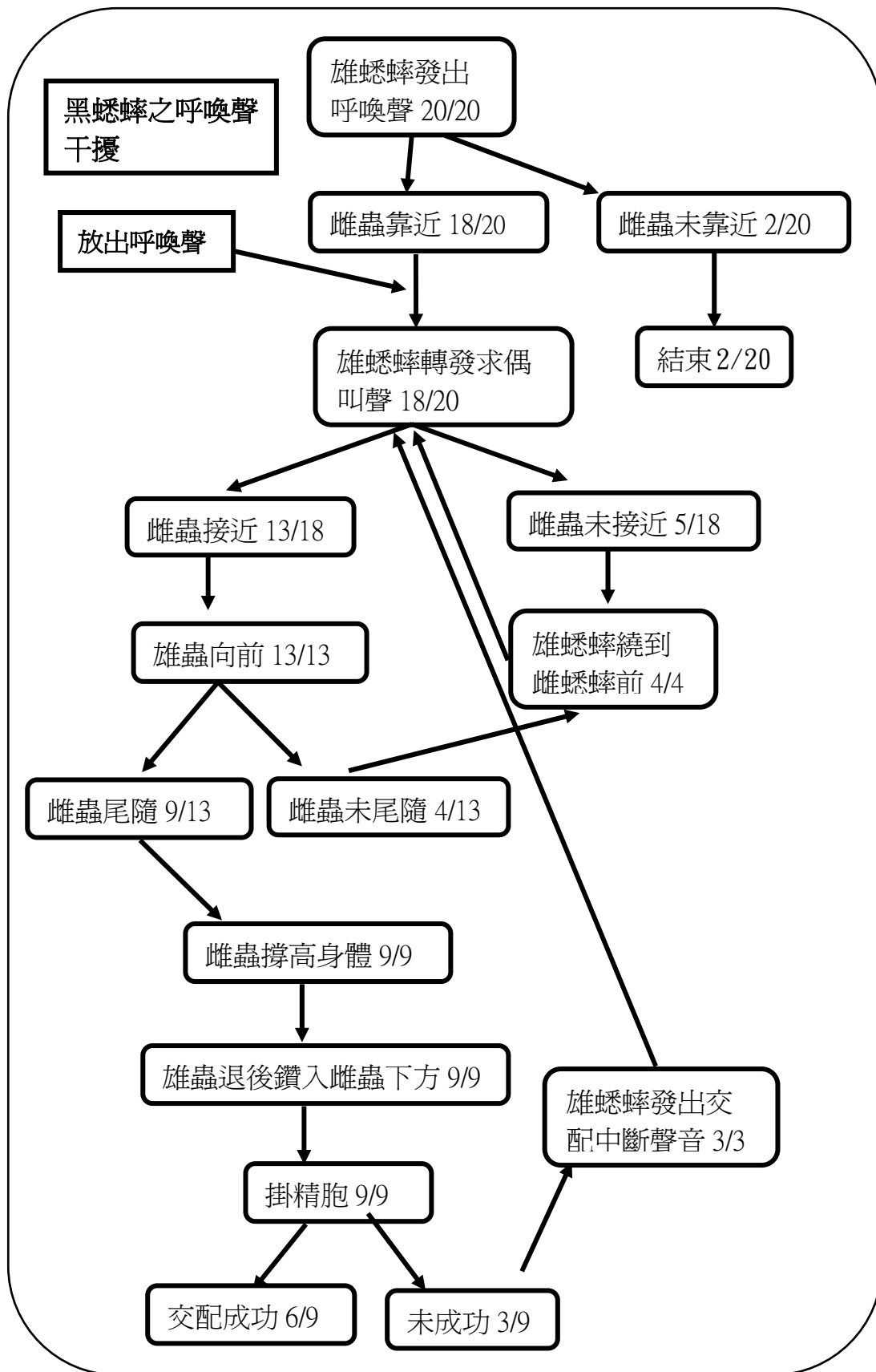
圖(二十五) 在蟋蟀假體干擾(罩住雄蟲)干擾下，蟋蟀生殖行為圖

(1) 在放入蟋蟀假體後，雌蟋蟀對假體並沒有反應。



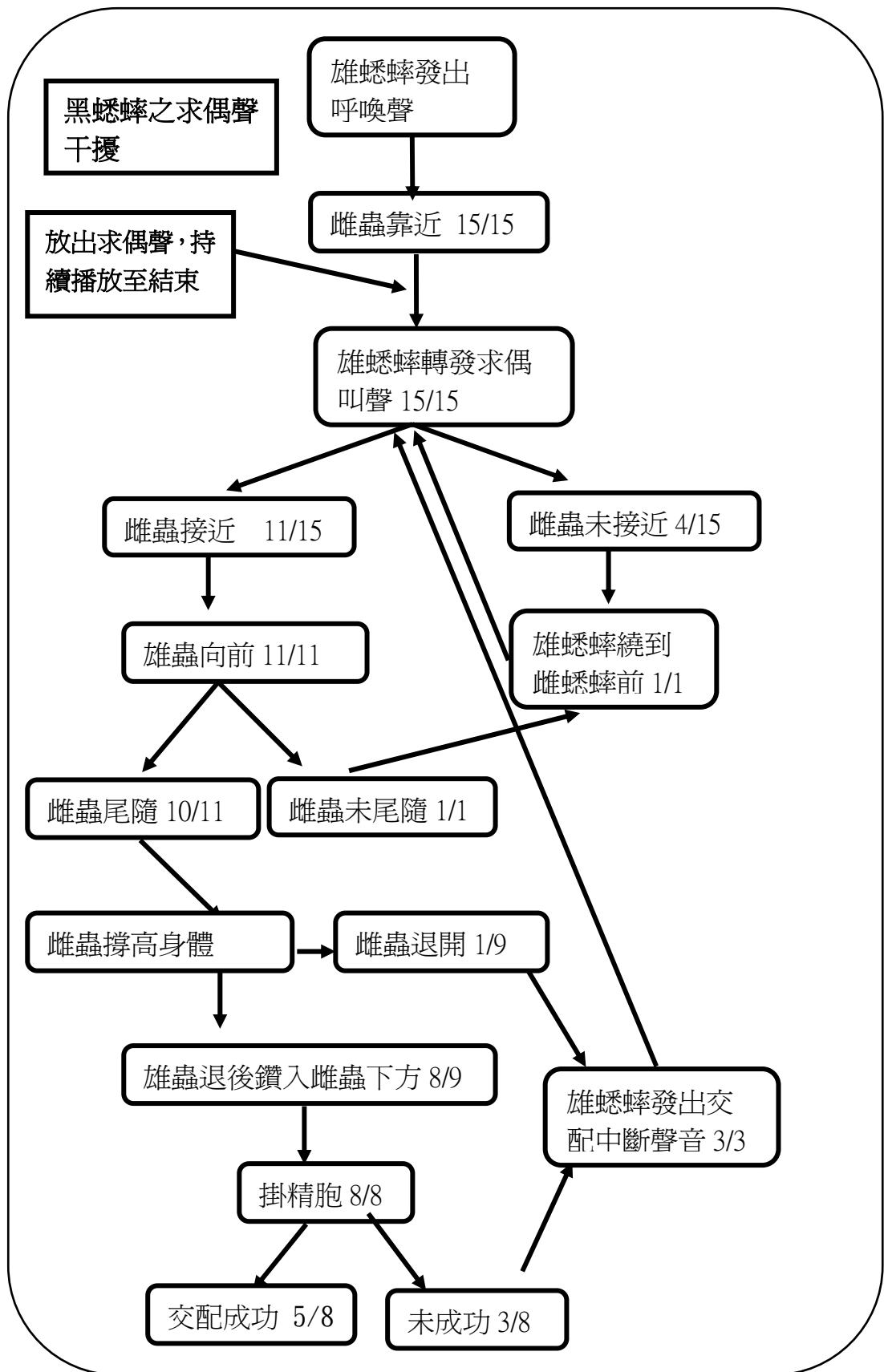
圖(二十六) 在蟋蟀假體干擾(罩住雌蟲)干擾下，蟋蟀生殖行為圖

(1) 在放入蟋蟀假體後，雄蟋蟀對假體並沒有反應，亦沒有轉發求偶聲。



圖(二十七) 黑蟋蟀受呼喚聲干擾之交配行為

(1) 以呼喚聲干擾，黑蟋蟀的行為模式未受影響。



圖(二十八) 黑蟋蟀受求偶聲干擾之交配行爲

(1) 以求偶聲干擾，黑蟋蟀的行爲模式未受影響。

肆、 討論

一、 16S rDNA 序列分析與傳統形態學

1、 16S rDNA 序列分析討論

針對實驗的 4 個樣本，495 個鹼基分析，發現其中 A、T、C 及 G 的比例接近，平均為各為 31.69%、36.26%、11.26%、21.03%。彼此間鹼基有差異，烏頭眉紋蟋蟀和白緣眉紋蟋蟀的差異度為 2.27%，烏頭眉紋蟋蟀和黑蟋蟀的差異度為 13.94%，而烏頭眉紋蟋蟀和小扁頭蟋蟀的差異度為 17.17%。烏頭眉紋蟋蟀與白緣眉紋蟋蟀的親緣關係較其他兩者接近。黃斑黑蟋蟀與烏頭眉紋蟋蟀及與白緣眉紋蟋蟀的關係較小扁頭蟋蟀為接近。

2、 傳統形態學

根據傳統形態學分類(表二)繪製而成的樹狀圖(圖十五)，可看出這四種蟋蟀的親緣關係，其中烏頭眉紋蟋蟀(*Teleogryllus occipitalis*)與白緣眉紋蟋蟀(*Teleogryllus mitratus*)同屬於 *Teleogryllus* 屬蟋蟀，親緣關係較其他兩者不同屬接近。黃斑黑蟋蟀(*Gryllus bimaculatus*)和小扁頭蟋蟀(*Loxoblemmus equestris*) 不同屬，黃斑黑蟋蟀與烏頭眉紋蟋蟀及與白緣眉紋蟋蟀之較為接近(楊,1993)。

3、 16S rDNA 序列分析與傳統形態學之間的比較

根據表(三)，烏頭眉紋及白緣眉紋的 DNA 序列分析結果較接近，與傳統形態學分類契合，顯示傳統形態學與 DNA 序列分析有一致性，隱含著 DNA 序列可用於分類鑑定的訊息。

4、 不同地區烏頭眉紋蟋蟀 COI DNA 序列分析結果

採集台灣各區(北、東、南)的眉紋蟋蟀，分析 COI DNA 序列，以探討眉紋蟋蟀種內變異(目前實驗正在進行中)。就以目前的結果初步發現北部和東部的樣本中烏頭眉紋蟋蟀的 COI DNA 序列有分化的現象，差異達 0.3%，但因樣品數不夠多，需累積更多數據資料，才可以更精確地進一步分析。

二、 聲學特徵與蟋蟀物種間的關係

1、 不同蟋蟀在聲音頻率特性的比較

根據表(一)圖(十一)，四種蟋蟀的頻率範圍互有重疊，但主頻率仍有差異。就烏頭眉紋蟋蟀與白緣眉紋蟋蟀來看，主頻率特性可能是蟋蟀用以區別不同種的因素之一。屬於不同屬的黑蟋蟀與小扁頭蟋蟀，其主頻率範圍卻大致重疊，顯然要以主頻率此單一的聲音特性來作為蟋蟀種間的區隔，是不太妥當的。若以整段頻率範圍比較，烏頭眉紋蟋蟀與白緣眉紋蟋蟀間互有重疊部分，與黑蟋蟀及小扁頭蟋蟀區隔開來，但黑蟋蟀與小扁頭蟋蟀在此特性中亦有相當範圍的重疊，亦顯示單以主頻率不足以作為物種鑑定的指標。

2、不同蟋蟀在聲音時間特性的比較

以脈衝比的角度來看(表(一)圖(十二))，烏頭眉紋蟋蟀與白緣眉紋蟋蟀雖然都有出現脈衝比為 6 的唧聲，但以等級來看，實則已區分開來。而黑蟋蟀的頻率比則涵蓋了前二者的範圍，同樣位於 4~7 的範圍內，與小扁頭的 6~12 有所不同。以這個角度看來，可能有親緣關係的趨勢。

在唧聲長方面(表(一)圖(十三))，烏頭眉紋蟋蟀、白緣眉紋蟋蟀及黑蟋蟀大多在兩秒以上，而小扁頭蟋蟀則顯得較短促。在這裡亦顯現出前三種蟋蟀與小扁頭蟋蟀的區別。而唧聲率方面(表(一)圖(十四))亦可以呈現出蟋蟀彼此的區別，且其變異範圍較小，可以較明確的區分出蟋蟀種間的區別，對於種的區分應該是較理想的方式，唯獨小扁頭與眉紋蟋蟀的聲音特性比黑蟋蟀與眉紋蟋蟀的接近，這與形態及 DNA 特徵結果較不同的地方。

3、聲學特徵與蟋蟀物種的關係

根據蟋蟀聲音特徵的分析比較，發現蟋蟀的聲音與親緣遠近在各個特性中有相關的趨勢，但並不是必然的相似，其中可以很清楚的由烏頭眉紋蟋蟀及白緣眉紋蟋蟀的分析圖看出差異，雖然兩種同屬蟋蟀，彼此的聲音型式卻和黑蟋蟀與小扁頭蟋蟀具有相似性，彼此間反而不同。此與傳統分類和 DNA 序列的結果不盡相同，為何會有這樣的結果？就以此點加以討論。

生物必須經過一連串的地理位置或行為的不同，使生物在交配前後有機會產生隔離而不會雜交。大多數昆蟲都有特定的棲息地，昆蟲在不同棲地自然無法遇到同種之異性交配產生後代；然而不同種類的昆蟲棲息在同一生態環境中，牠可以利用某些方式，來達成種間的隔離。聲音是長期演化的結果，就辨識種概念而言，足以充當種間隔離及種形成的機制(Otte,1992)。於是以直翅目的蟋蟀來說，聲音是同種間重要的溝通訊息，只要聲音特性中某一部分不同，便造成種間無法辨識，以保持種的完整性。烏頭眉紋蟋蟀及與白緣眉紋蟋蟀同屬共域種，以聲音作為種間辨識的溝通訊息，在交配前辨識異同種，達成種間隔離。

4、聲學特徵對蟋蟀分類的重要性

以目前看來，要以蟋蟀聲音之間的區別繪製聲紋分類檢索表，需要累積更多資料，綜合比較才能進一步探討，但蟋蟀叫聲的聲學圖依舊可以作為單一種蟋蟀的辨別指標。蟋蟀外形、色澤有時很難辨別，單以傳統形態特徵，易滋生鑑定的困擾，因此聲音的獨特性，可作為蟋蟀分類的重要依據，在形態特徵無法界定时，聲音分析可以提供另一套特徵參考。

三、 交配行為模式探討

根據實驗觀察可歸納出黑蟋蟀的生殖行為模式圖(十八)，雄黑蟋蟀在感覺到雌蟋蟀前會發出振幅較大的呼喚聲，使雌蟲在遠方就能辨別方向，接近雄蟋蟀。而當雄蟋蟀感受到雌蟋蟀之後，鳴叫聲轉變為振幅較小的求偶聲，目的是使雌蟋蟀找到確切的位置。此後，蟋蟀每一行為步驟都有連鎖反應，其中一環節出了問題，則無法

完成生殖行為。

在雄蟋蟀對雌蟋蟀發出求偶聲之前，兩性個體間有些會有接觸，此類接觸大部分是由彼此的觸角探觸，或者雄蟋蟀跟在雌蟋蟀兩側或後面，以觸角或身體接觸雌蟋蟀。若雌蟋蟀沒有特別的反應，有時雄蟋蟀會發出呼喚聲。

當雄蟋蟀發出求偶聲時，初期有一大部分的雌蟋蟀不予理會。雄蟋蟀通常會持續接近。經過一段時間後，雄蟋蟀開始有倒退動作，並以尾毛或後足附節接觸身後的雌蟋蟀。其中比較值得注意的地方，是雌蟋蟀在交配前必須在雄蟋蟀的正後方，交配行為才能繼續進行，若不是如此，雄蟋蟀將不斷的走到雌蟋蟀之前，並發出求偶聲，直到雌蟋蟀在其正後方，有時這會花許多時間。但為何非得在正後方不可，從側面接近不行嗎？推測應該與昆蟲本身外部構造有關。六隻腳的昆蟲，僅中間軀幹部分與地面分開，若要從身旁擠入，想必不易，而且容易有翻倒之虞。而從蟋蟀的翅膀及外部生殖器構造來看，雄、雌蟋蟀的後翅皆長過腹部許多，如此並不適合以尾對尾方式交配，似乎只有由前後交配較為恰當。

黑蟋蟀的交配方式是雌上雄下的下位方式，雌蟋蟀撐高身體移動至雄蟋蟀身體的某些特定部位，此時雄蟋蟀配合倒退進入雌蟋蟀體下，將雄性生殖器官伸舉觸及雌蟋蟀生殖器官，直到雄蟋蟀將精胞掛上雌性交尾孔。若雌蟋蟀順利到正後方，雄蟋蟀會主動倒退鑽到其下，而其後雌蟋蟀大多保持原狀態，而由雄蟋蟀主動掛上精胞。可以看出，蟋蟀交配的行為為雄蟋蟀主動，而雌蟋蟀只是配合而已。推測這與雌蟋蟀的產卵管型態有關。因為雌蟋蟀的產卵管本身要產卵至土中而發展為堅硬、細長，不便彎曲移動，其授精方式必須由雄蟋蟀將精胞掛到雌蟋蟀的產卵管下，在這種情形下，勢必要由雄蟋蟀主動求偶交配。而交配行為是否成功，是以雄蟋蟀是否成功的將精胞掛上雌蟋蟀交尾孔判定。掛上精胞後，雌雄個體便分開，接下來雄蟋蟀會進行護衛的動作。

行為學家認為護衛行為是雄蟋蟀保護精子的一種行為(Thorhill and Alcock, 1983)，雄蟋蟀會將觸角放在雌蟋蟀身上，或是用後足碰觸雌蟋蟀以進行護衛。在護衛期間有一重要的行為，那就是雌蟋蟀在交配過後對於掛在交尾孔上的精胞的處理，精胞兼具營養及繁衍之功能，若精胞一掛上就被雌蟋蟀吃掉，就無法達到繁衍的功能(楊,1993)。根據觀察發現，若雌蟋蟀在一掛上精胞便曲腹想吃掉時，雄蟋蟀會在護衛的距離內干擾雌蟋蟀使之無法吃精胞，以護衛精子。

根據研究結果，黑蟋蟀的呼喚聲、攻擊聲的振幅極大，而求偶聲的振幅較小。推測是因為求偶時需將聲音傳遠，必須以高分貝的聲音吸引母蟋蟀；而當母蟋蟀靠近時，改以較小聲的求偶聲，或許較能避免回音混淆方向或是避免天敵接近，確保交配時的安全。另一方面，研究發現黑蟋蟀的呼喚聲及警戒聲大致相似，推測同一種聲音可以兼具兩種功用，在呼喚母蟋蟀時，也同時對鄰近的蟋蟀示威。

然而，比較特別的是，在研究過程中並未觀察到黑蟋蟀有求偶結束的叫聲，不知道是因為環境因素還是此為黑蟋蟀特性，有待進一步蒐集資料釐清。

四、黑蟋蟀交配行為討論

1、視覺方面

根據圖(十九)(二十)(二十一)(二十二)另一隻蟲影像、鏡中自己的影像、透明塑膠片阻絕以及不透明塑膠片阻絕，以上四種方法分別是模擬靜止不動的同類，會移動的同類，看得見的另一隻蟲，但中間有阻隔；看不見的另一隻蟲，且中間有阻隔。但是，對於這四種，我們看來不一樣的干擾，蟋蟀所表現的反應都一樣——雄蟲將干擾物視為路障，嘗試繞過去尋找雌蟲。造成此結果的原因，應是黑蟋蟀主要活動時間在夜間，使得視覺的重要性降低，在交配行為中，“視覺”對蟋蟀來說，並不是判斷下一步行動或另一隻蟲位置的訊號。

2、聽覺方面

研究發現，聲音是最重要的訊號，因為不管是任何干擾實驗，雌蟋蟀沒有雄蟋蟀的叫聲，則沒有下一步的動作，所以聽覺是蟋蟀交配所必須。叫聲代表了雄蟋蟀的交配意願，對母蟲也是一種刺激，在沒有叫聲的情形下，即使兩蟋蟀互相靠近，也不會有交配的行為出現。

3、嗅覺方面

根據圖(二十三)(二十四)玻璃罩住雄蟲的實驗中，雄蟲確實是停止鳴叫，但仍然不能確定雄蟲是被驚動而停止鳴叫，或者是喪失雌蟲氣味的原因而停止。而在玻璃罩住雌蟲的實驗中，當雌蟋蟀靠近雄蟋蟀時，雄蟋蟀持續發出呼喚聲，並未轉成求偶聲。因此，更能肯定，氣味是蟋蟀判定異性蟲是否在附近的重要因素。

4、其他

另外，在實驗中發現，雌蟋蟀即使有交配意願，但仍需雄蟋蟀聲音（求偶聲）及動作兩者同時刺激才能進行交配行為，且缺一不可。

五、聲音干擾對於黑蟋蟀交配行為的影響

- 1、根據實驗結果圖(二十七)(二十八)，發現與之前的行為模式圖相似，且在實驗過程中，同時有兩隻雄蟋蟀發出聲音的情況下，雌蟲對於視線外雄蟲的呼喚聲、求偶聲反應不明顯，而向較近的雄蟲靠近。這可能是因為除了聲音的影響外，視覺和嗅覺也扮演重要的刺激，且只有聲音的干擾對蟋蟀生殖行為的影響不大。
- 2、推測在自然情況下，有許多雄蟲同時鳴叫，為了避免交配過程受到干擾，以及近距離下視覺和嗅覺的刺激，所以雌蟲在較近的雄蟲開始發出求偶聲後，便不再對視野外的呼喚聲和求偶聲發生反應，也可以減少浪費不必要的能量。

伍、 結論

- 一、各種蟋蟀的聲音頻率範圍有重疊性，且同屬種類間的聲音型態在時間特性相差很多，顯示蟋蟀聲音的發展以種內溝通為主。
- 二、各種蟋蟀間的聲學分析圖有明顯差異，可以由此鑑定蟋蟀種類，但彼此間關係仍不足以建立親緣分類表。
- 三、以四種蟋蟀的 DNA 序列分析結果而言，DNA 序列的相似程度與蟋蟀聲音的主頻率有關聯性，但時間特性卻沒有特定關聯。
- 四、傳統形態學與 DNA 序列分析有一致性。
- 五、聽覺為蟋蟀交配所必須，也是下一步行為的訊號；雄蟋蟀由呼喚聲轉求偶聲，應是由嗅覺與觸覺的刺激造成；視覺對於蟋蟀來說，不是定位的重要因素。
- 六、雌蟲在較近的雄蟲開始發出求偶聲後，便不再對視野外的呼喚聲和求偶聲發生反應。

陸、 未來展望

- 一、進行更多其他種蟋蟀的 DNA 序列分析，加以比對並以長時間的累積資料研究聲音變化與族群間的關係。
- 二、以此聲音分析及核酸序列分析進一步探討相似種或種內聲音的分化特性，特別是烏頭眉紋蟋蟀及白緣眉紋蟋蟀兩種物種的各地族群。
- 三、將已錄製的聲音檔案修改剪接，如：增加脈衝比、增加唧聲長等，對雌蟋蟀播放，藉以觀察雌蟋蟀的反應，了解蟋蟀對於同種聲音辨別的機制。
- 四、確立研究方式，將實驗流程擴大到鳴蟲類的生態行為觀察及物種鑑定。

柒、 參考資料及其他

1. 矢島稔，村瀨泰央繪圖，宋碧華譯，1999，不可思議的昆蟲世界，大樹文化出版。
2. 林俊賢、葉文斌、王清玲，2003，Multiplex-PCR 及 PCR-RFLP 於檢疫害蟲西方花薊馬的鑑定，台灣昆蟲，23: 353-366。
3. 葉文斌、何佳霖、許祖法、何琦琛，2000，運用逢機擴增多形性核酸分析長毛捕植蟎 (*Amblyseius longispinosus*) 及溫氏捕植蟎 (*A. womersleyi*) (蟎蜱亞綱；捕植科) 的遺傳變異，中華昆蟲，20:335-345。
4. 楊正澤，1993，台灣蟋蟀亞科(直翅目：蟋蟀科)生物系統分類，國立中興大學研究所博士論文，91-100。
5. 楊正澤，1999，蟋蟀聲學特徵分析，昆蟲分類及進化研討會專刊，175-197。
6. 劉淑惠、楊正澤、莫顯菁、楊仲圖，1997，Acoustics and taxonomy of Nemobiidae(Orthoptera)from Taiwan，台灣省立博物館半年刊，51(1)：55-124。
7. 顏汎昇，1997，台灣鉦蟋科，國立中興大學研究所碩士論文。
8. Hart, S., 陳雅茜譯，嚴震東審訂，1998，動物的語言，寰宇出版社出版，P.38、39

9. Faulkes, Z. and G. S. Pollack. 2001. Mechanism of frequency-specific responses of omega neuron in cricket (*Teleogryllus Oceanicus*) : A polysynaptic pathway for song ? J. Exp. Biol. 204:1295-1305.
10. Givois, V. and G.S. Pollac. 2000. Sensory habituation of auditory receptor neurons : implications for sound localization. J. Exp. Biol. 203:2529-2537.
11. Huang, Y., G. Orti, M. Sutherlin, A. Duhachek, and A. Zera. 1999. Phylogenetic relationships of North America field crickets inferred from mitochondrial DNA data. Mol. Phylogenet. Evol. 17:48-57.
12. Otte, D. 1992. Evolution of cricket songs. J. Orth. Res. 1:25-49.
13. Thornhill, R.Z. and J. Alcock. 1983. Sperm competition and the fertilization of eggs. In " The evolution of mating system" Harvard Univ. Press. London. 314-358.
14. Yang, J.T. and C. T. Yang. 1995. Morphology and male calling sound of *Brachytrupes portentocus* (Licht.) (Orthoptera : Gryllidae) from Taiwan. J. Taiwan. Mus. 48(2) : 1-9.
15. Yeh, W.B., Y.L. Chang, C.H. Lin, F.S. Wu, and J.T. Yang. 2004. Genetic differentiation of *Loxoblemmus appendicularis* complex (Orthoptera: Gryllidae): speciation through vicariant and glaciation events. Ann. Entomol. Soc. Am. 97:613-623.
16. Yeh, W.B., C.T. Yang, and S.C. Kang. 1997. Identification of two sibling species, *Ephemerella formosana* and *E. sauteri* (Ephemeroptera: Ephemeridae), based on mitochondrial DNA sequence analysis. Chin. J. Entomol. 17:257-268.

Phylogenetic Analysis of Crickets by Acoustic Behavior and Mitochondrial DNA Sequencing

Number :

Author : Jhe-Rong Wu

Title : Phylogenetic Analysis of Crickets by Acoustic Behavior
and Mitochondrial DNA Sequencing

School : Taipei Municipal Chien-Kuo Senior High School

Instructor : Jeng-Tze Yang, Jung-Yaw Lin, Yeh Wen-Bin,
Tsui-Hua Liu

Abstract

Crickets' voice was closely related to the behavior, and it is well known that female crickets of different species use the comprehensive acoustic behavior to distinguish their specific male. We selected several species of cricket from Taiwan to study the possible relationship between acoustic behavior and phylogeny. Crickets' voice was recorded digitally and analyzed by the software Cool Edit 2000. The resolution in acoustic features in terms of main frequency and time characteristics such as pulse number, chirp rate, and the length of chirp were different among species, though the minor frequency patterns appeared to be overlapping.

Moreover, we found that frequency characteristic differences among species were partially related to their phylogenetic relationship, which was not seen in temporal characteristics. The phylogeny of the crickets under study was also analyzed by amplifying the cytochrome oxidase I by polymerase chain reaction followed by DNA sequencing. The results were compiled and compared to the phylogenetic tree established by morphological characteristics. Our findings indicated that the DNA sequence analysis was correlated with morphological classification, while acoustic characteristics were only partially correlated. However, the difference of acoustic behavior could still be regarded as an identification index among species.

A. Introduction

a. Introduction of crickets

The crickets belong to taxonomic terms, *Orthoptera, Grylloidea*. There are more than 3,000 species of crickets recorded worldwide, and there are more or less of 100 species in Taiwan, and most of them tend to be ground dwelling. The geocole crickets in Taiwan numbered 53 species, of which 36 belong to Gryllidae. The local studies in Taiwan have addressed several species, e.g. *Brachytrupes portentosus*, *Gryllus bimaculatus*, etc., with the focus on both the morphology and the acoustic behavior (Yang *et al*, 1993).

b. The acoustic behavior of crickets

Dated back to Permian period, Orthopteroid insects like crickets first communicated with sounds. The acoustic behavior is based on the transmission of sound energy through air, which is today part of the standard procedures in taxonomy. After molting, the males make a chirping noise by erecting their forewings followed by rubbing together the strings of their right wings and the scrapers of the hind edges of the left wings. The noises can be roughly categorized into a few modes, e.g. calling sound, courtship sound, courtship interruption sound, post-copulatory sound, aggressive sound, and recognition sound. Most of the relevant studies have been focused on the calling sound, as biologist Fulton had reported that the calling sound is an important reproductive segregation mechanism between different species sharing a niche (Yang *et al*, 1999).

Wild crickets take turns making their noises, and those chirp the loudest have greater chances scoring the most females, given that they only respond to their own species. The females are able to distinguish every subtle nuance of the sounds, and they even make out those made by mixed species. Scientists believe it is the genetically regulated “pattern generator” within the crickets’ neuron cells that is behind this capability.

Moreover, males own goblet-like organs on the forewings which secrete pheromones. Scientists believe that pheromones are released while the males are making sounds by rubbing the forewings (矢島稔 *et al*, 1999).

c. Acoustic characteristics analysis

The acoustics adopted included three basic aspects: waveform, spectrogram, and sonography. The jargons used here include:

- 1、 Temporal characteristics: A chirp is composed of several pulses separated by pulse intervals, and chirps are themselves separated by chirp intervals. The duration of a chirp is called the chirp length, and the times of the chirp sounded within a given period of time is the chirp rate.
- 2、 Frequency characteristics: The main frequency is the highest point of a given frequency read, and the maximum range of the wave is called the main frequency range. (Yang, 1999)

While most attention is centered on the calling sound, descriptions of the courtship sound

are largely omitted from the studies of courtship behaviors. It was confirmed that crickets respond to noises with a specific frequency, however, these experiments were based on sounds with a monotone. Studies of the acoustic behavior aimed at pulses and chirps and so on with more than one frequency have rarely been conducted before (Faulkes and Pollack, 2001).

Overall, the acoustic behavior of crickets is related to the frequencies and rhythms. For different species sharing a niche, e.g. *Teleogryllus occipitalis* Serville, 1839 & *Teleogryllus mitratus* Burmeister, 1838, disparities in the frequency peak, pulse ratio, chirp length, or chirp interval might be accounted for in distinguishing oneself from others in the presence of intermixed noises. Based on the literatures, we designed a series of experiments to prove this point. By adopting digital recording technique, which is in ways such as, the sizes, quality of recording, and adjustability much more sophisticated than the conventional equipment, we are able to record and analyze the sounds of crickets in much easier fashions. In order to establish a taxonomic index for crickets by sounds, we locate the parities and disparities of the sound and frequency patterns between different cricket species and further compare the data with the morphology and DNA sequence analysis.

Nevertheless, we wish to use these experiments to understand the neglected relationship between the sounds and behaviors. And by using the modern technology, we also hope to reach a better understanding of courtship and establish a behavioral pattern of it. Finally, with the approaches of mechanical interference and sound editing, we wish to know more about the connection between courtship and acoustic behavior.

B. Motivations

- a、 To clarify the parities and disparities in the sound patterns and frequency of different species and to accordingly establish the taxonomic index based on acoustic analysis.
- b、 To strengthen the conventional taxonomy of crickets with DNA sequence data.
- c、 To define the sensing organs of crickets responsible for the function of mating.
- d、 To elucidate the responses female crickets have in the face of sound interference.

C. Materials and Methods

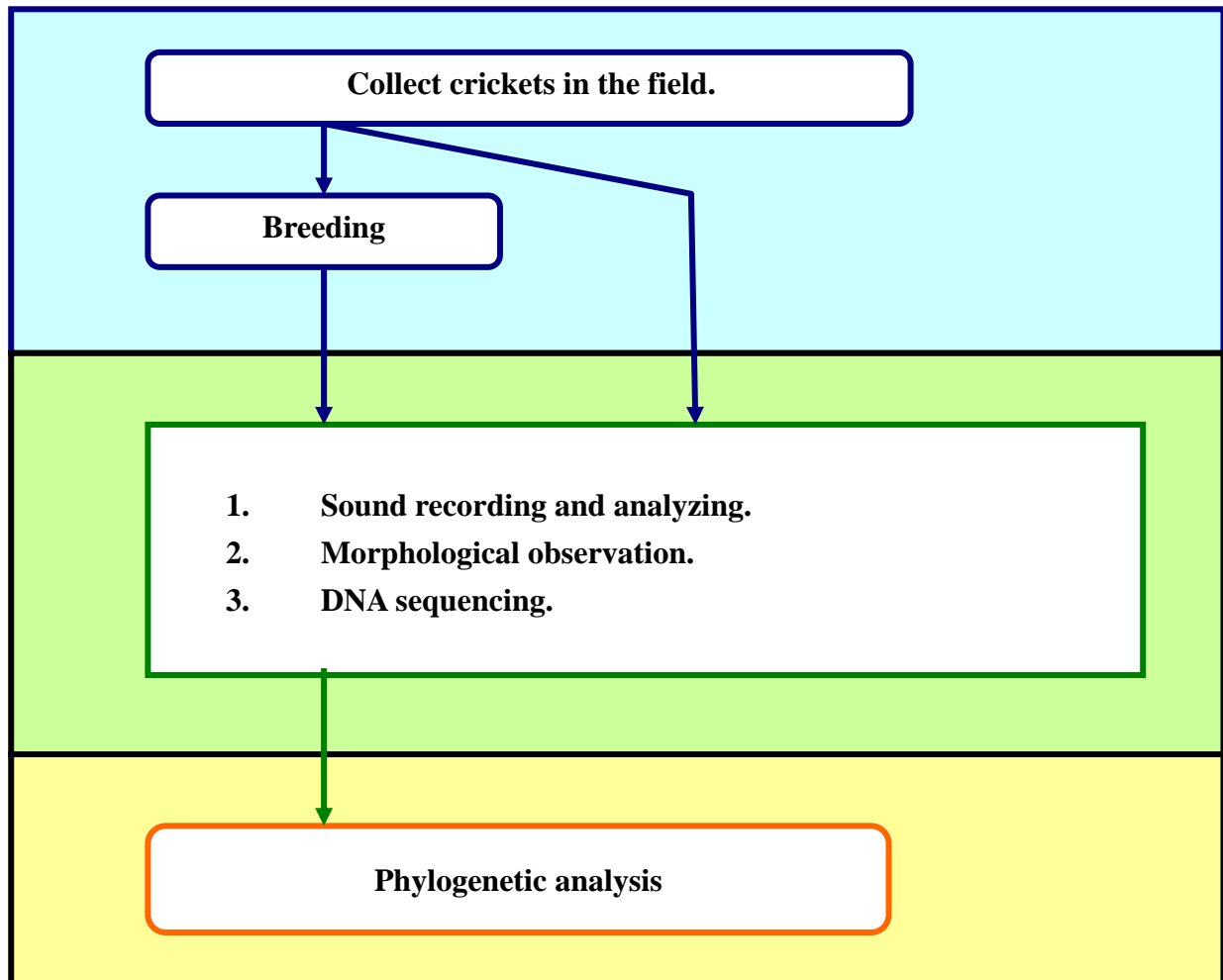


Fig. 1 Flowchart of experiments

a. Facilities and Materials

1. Resources of crickets

- (1) *Teleogryllus mitratus*
- (2) *Teleogryllus occipitalis*
- (3) *Loxoblemmus equestris*
- (4) *Loxoblemmus appendicularis*

2. Raising and observation equipments

- (1) Plastic cans (9.6 cm in diameter, 12.1 cm in height).
- (2) Plastic bottles (1.28 cm in diameter, 4.3 cm in height).
- (3) Sands.
- (4) Vegetables, dog foods.
- (5) Cotton, tweezers, alcohol.
- (6) Plastic observation boxes for breeding, a water vet, and a heating apparatus.

- (7) Digital recorder (Cenix VR P280 , SAMSUNG BR-1640 , SAFA SR-M292F)
- (8) Digital camera (Sony DSC V1)
- (9) Computer, acoustic analysis program Cool Edit2000, Printer.

3、 Equipments of DNA sequencing

- (1) Pipetteman (Gilson)
- (2) Electrophoresis (Mupid-2)
- (3) Vaccum (Sigma-2K15)
- (4) PCR Machine (GeneAmp 2700)
- (5) Incubator (First)
- (6) UV camera(Mutil Mage)
- (7) Other necessities



Fig. 2 Devices of grub keeping

4、 Mechanical interference

- (1) Mirror.
- (2) Photograph.
- (3) Transparent plastics.
- (4) Opacity plastics.
- (5) Glass cover.
- (6) Cricket model.



Fig. 3 Devices of imago keeping

5、 Solution prescription

- (1) Agarose : 2% agarose, 0.5%TAE buffer
- (2) Working solution : 0.5%TAE buffer



Fig. 4 Keep in the box.



Fig. 5 Warmer



Fig. 6 Box for observation

b、 Cricket handling

1. Resources of crickets

Teleogryllus occiptalis Serville,1839 (suburb of Sin Jhuang in Taipei, Hualien, Kaohsiung),
Teleogryllus mitratus Burmeister,1838 (suburb of Sin Jhuang in Taipei, Hualien, Kaohsiung),
and *Loxoblemmus equestris* Saussure,1877 and *Loxoblemms appendicularis* (suburb of Sin
Jhuang in Taipei, suburb of Junghe, Kenting) crickets are collected from the fields.

2. Cricket breeding

Put a group of larvae in the water vet and the observation box for breeding. Feed them water with moist cotton and dog food. Relocate mature larvae with wing buds to the plastic cans and pave the bottom of the cans with fine sand. Then, feed with water and dog foods. Use the heating apparatus to keep the temperature around 20-30 .

c、 Recording and analysis

1. Calling sounds

- (1) Filter out other noises.
- (2) Hanging a microphone in the mature male larvae breeding can and retaining the microphone from the bottom for about 8 cm to avoid the recording resistance.
- (3) While the crickets made the calling sounds, start to record the voices.
- (4) Edit the calling sounds with computer programs and take notes down.

2. Aggressive sounds

- (1) Filter out other noises.
- (2) Put two mature male larvae into the same breeding can. Hanging a microphone in the can and retaining the microphone from the bottom about 8 cm.
- (3) While the crickets made the attack warning voices, start to record the voices.
- (4) Editing the calling voices with computer programs and taking notes down.

3. Mating sounds (courtship, mating interruption, mating end, etc.)

- (1) Filter out other noises.
- (2) Put one mature male larva and one mature female larva into the same breeding can. Hanging a microphone in the can and retaining the microphone from the bottom for about 8 cm.
- (3) While the crickets make sounds to each other during mating, start to record the voices.
- (4) Edit the calling sounds with computer programs and take notes down.

d. DNA sequencing analysis

1. Crickets DNA extraction (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega)

- (1) Pull out cricket species medium leg and put into the homogenizer.
- (2) Add 120µl EDTA (0.5M) and 500µl Nuclei Lysis into the homogenizer.
- (3) Grind the medium leg to small pieces.
- (4) Collect the species to the microcentrifuge tube.
- (5) Add 17.5µl Protease K. into the tube and mix well.
- (6) Incubate the lysate at 55°C in water bath for 12 hrs.
- (7) Add 3µl of RNase Solution to the lysate and mix the sample by gentle shaking the tubes 2 – 5 times.
- (8) Incubate the mixture for 30 minutes at 37°C in water bath.
- (9) Chill sample on ice for 5 minutes.
- (10) Add 200µl of Protein Precipitation Solution and vortex for 20 seconds.
- (11) Chill sample on ice for 5 minutes.
- (12) Centrifuge for 4 minutes at 13000rpm.
- (13) Remove the supernatant 600µl and transfer it to a clean microcentrifuge tube containing 600µl of isopropanol.
- (14) Mix the solution by inversion for several times.
- (15) Centrifuge for 10 minute at 13000rpm.
- (16) Add 600µl of 75% ethanol and invert the tube several times.
- (17) Centrifuge for 2 minute at 13000rpm.
- (18) Remove the supernatant and dry the pellet with vacuum.
- (19) Add 100µl DNA rehydration solution and store the DNA at –20°C.

2. PCR

(1) Pharmaceuticals

Pharmaceuticals	volume (µ l)	Pharmaceuticals	volume (µ l)
dd H ₂ O	46.5	dNTP(2.5 µ M)	5
10X Reaction Buffer	5	Ex Taq	0.5
16S21(100 µ M)	1	sample(1ng/ µ l)	1
16S22(100 µ M)	1		

(C1-J-1718: 5'GGAGGATTCGGAAATTGATTAGTACC3')

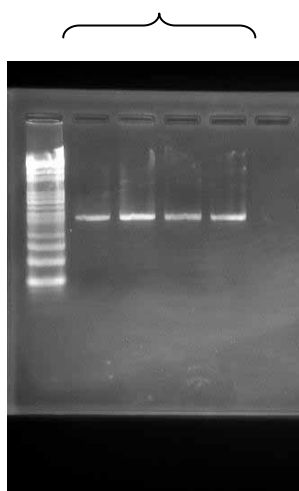
(C1-N-2329: 5'ACTGTAAATATGTGATGAGCTCA3')

(2) Reaction conditions

94	2min.	35cycles
94	50sec.	
50	40 sec.	
72	50 sec.	
72	10 min.	

3. PCR purification

- (1) Subjected the reaction products and analyzed through 2% agarose gel electrophoresis.
- (2) Cut the band correspond with COI and subject in quick spin column.
- (3) Add GEX buffer 700ml, and incubate at 50 .
- (4) Centrifuge for 2 minutes at 13000rpm.
- (5) Add WF buffer 500ml, sentrifuge for 2 minute.
- (6) Add WS buffer 700ml, sentrifuge for 2 minute.
- (7) Transfer it to a clean microcentrifuge tubeand
- (8) Subject to DNA sequencer and analyze.



From the left side

1. Marker
2. *Teleogryllus occiptalis*
3. *Teleogryllus mitratus*
4. *Loxoblemmus equestris*
5. *Loxoblemms appendicularis*

Fig. 7 PCR Products

D. Results

a. The acoustic characteristic of crickets

1. The comparison of crickets' sound.

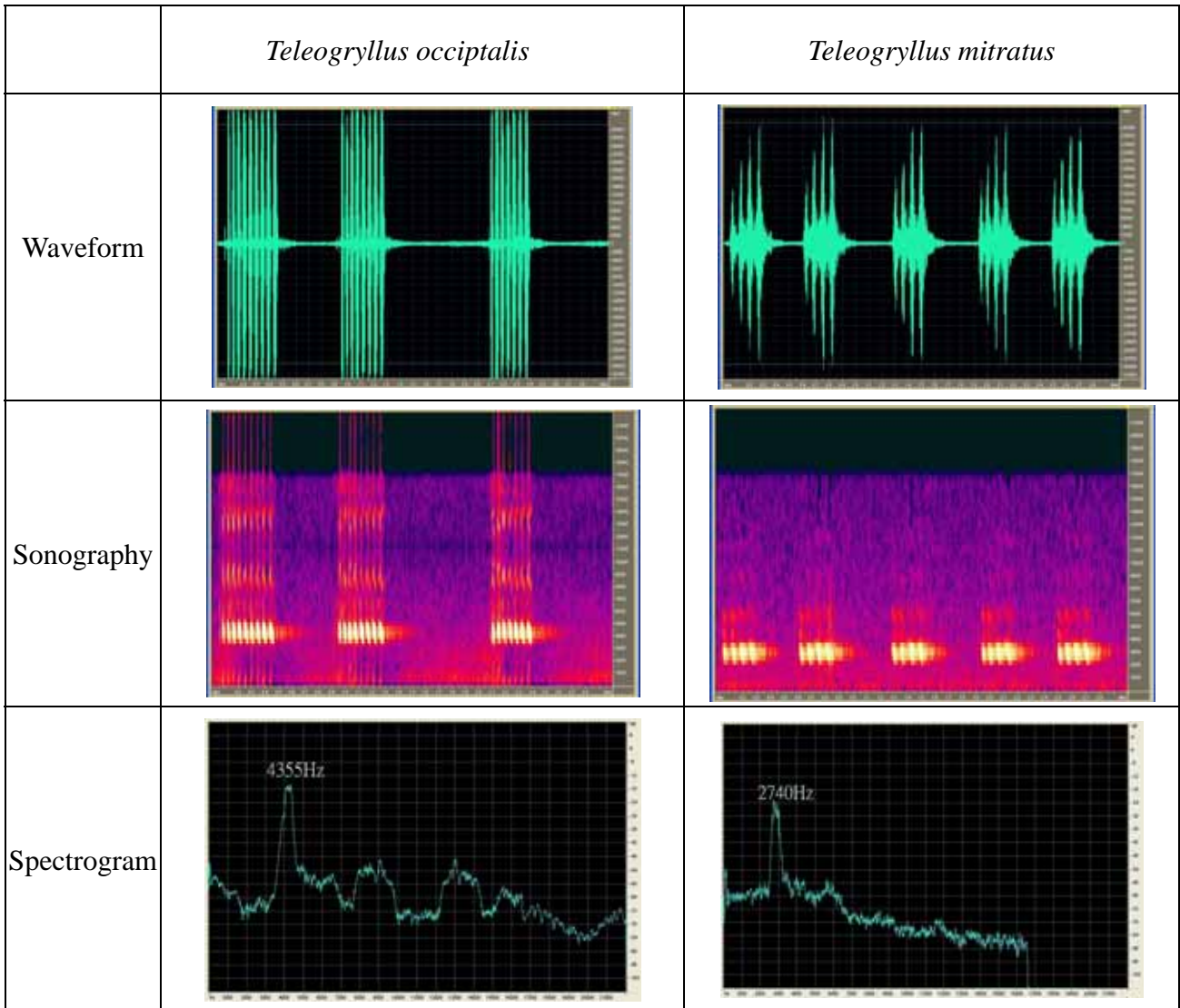


Fig. 8 The acoustic analysis of *Teleogryllus occiptalis* and *Teleogryllus mitratus*

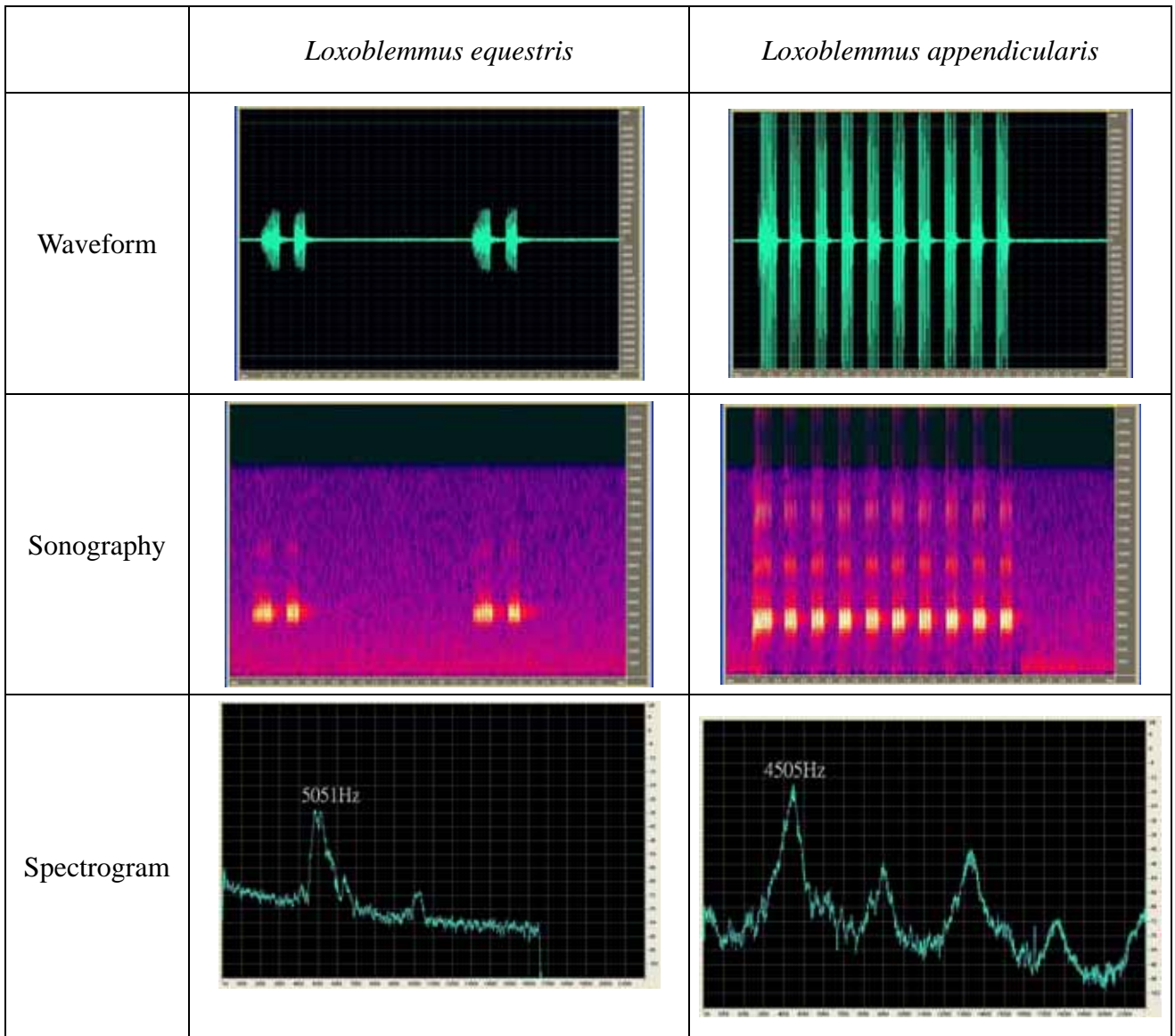


Fig. 9 The acoustic analysis of *Loxoblemmus equestris* and *Loxoblemmus appendicularis*

Table 1 Acoustic analysis of four species of crickets

		<i>T. occipitalis</i>	<i>T. mitratus</i>	<i>L. equestris</i>	<i>L. appendicularis</i>
Frequency characteristics	Main frequency	4,355 Hz	2,740 Hz	5051Hz	4,505 Hz
	Frequency range	1,500 Hz	800 Hz	1,600 Hz	2,000 Hz
Temporal characteristics	Chirp rate	2.1 /sec	1.3 /sec	0.7 /sec	2.8 /sec
	Pulse ratial	6~9	4~6	2~7	6~9
	Pulse rate	0.04 /sec	0.07 /sec	0.25 /sec	0.15 /sec
	Chirp length	0.58 sec	0.65 sec	1.50 sec	0.26 sec

Comparison of frequencies of sound among different cricket species (Fig. 4), the frequency ranges of the four tested crickets shared overlapping, regions but with differences in its main frequencies.

The main frequency difference might be one of the reasons for *Teleogryllus occipitalis* and *Teleogryllus mitratus* crickets to set themselves apart from each other.

However, for crickets belonging to different genera, e.g. *L. appendicularis* and *Loxoblemmus equestris*, revealed much overlapped main frequencies. It was therefore not appropriate to quickly adopt main frequency as a good factor for species verification.

By comparing the chirp rates and pulse rates, there are dramatic differences showed among four genera. The pulse rates are more close to the phylogenetic relationships of crickets.

These results implied the insufficiency of the main frequency alone for species verification, but the temporal characteristics seen to be proper characters for identification.

2. The relationship of four crickets based on morphology



T. occipitalis

T. mitratus

L. equestris

L. appendicularis

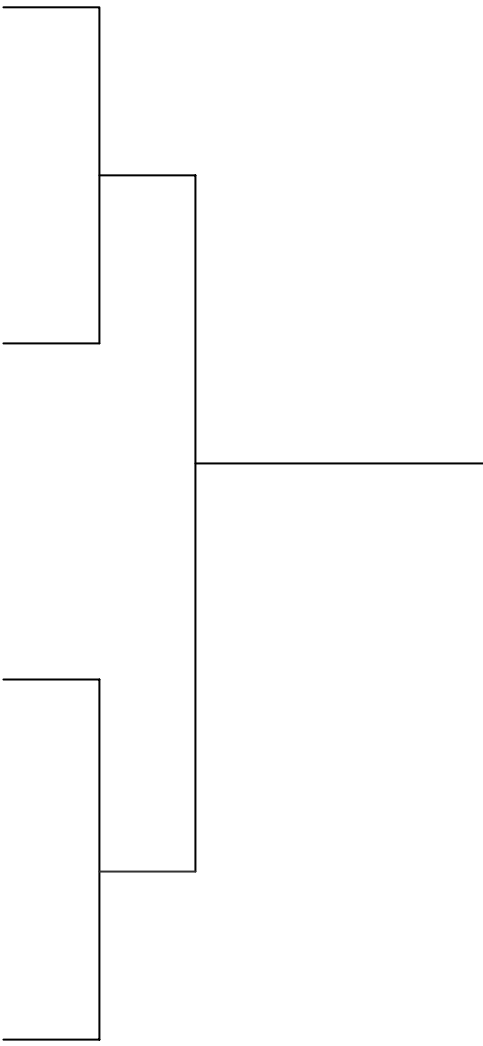


Fig. 10 Phylogenetic relationship based on Morphology

Partial DNA sequences, length from 1,718 to 2,329 of the cytochrome oxidase I in four species of crickets are shown in Fig. 11

T_occipitalis	CGGATAAATAATATAAGATTTTGGATTATTACCACCATCATTAACTCTCCTATTAACCAGA	60
T_mitratus	CGAATAAATAACATAAGATTTTGGATTATTACCACCCTCACATAACTTTTATTAACCAGA	60
L_equestris	CGAATAAACCAATATAAGATTCTGACTTCTCCACCATCATTAAACCCTCCTGTTATCAAGA	60
L_appendicularis	CGTATAAATAACATAAGATTTTGGATTACTTCCACCTTCATTAAACCCTTCTATTATCAAGA	60
T_occipitalis	AGAATAGTTGAAAATGGTGCAGGAACAGGATGAACAGTATATCCACCTTTATCAACTGGT	120
T_mitratus	AGATTAAATTGAAAATGGTGCAGGAACAGGATGAACAGTATACCCACCTTTATCTACTGGT	120
L_equestris	AGAATAGTTGAAAATGGTGCAGGTACAGGGTGAACAGTATACCCCCTTTATCGGCAGAA	120
L_appendicularis	AGAATGGTTGAAAATGGTGCAGGAACCGGATGAACGGTTATCCACCTTTATCAGCAGAA	120
T_occipitalis	ATTGCCCATGCAGGAGCATCAGTTGATTTAGCCATTTTCTCGTTACATTTAGCGGGAATT	180
T_mitratus	ATTGCTCATGCTGGAGCATCAGTTGATTTAGCTATCTTTTCTTTACATTTAGCAGGAATT	180
L_equestris	ATTGCACATGCAGGAGCATCAGTAGATCTTGCCATTTTCTCTTTACATTTAGCGGGAATT	180
L_appendicularis	ATCGCACACGCTGGTGCATCAGTAGATTTAGCCATCTTCTCCTTACACTTAGCAGGAATT	180
T_occipitalis	TCTTCGATTCTAGGAGCTGTAAATTTTATTACAACCATAATCAATATACGAGCACCTGGA	240
T_mitratus	TCTTCAATTCTAGGGGCTGTAAATTTTATTACAACAATAATTAATATACGAGCACCTGGA	240
L_equestris	TCATCAATTCTAGGAGCAGTCAATTTTATTACAACCATAATTAATATACGTGCTCCGGGA	240
L_appendicularis	TCATCAATTCTGGAGCAGTTAATTTTATTACAACCATAATTAATATACGTGCTCCAGGT	240
T_occipitalis	ATATCAATAGATCAAACACCTTTATTTGTATGAGCTGTTGGTATTACTGCTCTTTTACTA	300
T_mitratus	ATATCCTTAGATCAAACACCAATTATTTGTATGAGCTGTTGGTATCACAGCCCTTTTATTA	300
L_equestris	ATATCTTTAGATCAAACCTCTTTATTTGTTTGGAGCGGTAGGTATCACTGCATTACTACTT	300
L_appendicularis	ATAAACTTAGATCAAACCTCTTTATTTGTTTGGAGCAGTAGGAATTACTGCATTACTTCTT	300
T_occipitalis	TTGTTATCATTACCAGTATTAGCTGGTGGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTA	360
T_mitratus	CTTTTATCATTACCAGTACTAGCTGGTGGCTATTACAATATTATTAACAGATCGAAATTTA	360
L_equestris	CTACTTTTATTACCAGTCTTAGCAGGTGGCTATTACAATATTATTAACAGACCGAAATTTA	360
L_appendicularis	CTTCTTTTATTACCAGTCTTAGCAGGTGGCTATTACCATACTACTGACAGATCGAAATTTA	360
T_occipitalis	AATACCTCATTTTTTTGACCCTGCAGGGGGAGGTGATCCTATTCTATATCAACATCTATTT	420
T_mitratus	AATACATCATTTCTTTGATCCTGCAGGAGGAGGAGATCCTATTCTATATCAACATTTATTT	420
L_equestris	AATACATCATTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGGTGATCCAATTTTATATCAACACTTATTT	420
L_appendicularis	AATACGTCATTTTTTTGATCCTGCTGGTGGTGGAGATCCAATTTTATATCAACATTTATTT	420
T_occipitalis	TGATTTTTTTGGACATCCAGAAGTTTATATTCTTATTTTACCGGGATTTGGTATAATTTCT	480
T_mitratus	TGATTTTTTTGGACATCCTGAAGTTTACATTCTCATTTTACCGGGATTTGGATAATTTCT	480
L_equestris	TGATTTTTTGGTCATCCAGAAGTATATATTTTAAATTTTACCAGGATTTGGTATAATCTCT	480
L_appendicularis	TGATTTCTTTGGTCACCCAGAAGTTTACATTTTAAATTTTACCAGGATTTGGGATAATCTCC	480

T_occipitalis CATATTATTAGACAAGAAAGAGGAAAAAAGGAAGCATTTCGGAACATTAGGAATAATTTAT 540
 T_mitratus CATATTATTAGACAAGAAAGAGGAAAAAAGGAAGCATTGGAACTCGGAATAATTTAT 540
 L_equestris CATATTATTAGCCAAGAGAGAGGGAAAAAAGAAGCATTGGAACTAGGCATAATTTAT 540
 L_appendicularisCACATCATTAGTCAAGAAAGAGGAAAAAAGAAGCATTTCGGAACATTAGGAATAATTTAC 540

 T_occipitalis GCCATACTAGCCATTGGTTTATTAGGATTTGTTGTATGAGCTCC 584
 T_mitratus GCCATATTAGCTATTGGATTATTGGATTTGTTGTCTGAGCTCA 584
 L_equestris GCCATATTAGCTATCGGTTTATTAGGCTTTGTAGTATGAGCTCA 584
 L_appendicularisGCCAATGTTAGCTATTGGATTATTAGGATTTGTAGTGTGAGCCCA 584

Fig. 11 Partial DNA sequences of four species of crickets

Differences are concluded and shown in Table 2

	<i>T. occipitalis</i>	<i>T. mitratus</i>	<i>L. equestris</i>	<i>L.appendicularis</i>
<i>T. occipitalis</i>	0%	-	-	-
<i>T. mitratus</i>	9%	0%	-	-
<i>L. equestris</i>	15%	16%	0%	-
<i>L.appendicularis</i>	17%	17%	13%	0%

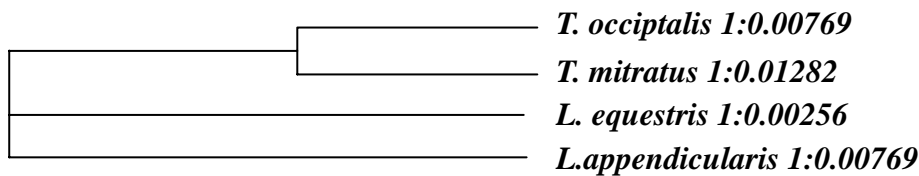


Fig. 12 Phylogenetic tree based on DNA sequences

E. Discussion

a. Features of sounds between different species

Comparison of frequencies of sound among different cricket species

According to the data in Fig. 8,9 and Table I, the frequency ranges of the four tested crickets shared regions of overlap, with differences in its main frequencies. The main frequency difference might be one of the reasons for *Teleogryllus occiptalis* and *Teleogryllus mitratus* crickets to set themselves apart from each other. However, for crickets belonging to different genera, e.g. *Teleogryllus occiptalis* and *Loxoblemmus appendicularis*, revealed much overlapped main frequencies. It was therefore not appropriate to quickly adopt main frequency as a good factor for species verification. These results implied the insufficiency of the main frequency alone for species verification.

From the results illustrated in Fig. 8,9 and Table I, *Teleogryllus occiptalis*, *Teleogryllus mitratus* and *Loxoblemmus appendicularis* revealed chirps with a pulse rate read 6, but ranged differently. Encompassing the ranges of the above three, *Loxoblemmus equestris* pulse ratio ranged from 2 – 7, significantly differed from that others.

Data listed Table I also revealed differences in chirp lengths among them – the chirp lengths of *Teleogryllus occiptalis*, *Teleogryllus mitratus*, and *Loxoblemmus appendicularis* usually lasted less than one second, while *Loxoblemmus equestris* seemed longer.

By comparing the chirp rates and pulse rates, there are dramatic differences showed among four genera. The pulse rates are more close to the phylogenetic relationships of crickets. These results implied the insufficiency of frequency characteristics alone for species verification, but the temporal characteristics seen to be proper characters for identification.

b. Morphology characteristics

We have completed an unrooted phylogentic tree (Fig. 10) based on the conventional morphological taxonomy. According to the tree, we can easily get an idea of the relationships among the four listed species. Detectably, both *Teleogryllus occiptalis* and *Teleogryllus mitratus* belong to the genus *Teleogryllus*, and *Loxoblemmus equestris* and *Loxoblemmus appendicularis* belong to the genus *Loxoblemmus*.

c. Comparison between Cytochrome Oxidase I DNA sequence analysis and morphology

According to the data in Table 2, *Teleogryllus occiptalis* and *Teleogryllus mitratus* share a closer sequence pattern than the other samples, which conformed to those defined by morphological taxonomy. This revealed a consistency in the analyses of DNA sequencing and morphology. The conservedness of Cytochrome Oxidase I DNA adopted in the experiments implied that it is useful in taxonomy in support of other taxonomic methodologies

d. Relationship between sound features and morphology characteristics

From the sound analyses and comparisons conducted above, we have concluded that sound of different measures as mentioned is somewhat correlated, but not consistent, with the other features in taxonomy. An obvious example was that we have observed species within a genus revealed sounds with greater variations than those of different genera. This result contradicted those confirmed by both morphology and DNA sequence analysis, but why is that? We have made discussions based on this point.

The processes of speciation certainly encompass a series of geographic and behavioral segregations, which rendered them separate reproductively before a physiologically or non-physiologically. “Reproductive segregation” mechanism is established. Most insects have fixed habitats, or technically termed “territory”. While different populations of one species located in different regions naturally can’t mate (without physical contacts), insects of different species sharing a territory reach the reproductive segregation by means other than simply geographic reasons. Sound is, like other features, evolutionarily shaped, and sometimes this characteristic is adopted as a means to reach segregation, and even speciation (Otte *et al*, 1992). For Orthopteroid crickets, the importance of sounds in intra-species communications is greatly appreciated since a slight change can lead to the failure of talking. This in turn might contribute to the preservation of the gene pool integrity within the species. Similarly, *Teleogryllus occiptalis* and *Teleogryllus mitratus* share a niche, and they are able to avoid confusion with the other species by distinguishable sounding patterns, which greatly circumvents a potential intermix of the two separated gene pools.

e. The importance of sound features to classification

In conclusion, it is difficult to establish a taxonomic index based on our present data regarding the sounding patterns of the tested species. More sound recording and comparisons need to be done for that purpose. However, it is unanimous that specific sound patterns of each species are valuable for species verification. Morphology alone is sometimes confusing in taxonomy given the unreliability of the shape and color of wild crickets. The uniqueness of sounds is therefore an alternative way to substantiate the classifications in the absence of a strong morphological confirmation.

F. Conclusions

- a. The acoustic analysis revealed significant differences among different species, indicating this analysis is useful for identification of cricket species. From the DNA analysis of the four cricket species revealed a correlation with the pulse rates, but not other characteristics of the sounds.
- b. However, my overall data show that the characteristics of cricket sound cannot be used as a general parameter for phylogenetic analysis. Rather, morphology and DNA sequence analyses are more reliable and consistent in this aspect.
- c. Analysis of DNA sequence of mitochondrial cytochrome oxidase I (1,718~2,329 bp) was in analogy to the results obtained from the morphology analysis. This indicates that DNA sequencing is useful for classification of cricket.

A. Future research

1. To continue with the DNA sequence analysis of more different species and compare the data for further studies of the relationship between variations of sounds and populations.
2. With DNA sequence analysis and acoustics, to understand the variations between similar species or within a species, especially those among different populations of *Teleogryllus occipitalis* and *Teleogryllus mitratus*.
3. To clarify the mechanisms of how a female cricket recognizes sounds from males of its own species by editing the recorded sounds, e.g. by increasing the pulse rate or extending the chirp lengths, etc., and observing the responses of females.
4. To corroborate our models in the hope to extend our research in other chirping insect ecological studies and the taxonomy.

G. References

1. Faulkes, Z, and G.S. Pollack (2001) Mechanism of frequency-specific responses of omega neuron in cricket (*Teleogryllus Oceanicus*): A polysynaptic pathway for song? J. Exp. Biol. 204:1295-1305.
2. Huang, Y., G. Orti, M. Sutherlin, A. Duhachek, and A. Zera (1999) Phylogenetic relationships of North America field crickets inferred from mitochondrial DNA data. Mol. Phylogenet. Evol. 17: 48-57.
3. Yang, J.T., and C.T. Yan (1995) Morphology and male calling sound of *Brachytrupes portentococus* (Licht.) (Orthoptera: Gryllidae) from Taiwan. J. Taiwan.Mus. 48(2): 1-9.
4. Yeh, W.B., Y.L. Chang, C.H. Lin, F.S. Wu, and J.T. Yang (2004) Genetic differentiation of *Loxoblemmus appendicularis* complex (Orthoptera: Gryllidae): speciation through vicariant and glaciation events. Ann. Entomol. Soc. Am. 97: 613-623.
5. Yeh, W.B., C.T. Yang, and S.C. Kang (1997) Identification of two sibling species, *Ephemera formosana* and *E. sauteri* (Ephemeroptera: Ephemeridae); based on mitochondrial DNA sequence analysis. Chin. J. Entomol. 17: 257-268.