2016 年臺灣國際科學展覽會
優勝作品專輯

作品編號　**050006**

參展科別　動物學

作品名稱　新種三尾扁蟲光行為與共生藻的互利共生

得獎獎項　大會獎：二等獎

就讀學校　國立科學工業園區實驗高級中學

指導教師　揭維邦

作者姓名　羅建雄、葉昌庭

關鍵字　三尾扁蟲(*Convolutriloba*)、

共生藻(*Zoochlorellae*)、

光避性與光聚性(Photophobia and

Photoaccumulation)

作者簡介

姓名：葉昌庭

學校：新竹科學工業園區實驗高級中學數理資優班

自我簡介：平時興趣是聽西洋音樂與彈吉他，參加學校的吉他社以及學生自治會，並且擔任幹部，在校內積極參與各項活動，亦有在校外舉辦成果發表會，此外亦有出國進行國際志工服務。在數理科目中特別喜歡生物，因此選擇做生物的專題研究，除了數理外，也對語言頗有興趣，不僅持續學習英文，目前也正學習法語。

姓名：羅建雄

- 個性：喜歡交朋友、聊天、容易緊張
- 興趣&專長：球類運動(特愛籃球)、生物研究
- 特殊經歷：至菲律賓擔任國際志工

摘要

三尾扁蟲(*Convolutriloba*)至今尚無野生棲地的觀察記錄，本研究自水族缸裡採集的扁蟲經外型描述、無性生殖以及 DNA 親緣關係等比對結果，證明是台灣特有的新種。本研究首次於墾丁外海發現野生三尾扁蟲棲地，其多棲息於礁石洞口，與水族缸內散布情形大有不同，因此我們設計模擬棲地使其在黑暗與光照交替的環境下生存，確認扁蟲的自然分布乃是光避性(photophobia)與光聚性(photoaccumulation)彼此調節的結果。Shannon 曾指出三尾扁蟲具有光避性與光聚性，卻未探討其原因。比較扁蟲以及其體內共生藻(*Zoochlorellae*)在不同色光下的生理現象，共生藻紅光下光反應效率高，而扁蟲在紅光下不具光避性；其他色光下共生藻光反應效率低，則扁蟲有明顯光避性。此項發現正說明了為何扁蟲會有光避性與光聚性行為，以及扁蟲野生棲息地位於礁石洞口的原因。

Abstract

The natural habitats of *Convolutriloba* have not been reported so far. In this research, one new species has been discovered and recorded from natural habitat. Further evidence has resulted from external morphology, asexual reproduction and phylogenetic analysis of COI gene sequence. Additionally, the research discovered the natural habitats of this new species, located in Kenting's offshore, but only around gloomy holes of sandy bottom in coral reefs. The phenomenon is believed to be different from that in aquarium; thus, a stimulator habitat has been designed for further investigation. The research has confirmed that the distribution of *Convolutriloba* in its habitats is highly related to its photo-behavior patterns known as photophobia and photoaccumulation. Shannon indicated the two photo-behavior patterns of *Convolutriloba,* but lack of explanation. Comparing the different physiological reactions of the acoels and the symbiotic algae (*Zoochlorellae)*, this research shows that the efficiency of light reaction of photosynthesis in algae is higher under red lights, while less efficiency is recorded under other light wavelengths. On the other hand, the acoels were unresponsive to red lights but appeared to be highly photophobic to other light wavelengths. The results clearly explained the reason why the natural habitats of *Convolutriloba* are merely located around gloomy holes and what causes their photo-behavior patterns.

一、前言

(一)研究動機

長期觀察下發現三尾扁蟲*(Convolutriloba)*，不需要進食，便可存活長達三個月，甚至能進行無性繁殖，在基礎生物(一)第六章中，我們知道一個穩定的生態系具備穩定的物質與能量循環，扁蟲的生存與繁殖過程顯然需要相當的能量來源，那麼它所需的能量從何而來呢？

三尾扁蟲的能量完全依賴體內共生藻——蟲綠藻*(Zoochlorellae)*行光合作用(Shannon *et al*., 2007)，在基礎生物(一)第六章中可知，不同物種間的共生關係會對彼此的行為模式產生影響。我們觀察到扁蟲特殊的行為模式與體內的共生藻，以其生存環境中的光有密不可分的關係，因此，我們著手實驗，觀察扁蟲於不同光環境下所表現的行為模式，探討其特殊的光行為與體內共生藻的關聯性，並破解他們特殊的共生機制。

研究過程中還有另一個重大的發現是，以往的論文都是在水族缸中取得扁蟲樣本，由於水族缸中的生物與石頭多來自屏東，在一番追本溯源下，年初時，我們成功在屏東紅柴坑附近海域約 8 公尺深的區域發現野生扁蟲的棲地，這也是全球第一次在野外觀察到扁蟲，使我們可以直接觀察扁蟲在野外的生存方式，並印證諸多的實驗結果。

(二)研究目的

- 利用無性生殖型態、構造觀察、COI 基因序列等證據鑑定其品種。
- 探討扁蟲在不同波長色光下避光行為的程度是否有差異
- 探討體內蟲綠藻的光反應效率是否受色光環境影響
- 以共生行為的角度解釋扁蟲光避性、光聚性以及野外棲地特殊分佈的原因

二、研究過程及方法

(一)研究設備及器材

1、硬體設備

(1)使用器材

離心機	振盪器
離心管	紅色濾光片
顯微光譜儀	自製長型跑道
自製模擬棲地	恆溫振盪器
雙眼複視光學顯微鏡	切片機
玻片染色架	烘片機

防水相機　　PCR 反應儀

UV 光掃描儀　　電泳設備

圖 3-1-1 自製模擬棲地

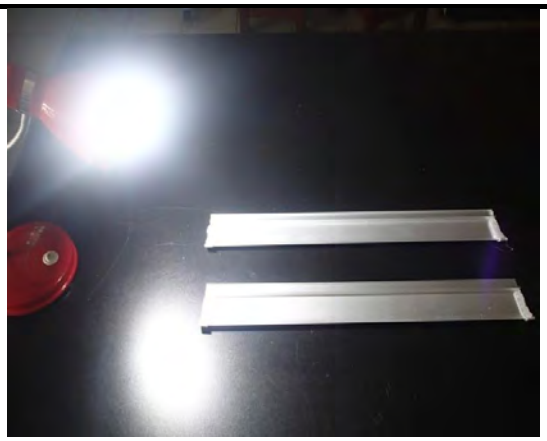
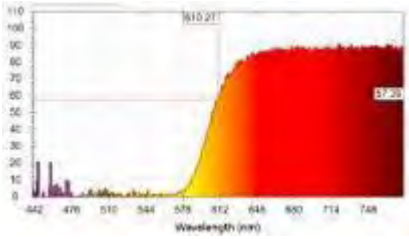
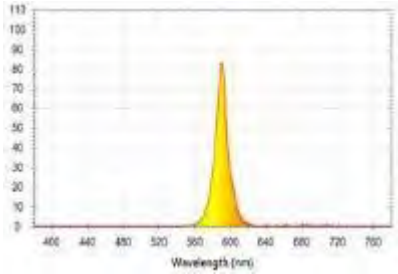
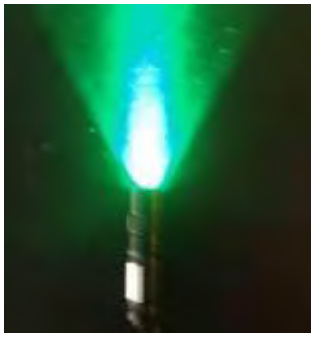
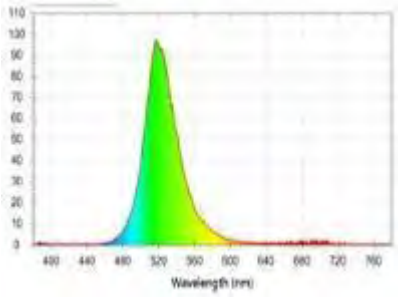
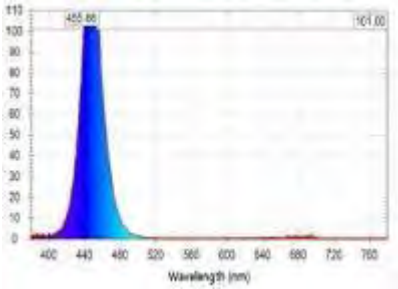


圖 3-1-2 自製長型跑道

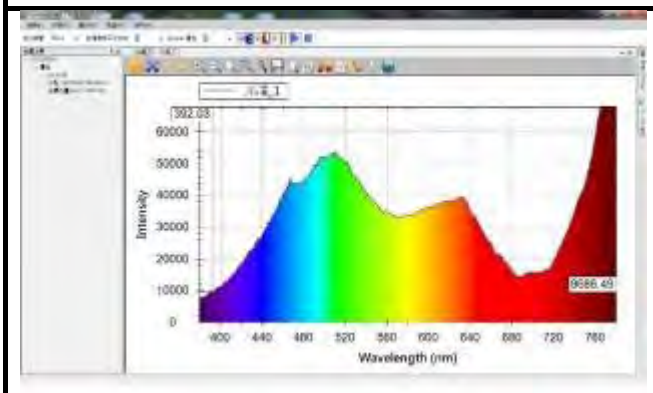
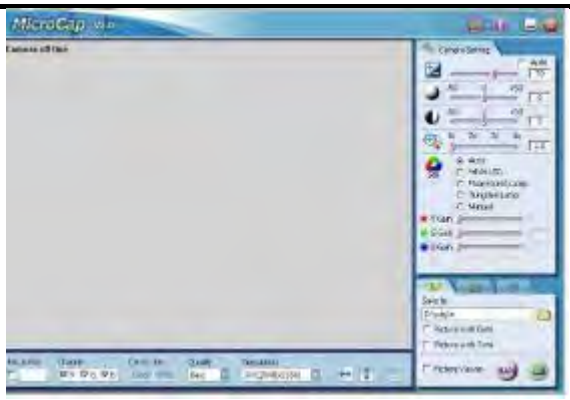
圖 3-1-3 切片機

圖 3-1-4 照度計

(2)、各色純色光光與其光譜(實驗前測試)：

LED 雙頭燈+紅色濾光片 波長範圍：500~750(nm)		
LED 燈條(黃) 波長範圍：570~620(nm)		
LED 手電筒(綠) 波長範圍：500~560(nm)		
LED 手電筒(藍) 波長範圍：420~470 (nm)		

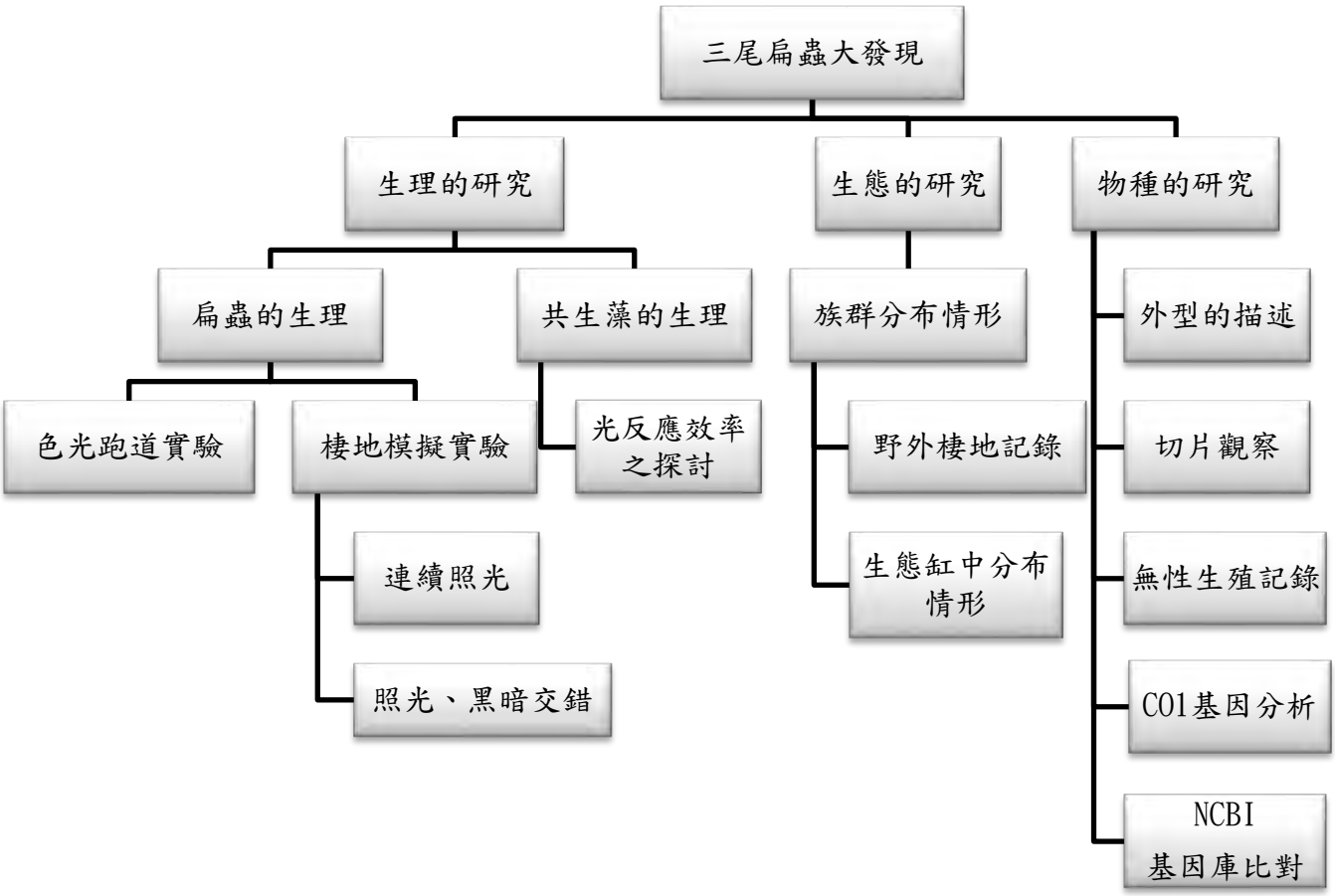
(3)使用軟體：

Spectrasmart (光譜儀電腦端程式)操作介面)	Microcap v3.0 (顯微鏡電腦端程式)操作介面)
	

(二)研究流程

1. 物種的鑑定
   (1) 型態分析
   (2) 無性生殖紀錄
   (3) 切片觀察
   (4) 基因分析(使用 COI 基因)、NCBI 基因庫比對
2. 三尾扁蟲(*Convolutriloba)*之生理研究
   (1) **【實驗一、連續黑暗實驗】**連續黑暗與生存率之關係
   (2) **【實驗二、色光跑道實驗】**扁蟲在不同色光環境下的避光行為差異
   (3) **【實驗三、族群散布實驗】**不同底棲是否影響扁蟲散布情形，與野生棲地比較
   (4) **【實驗四、棲地模擬實驗】**扁蟲野外棲地之模擬，並探究其特殊散布情形之因
3. 三尾扁蟲(*Convolutriloba)*體內共生藻(*Zoochlorellae*)之生理研究
   (1)**【實驗五、光反應效率實驗】**-不同色光下共生藻的光合作用效率比較

4. 實驗架構圖



(二)實驗步驟

【組織切片標本製作】

說明：製作三尾扁蟲的標本，以利顯微鏡觀察。

使用藥劑：

- 酒精(70%,95%,99.5%)
- 固態固定液(主成分為 24%福馬林)
- 二甲苯替代品(substitute of xylene)
- 蘇木素(Haematoxylin)
- 伊紅(Eosin)
- 加拿大香脂(Canada Balsam)

1. 標本製作步驟——組織切片(tissue)：

(1) 固定(fixation)：

I. 將愈固定的扁蟲用滴管滴於濾紙上。

II. 在未完全乾透前迅速將整張濾紙移至預先冷凍的固態固定液上。

III. 靜置於室溫下，直到固定液完全液化，且標本部分脫離濾紙。

IV. 輕輕的將標本由濾紙拭起，進行脫水步驟。

(2) 脫水(dehydrate)：

I. 將標本置入 70%酒精中 10 分鐘。

II. 將標本置入 95%酒精中 10 分鐘，重複兩次。

III. 將標本置入 99.5%酒精中 10 分鐘，重複兩次。

(3) 透明(clearing)：

I. 將標本置入 99.5%酒精與二甲苯替代品(substitute of xylene)等比例混和溶液中 15 分鐘。

II. 將標本置入二甲苯替代品中(substitute of xylene)15 分鐘。

(4) 浸潤(infiltration)：

(1) 將標本置入軟蠟與二甲苯替代品等比例混合的溶液中(約 55 度)，浸潤 15 分鐘。

(2) 將標本置入熔融 100%軟蠟中，並浸潤 20 分鐘。

(5) 包埋(embedding)：

I. 在鐵模中注入軟蠟至一半的高度。

II. 將標本移入軟蠟中，並細調使之垂直立起。

III. 靜置軟蠟，使其些許凝固，再加入軟蠟使鐵模完全被蠟覆蓋。

IV. 待蠟塊完全凝固後即可切片。

(6) 切片(cutting)：

I. 將蠟塊固定於木塊上並修整蠟塊成等腰梯形體。

II. 使用切片機進行切片。

III. 將切下含有組織的蠟薄片浸貼於微濕的玻片上

IV. 放入烘片箱

(7) 蘇木素-伊紅染色(Haematoxylin-Eosin staining)：

I. 將標本放入玻片染色架中

II. 逆向進行透明與脫水步驟，並將時間縮減為每步驟 3 分鐘

III. 將標本浸入蒸餾水中 3 分鐘

IV. 將標本浸入蘇木素中數秒鐘

V. 將標本放入裝水容器中，並使水持續流動，等待蘇木素完全氧化

VI. 將標本浸入 70%酒精後約 3 分鐘後，放入伊紅約 1 分鐘

VII. 進行脫水與透明步驟，並將時間縮減為每步驟數秒鐘

(8) 封片(mounting)

I. 僅保留些許二甲苯於標本玻片上，即可進行封片

II. 塗抹二甲苯稀釋後的加拿大香脂(Canada balsam)，使其形成一薄層，並放置蓋玻片

III. 將封片後標本玻片放入烘片機，等待完全密封後，於玻片上記錄標本資訊即完成組織切片標本。

2. 標本製作步驟——全埋標本(wholemount)：

說明：製作全體扁蟲的標本利於顯微鏡觀察。

步驟：進行上述**脫水、透明、(染色)、封片**步驟即可完成全埋標本。

存放位置：目前全埋標本與切片標本暫存於本校中，之後將會移至適當的保存機構做儲存。

【基因分析】

說明：取出扁蟲 DNA 加以純化，透過 PCR 擴增 DNA 數量，透過電泳檢驗樣本是否成功，並將成功的 DNA 取樣交由專業 DNA 定序公司進行定序。

使用藥劑:

1. MasterPure ™ Complete DNA Purification Kit:
   (1) Tissue and Cell Lysis Solution
   (2) MPC Protein Precipitation Reagent
   (3) Proteinase K (50μg/μL)
   (4) TE buffer
2. 異丙酮(isopropanol)
3. 85%酒精
4. 氯化鎂溶液
5. Mastermix(主成分為 dNTP)
6. 螢光色素
7. DNA marker

步驟：

1.純化：

(1) 將扁蟲標本放入微量離心管中。

(2) 加入 1μL Proteinase K(50 μg/ μL)至管中。

(3) 加入 300 μL Tissue and Cell Lysis Solution 至管中。

(4) 使用研磨馬達對標本進行研磨。

(5) 放入恆溫震盪機保持 65℃持續 15 分鐘，並且每 5 分鐘震動攪拌 15 秒。

(6) 加入 150μL MPC Protein Precipitation Reagent 至管中，並搖晃 15 秒使其完整混合。

(7) 在超過 10000g 的轉速下離心 10 分鐘使蛋白質沉澱。

(8) 將上部澄清液轉移至另一乾淨微量離心管，並丟棄蛋白質沉澱。

(9) 加入異丙酮至澄清液，搖晃微量離心管數十次。

(10) 離心 10 分鐘，使 DNA 沉澱。

(11) 小心地倒出異丙酮。

(12) 滴入 85%乙醇，清除剩餘的異丙酮，重複兩次。

(13) 放入真空離心機，以去除剩餘乙醇。

(14) 加入 TE buffer 使 DNA 重新分散。

3. 聚合酶連鎖反應(PCR):

(1) 加入引子 DID2 fw1 與 DID2rev2 各 1 μL 至管中。

(2) 加入無菌去離子水(distilled deionized water) 7μL 至管中。

(3) 加入 1μL 氯化鎂溶液至管中。

(4) 加入 10μL Mastermix。

(5) 加入純化後的 DNA 樣本。

(6) 放入 PCR 儀器中進行反應。

4. 確認 DNA 樣本：

(1) 加入螢光色素。

(2) 將含有螢光色素的樣本滴入瓊脂糖凝膠中。

(3) 將含有螢光色素的 DNA marker 滴入瓊脂糖凝膠中。

(4) 進行電泳。

(5) 將電泳結果放入 UV 光掃描儀中，檢視結果。

(6) 將成功的 DNA 樣本儲存並送至專業 DNA 定序公司進行定序。

親緣關係樹

1. 形態學分析:

(1) 使用軟體:MEGA6，http://www.megasoftware.net/ (十三)

(2) 特徵編碼:利用外表特徵、無性生殖模式、解剖構造，共分為十四種特徵加以編碼

(3) 分析方法: 不加權平均重法(UPGMA)

2. COI 基因分析:

(1) 基因庫資料: National Center for Biotechnology Information(NCBI)，http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ 查詢 *Convolutriloba* 屬所有種之 COI 基因序列共八組。

(2) 使用軟體:MEGA6，http://www.megasoftware.net/ (十三)

(3) 分析方法: 最大簡約法(MP)，並以 *Symsagittifera pasmmophila* 作為外群

【生理實驗】

【實驗一、連續黑暗實驗】

1. 說明：藉由觀察三尾扁蟲在不受光情況下的死亡率，證實蟲綠藻行光合作用所產生之養分，為扁蟲極重要的養分來源。
2. 步驟：
   (1) 將 3 個 200mL 燒杯分別裝滿海水。
   (2) 分別置入 18 隻扁蟲，一共 54 隻。
   (3) 蓋上鑽洞塑膠蓋減少海水蒸發，避免鹽度產生劇烈改變。
   (4) 放入木箱中，並蓋上蓋子，僅留隙縫。
   (5) 置入恆溫箱中，並設置常溫。
   (6) 每隔 3 小時進行記錄。

【實驗二、色光跑道實驗】

1. 說明：建立不同色光環境的跑道系統，觀察扁蟲的光避性是否受光的波長影響
2. 步驟：
   (1) 以滴管取 40 隻扁蟲，以肉眼判斷盡量避免取樣到無眼點的個體並以燒杯盛裝。
   (2) 架設不同色光光源，並將自製長型跑道放置到適當位置，再將整個實驗裝置移置暗室
   (3) 打開光源，利用照度計測量後，標籤紙註記跑道上各位置照度，並固定起點(近光源)、終點(遠光源)之照度
   (4) 將 40 隻扁蟲用滴管滴在跑道起點(近光源)
   (5) 靜置 30 分鐘，待個體不再移動完全穩定後紀錄結果

【實驗三、族群散布實驗】

圖 2-2-1 、 海水生態缸

1. 說明：藉由觀察海水缸中扁蟲棲地的位置，進行分布密度計算，初步了解其生存方式與以及對於不同物質的棲息偏好。
2. 步驟：
   (1) 對缸中材質進行分類，進行取樣。
   (2) 在海水中將扁蟲由取樣物清出並統計數量。
   (3) 用方格紙量測取樣物面積。
   (4) 進行密度計算。
   (5) 重複以上步驟三次並將數據平均。

【實驗四、棲地模擬實驗】

1. 說明：在觀察到野外扁蟲的棲息情況後，利用自製模擬棲地，證實扁蟲的分布情形是其光聚性與光避性平衡後的結果。
2. 步驟：
   (1) 自製模擬棲地跑道，使用透明玻璃為主體，模擬洞穴則使用遮光材料包覆。
   (2) 滴管取 50 隻扁蟲，用燒杯盛裝，並將自製棲地模擬跑道裝滿海水。
   (3) 將扁蟲滴在起點。
   (4) 將起點朝向向陽處，終點朝向相反方向。
   (5) 相隔一日後紀錄扁蟲分布情形。
   (6) 營造不同遮光情形的棲地，並重複 1~5 步驟。

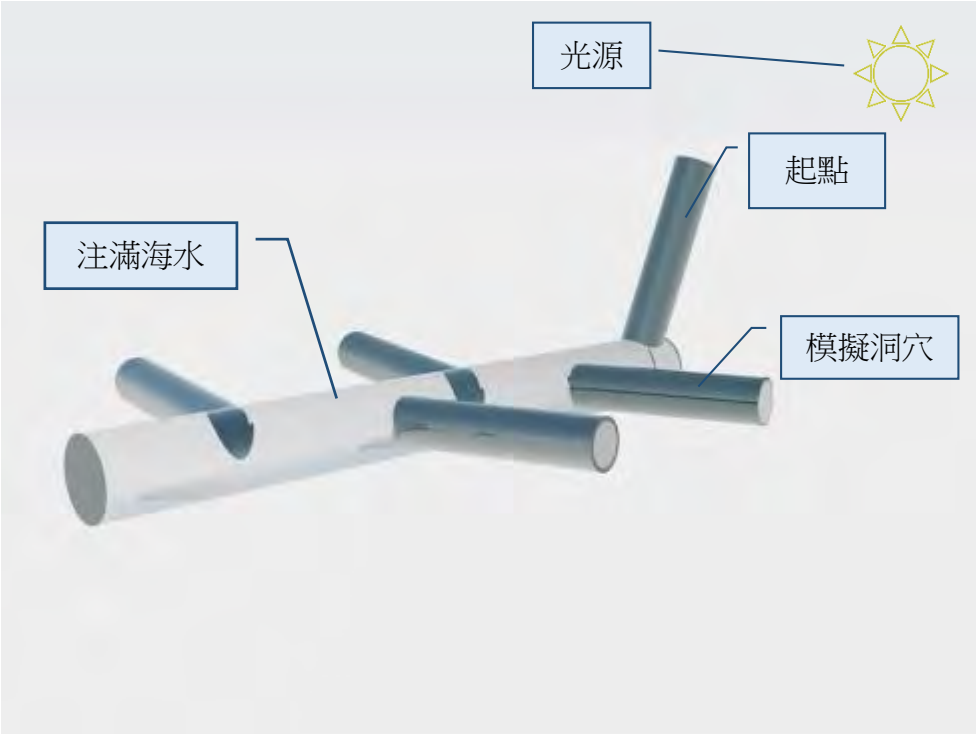


圖 2-2-2、模擬棲地示意圖

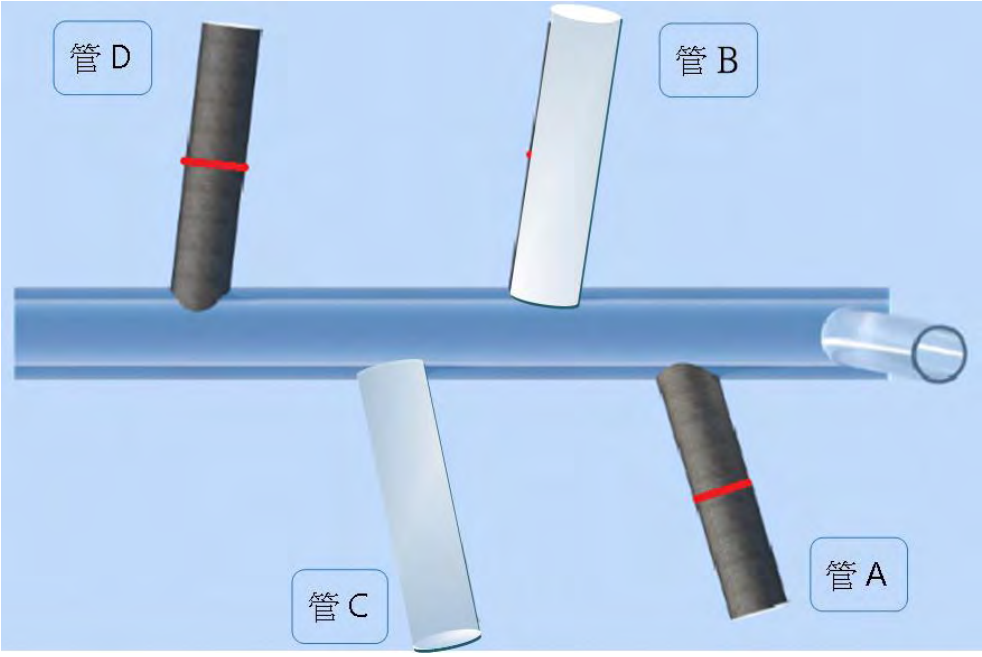


圖 2-2-3、實驗棲地(實驗組)示意圖　　說明: 管 A、D 為模擬洞穴，B、C 管為透明

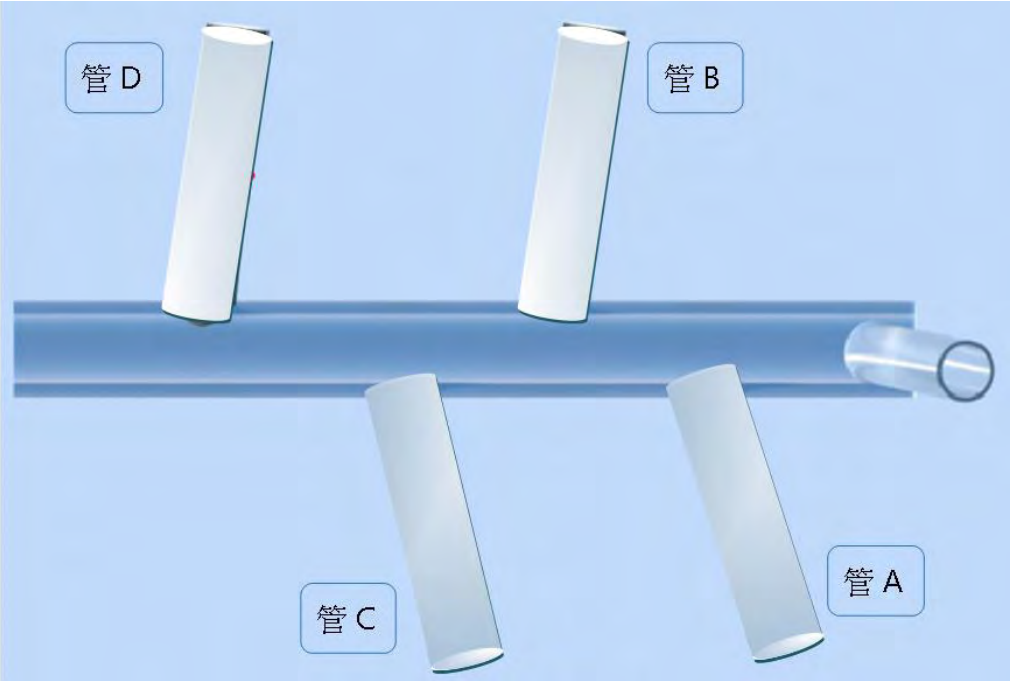


圖 2-2-4、實驗棲地(對照組)示意圖　　說明: 管 A、B、C、D 管為透明

【實驗五、光反應效率實驗——希爾反應 Hill reaction】

1. 原理：

＊ 指示劑褪色：

(1) 希爾反應-$2H_2O + 2DCPIP \rightarrow 2DCPIPH_2 + O_2$

(2) 光反應-$2H_2O \rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$

(3) 光反應中的水解作用產生電子，而 DCPIP 取代了 NADP+接受電子而還原褪色。

＊ 共生藻分離：

(1) 利用滲透壓將扁蟲溶解，而共生藻因有細胞壁維持細胞形狀故仍可存活(圖 4-2-1)。

2. 步驟：

(1) DCPIP(2,6-dichlorophenolin dophenol) 氧化型藍色電子接受劑

指示劑的配置：

I. 將 42mg NaHCO3 溶於 50mL 蒸餾水，攪拌使之均勻混合。

II. 將碳酸氫鈉溶液加入 50mL DCPIP，再加水至 200mL。

III. 用深色瓶盛裝，再用鋁箔紙將整瓶溶液包覆後存放於冰箱。

(2) 實驗組：

I. 各取 15 隻扁蟲至五支離心管內，加生理食鹽水靜置 20 分鐘使其溶解破裂。

II. 將樣本離心(5000 轉 3 分鐘)後將上清液去除，加入 0.5mL 海水作緩衝液，以及配置好的 DCPIP 溶液一滴。

III. 將樣本置於振盪器上 1-2 分鐘，使沉澱物、緩衝液、指示劑均勻混和。

(3) 對照組：另取 5 支離心管，加入海水 0.5mL 及 DCPIP 溶液一滴作為對照組。

(4) 利用照度計控制好各色光環境之光強度(390~410 lux)，將五組實驗組和對照組置於五種色光環境內，並靜置 40 分鐘。

(5) 四十分鐘後取出並二次離心(3000 轉 5 分鐘)後取上清液，並利用顯微光譜儀及 spectrasmart 測量波長 450nm 光之穿透率 ，每組紀錄二十次後取平均值及標準差。

(6) 重複進行實驗五次以進行統計分析。

三、研究結果與討論

(一) 物種的鑑定

1. 外型描述

(1) 顯微鏡下的三尾扁蟲(*Convolutriloba*) ，可以清楚看到明顯的分岔成三節的尾巴，以及眼點、口等構造。

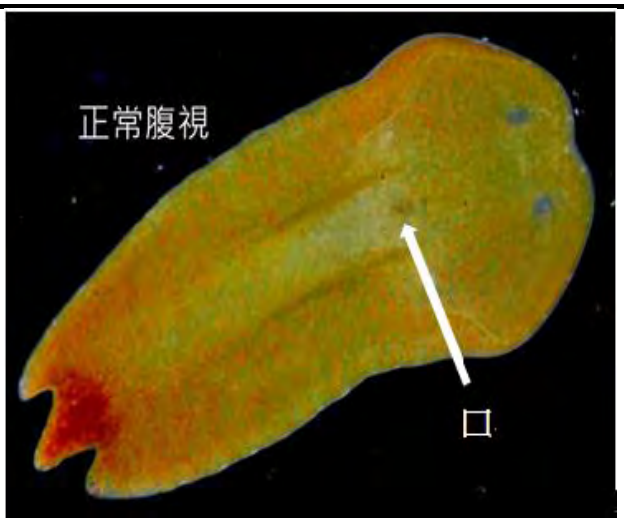


圖 3-1-1、 三尾扁蟲複視

圖 3-1-2、 三尾扁蟲背視

(2) 三尾扁蟲(*Convolutriloba*)的無性生殖，只觀察到橫向的斷裂生殖(Fragmentation reproduction)，剛分裂完的個體可分為前半與後半，最大的差異在於前半段個體具眼域，後半段個體尚未發育出眼域。

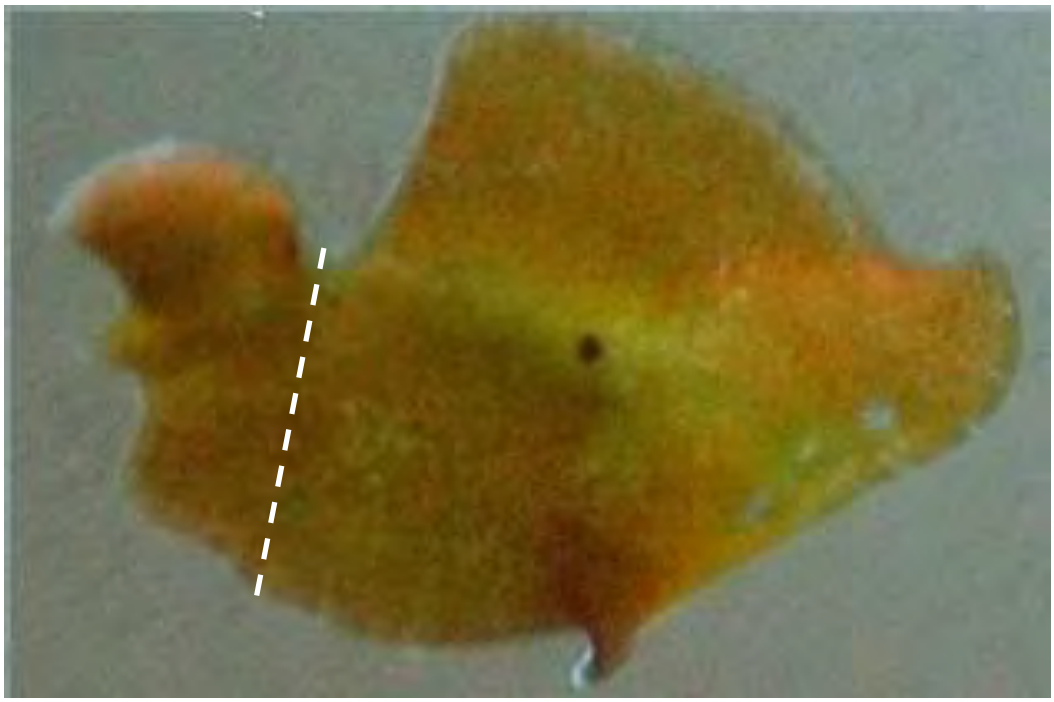


圖 3-1-3 三尾扁蟲(Convolutriloba)橫向斷裂生殖

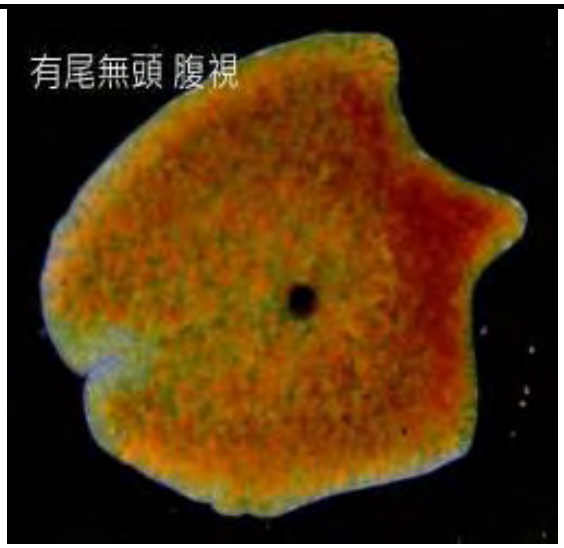


圖 3-1-4 後半段個體腹視，
個體有三尾特徵但無眼域

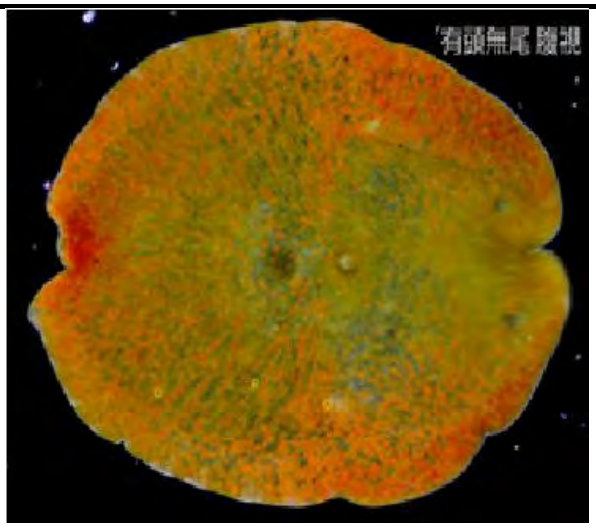


圖 3-1-5 前半段個體腹視，
個體有眼域但無三尾特徵

(3) 共生藻*(Zoochlorellae)*： 顯微鏡下可以清楚看到三尾扁蟲*(Convolutriloba)*體內遍布著共生藻，這種共生藻隸屬 *Zoochlorellae* 屬，種尚未被鑑定，這些共生藻的主要功能為提供三尾扁蟲能量，由於扁蟲繁殖、移動皆須消耗大量能量，卻無觀察到有進食的行為，故共生藻對其生存是不可或缺的

圖 3-1-6、三尾扁蟲體背背視圖，頭朝右

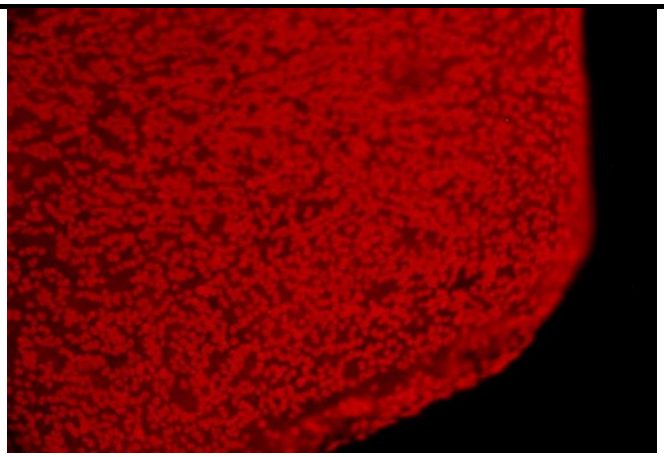


圖 3-1-7 螢光顯微鏡下的三尾扁蟲

註：紅色亮點為共生藻

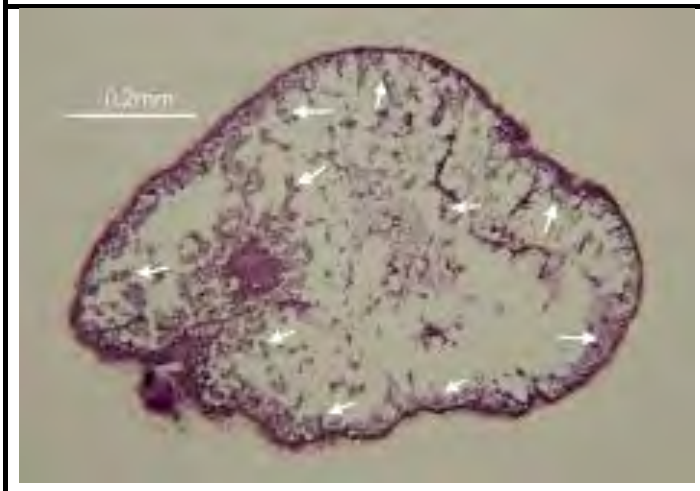


圖 3-1-8、三尾扁蟲 切片組織記錄

註：箭頭所指處為共生藻

(4) 體表色素細胞： 橘色體表是三尾扁蟲(*Convolutriloba*)的特色之一，在顯微鏡下可以觀察到許多色素細胞，這些色素細胞目前尚未有文獻研究描述其功能。

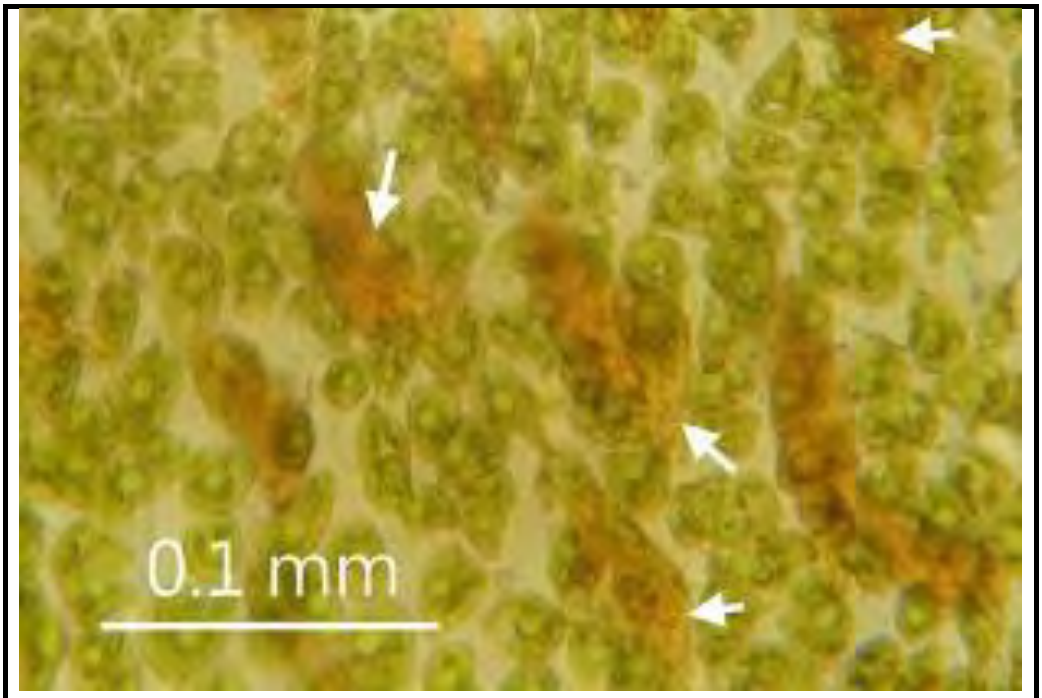


圖 3-1-9 色素細胞觀察，其生理功能尚未完全清楚

註:箭頭所指處為色素細胞

(5) 眼域(eyefields)：扁蟲有一對眼域作為感光構造，且感光能力敏銳(Shannon,*et al* , 2007)，顯微鏡下可看到眼域處沒有色素細胞或共生藻。

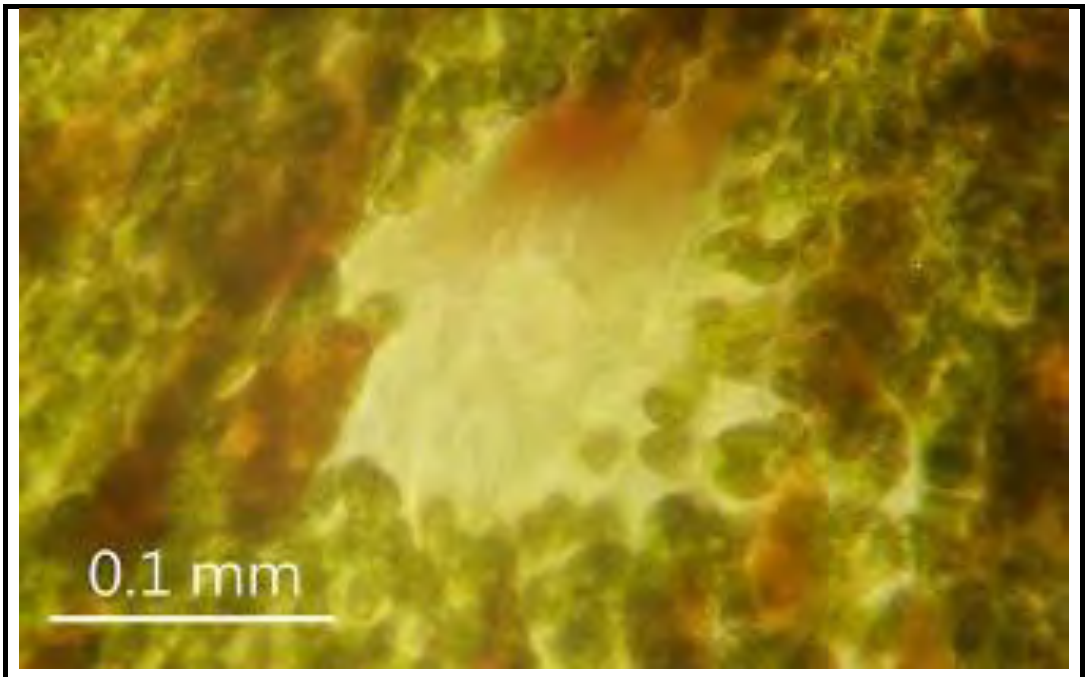


圖 3-1-10、眼域無色素細胞及共生藻分布

(6) 將三尾扁蟲(*Convolutriloba*)斷裂生殖的新個體後半段，也就是尚未發育出眼域的個體與正常個體照光進行比較，在這種照度的強光環境下即使是活動力差的個體也都會有反應，由此結果可知有無眼域確實是避強光行為的決定因子。

表 3-1-1、後半段體與正常個體三尾扁蟲在不同照度差環境下的行為

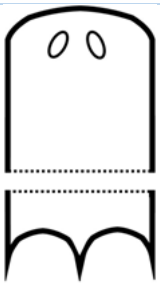
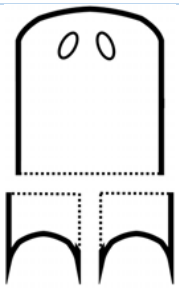
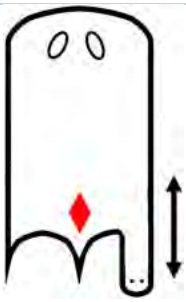
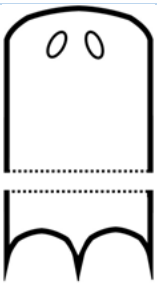
註：「－」表示無反應；「+」表示遠離強光源，趨向弱光源

強光源	弱光源	照度差	後半體(無眼域)	全體(有眼域)
2190(lx)	1380(lx)	810(lx)	－	+
1980(lx)	1470(lx)	510(lx)	－	+
1570(lx)	1410(lx)	180(lx)	－	+

2. 無性生殖紀錄：

目前 *Convolutriloba* 屬共有 4 個種被發表，與缸內、紅柴坑如下表所示：

表 3-1-2、*Convolutriloba* 屬已鑑定之四種比較表

種小名	*retrogemma*	*hastifera*	*longifissura*	*macropyga*	缸內	紅柴坑
發表年代	1988	1990	1997	2007		
發表人	Hendelberg , Akesson	Winsor	Bartolomaeus, Balzer	Shannon, Achatz		
參考文獻編號	十一	十	九	六		
無性生殖方式	反向出芽生殖	斷裂生殖 只有橫裂 子代數：1	斷裂生殖 先橫裂再縱裂 子代數：2	反向出芽生殖	斷裂生殖 只有橫裂 子代數：1	
無性生殖示意圖						
平均體型	8-10mm	2-3mm	3-5mm	8-10mm	2-3mm	2-3mm

COI 基因 基因庫代碼	EU710925.1 EU710924.1	EU710926.1 EU710921.1	EU710928.1 EU710927.1 EU710923.1	EU710922.1	CON4 CON5	Con-R1 Con-R2

目前只觀察到本種行橫向分裂，故無法確認其不會行縱向分裂，文獻中對於三尾扁蟲的性腺有所描述，但是我們在顯微鏡觀察、切片標本觀察及全埋標本觀察中皆沒有發現性腺，故目前本新種的發表還在程序中。

表 3-1-3、 *Convolutriloba* 之特徵編碼表

features	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
retrogemma	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
hastifera	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
longifissura	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0
macropyga	2	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
缸	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
野外	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0

表 3-1-4、*Convolutriloba* 特徵型態編碼表說明

1	最長體長	0: 2-3	1: 5-6 2: 9-10	mm
2	是否行橫向斷裂生殖	0	1	註: 0 表是，1 表否
3	是否行縱向斷裂生殖	0	1	註: 0 表是，1 表否
4	是否行側尾葉反向出芽生殖	0	1	註: 0 表是，1 表否
5	是否行中尾葉反向出芽生殖	0	1	註: 0 表是，1 表否
6	咽部是否具黑點	0	1	註: 0 表是，1 表否
7	幼體尾葉數	0: 1 or 2	1:三尾	
8	成體尾葉數	0: 多尾	1: 三尾	
9	中尾葉長度(與側尾葉比較)	0: >	1:<	
10	腹瓣是否明顯	0	1	註: 0 表是，1 表否
11	體表桿狀細胞大小	0: 2-3	1: 5-6	um
12	體色 (底)	0: 淡綠	1: 橘黃	
13	尾部是否具紅斑	0	1	註: 0 表是，1 表否
14	體表是否具白色斑塊	0	1	註: 0 表是，1 表否

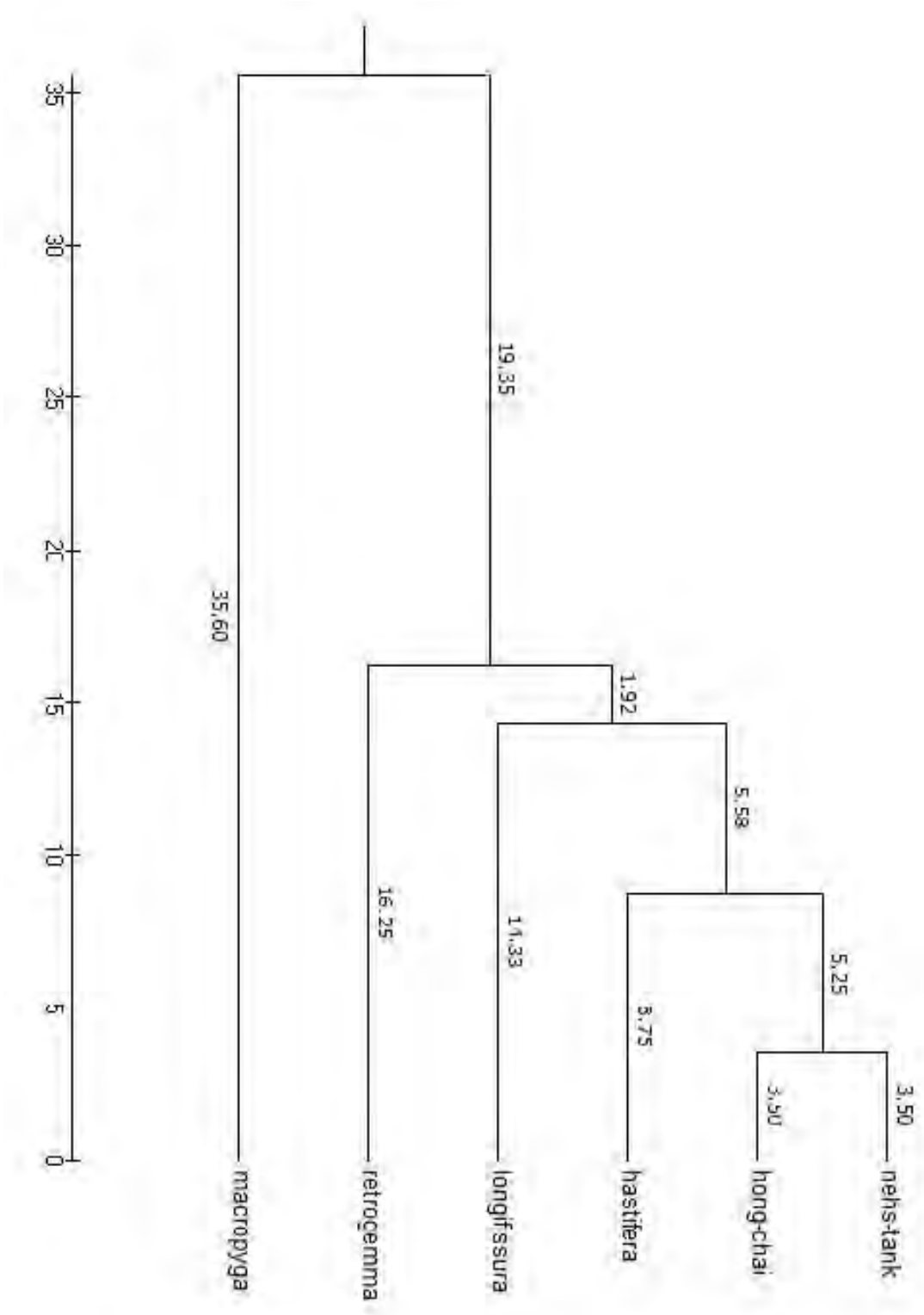


圖 3-1-11、*Convolutrilo ba* 特徵型態親緣關係樹

從圖中可以親楚看到分析結果與 COI 基因序列分析結果大致相符，唯 hastifera、longifissura 與本種之親緣關係遠近略有不同，圖中 n-tank 表示缸內個體，hong-chai 表示紅柴坑野生個體

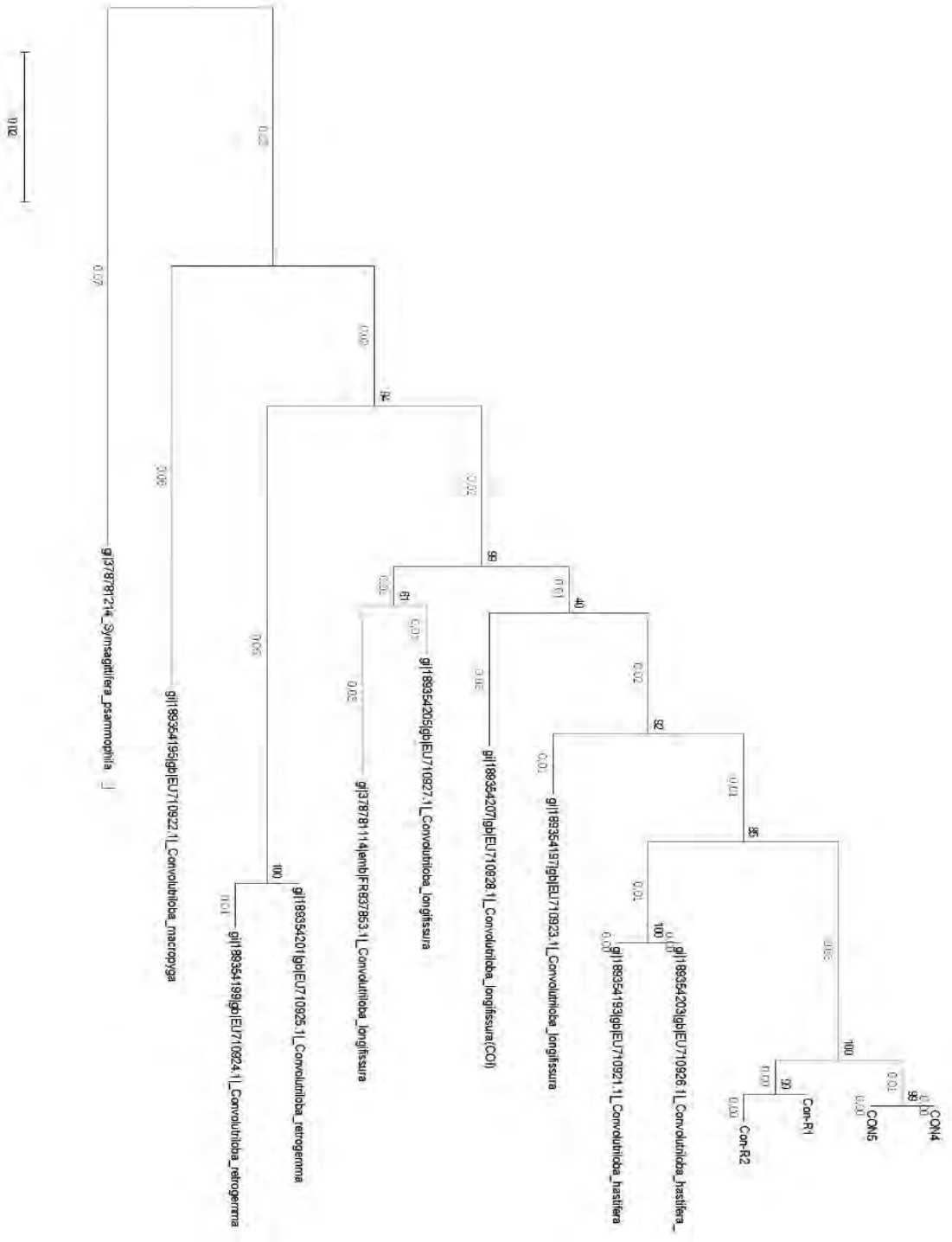


圖 3-1-12、*Convolutriloba* COI 基因親緣關係樹

圖中 CON4、CON5 為缸內個體，con-R1、con-R2 為紅柴坑野生個體，以

Symsagittifera pasmmophila 為外群。從圖中可以清楚看出紅柴坑與缸內之個體屬於同種，不屬於 *Convolutriloba* 屬已知四種之一，圖中節點的數字表示該節點成立之可信度，而線段上之數字表示樣本間之相似度距離，數值愈小表示親緣關係愈接近。

(二) 三尾扁蟲(*Convolutriloba*)之生理研究

1. 【實驗一、連續黑暗實驗】30 小時開始死亡，4 天全數死亡

圖 3-2-1 三尾扁蟲(*Convolutriloba*)在完全黑暗環境下的生存情形

在實驗中可以觀察到，在前 30 個小時，扁蟲並沒有出現個體死亡的情形，但在超過 30 小時後，便開始陸續出現死亡，而存活個數也在 75 小時左右減至一半，並在最後一天(74~96 小時)內全數死亡。

2. 【實驗二、色光跑道實驗】紅光下扁蟲無避光性，其他色光下扁蟲避光性顯著

說明：利用 50%個體數分布界線來表示每個色光跑道上的賽跑結果，界線以前和以後各有 50%個體數分布。用這條界線代表該跑道上族群向弱光移動的趨勢。

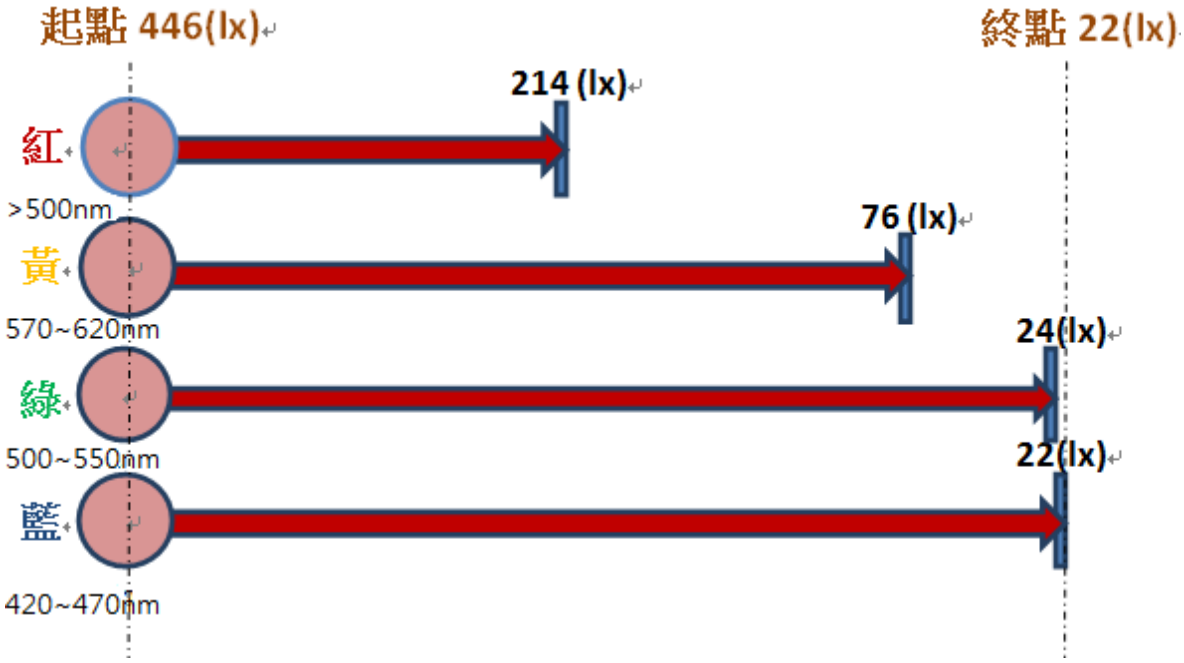


圖 3-2-2、50%個體數分布界線示意圖

說明：探討光波長對三尾扁蟲光避性行為程度之影響，取 50 隻成熟個體置於跑道起點(圓形處)，使其自由移動分布，並且在跑道各處標示光強度，藉三尾扁蟲遠離光源的趨勢定義其光避性程度。數據分析上使用 50%個體數分布界線來表示每個色光跑道上的賽跑結果，界線以前和以後各有 50%個體數分布。用這條界線代表該跑道上族群向弱光移動的趨勢。將實驗結果依坡常大小梯度排列由紅(>500nm)至藍(420~470nm)光，發現三尾扁蟲在各色光底下皆出現光避性行為，但在不同色光下有程度上的差異。紅光源組，約有半數個體未超過 214(lx)；黃光源組，約有半數個體未超過 76(lx)；藍、綠光源組，幾乎全數個體到達跑道終點 22(lx)、24(lx)。

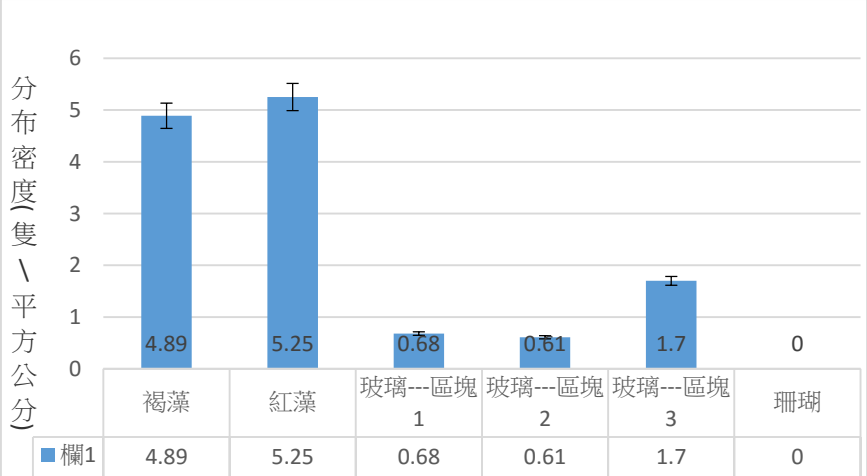
結論：紅光(>500nm)環境下扁蟲的光避性明顯較其他色光弱，而其中又以綠(500~550nm)、藍(420~470nm)光的光避性最顯著、強烈。

3. 【實驗三、族群散布實驗】

(1) 海水生態缸棲息分布調查：

圖 3-2-3、海水生態缸玻璃取樣區塊示意圖

圖 3-2-4、 不同底質下海水生態缸扁蟲散布密度圖



＊ 結果：由觀察結果可知扁蟲在藻類上的散布情形最為密集，尤以紅藻為甚。此外，扁蟲並不會附著於珊瑚上。

(2) 野外棲地描述及棲地比較：

在翻查台灣各地潛水的照片時，意外發現墾丁海域野生扁蟲的紀錄，於是年初又再次前往屏東進行潛水，並成功在紅柴坑附近海域發現扁蟲的蹤影。有趣的一點是，在野外中，扁蟲僅散布在一些小型洞穴的洞口，是為十分奇特的景象。這個散布情形與缸裡大有不同，說明著扁蟲為適應不同環境裡的各種因素，在棲地的選擇上也會有所改變。

表 3-2-1、海水生態缸與野外棲地之三尾扁蟲(*Convolutriloba*)族群散布比較

註:「－」表示無族群散佈；「＋」表示有族群散佈；斜線表示無該底棲

底質環境	說明	野外-墾丁紅柴坑	海水生態缸
珊瑚	Heteroxenia	－	
	Montipora	－	
	Porites	－	
	Echinophyllia	－	
	Goniastrea1	－	
	Favia 1	－	
	Goniastrea2	－	
	Pocillopora	－	
	Millepora	－	
	Galaxea 1	－	
	Acropora	－	
	Galaxea 2	－	
	Euphyllia	－	
	Platygyra	－	
	Favia 2	－	
	Lobophytum	－	
	穗軟珊瑚		－
礁石	活石或珊瑚骨骼	－	＋
藻類	大型綠藻、紅藻及褐藻	－	＋
礁石洞口		＋	－

＊ 說明: 墾丁紅柴坑海底八公尺深處共記錄了十七種珊瑚、礁石、藻類等等，分成四種底棲環境討論，發現在各種珊瑚、礁石、藻類上皆無野生三尾扁蟲分布，僅在礁石洞口出發現密集分布的族群

地點：屏東縣墾丁紅柴坑珊瑚礁海域

深度：八公尺

水溫：24℃

圖 3-2-5、Heteroxenia	圖 3-2-6、 Montipora	圖 3-2-7 、Porites
圖 3-2-8 、 Echinophyllia	圖 3-2-9、 Goniastrea (1)	圖 3-2-10、 Favia (1)
圖 3-2-11、 Goniastrea (2)	圖 3-2-12、 Pocillopora	圖 3-2-13、 Millepora
圖 3-2-14、 Galaxea (1)	圖 3-2-15、Acropora	圖 3-2-16、 Galaxea (2)

圖 3-2-17、 Euphyllia

圖 3-2-18、 Platygyra

圖 3-2-19、 Favia (2)

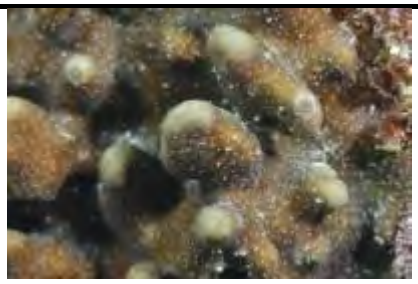


圖 3-2-20、 Lobophytum

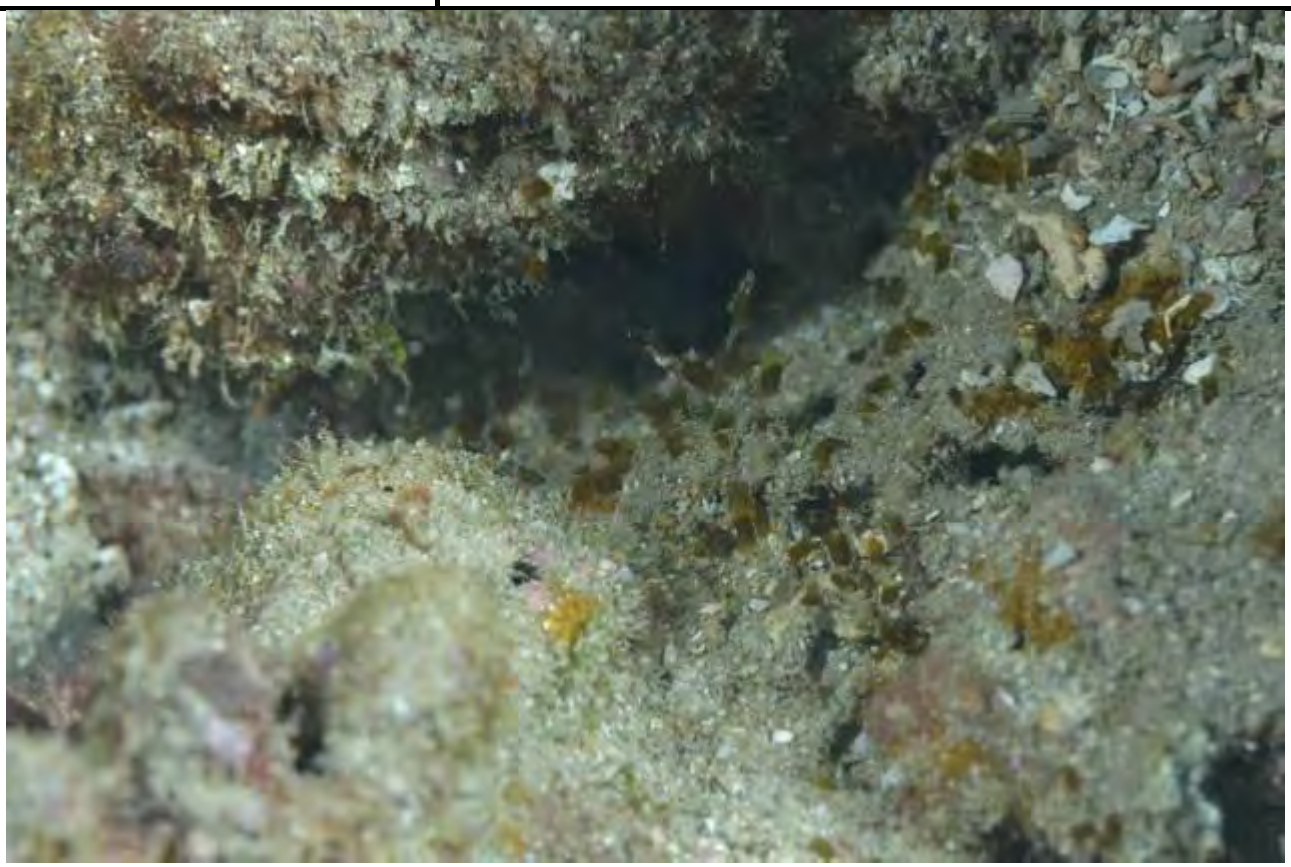


圖 3-2-21、礁石洞穴口 遠觀

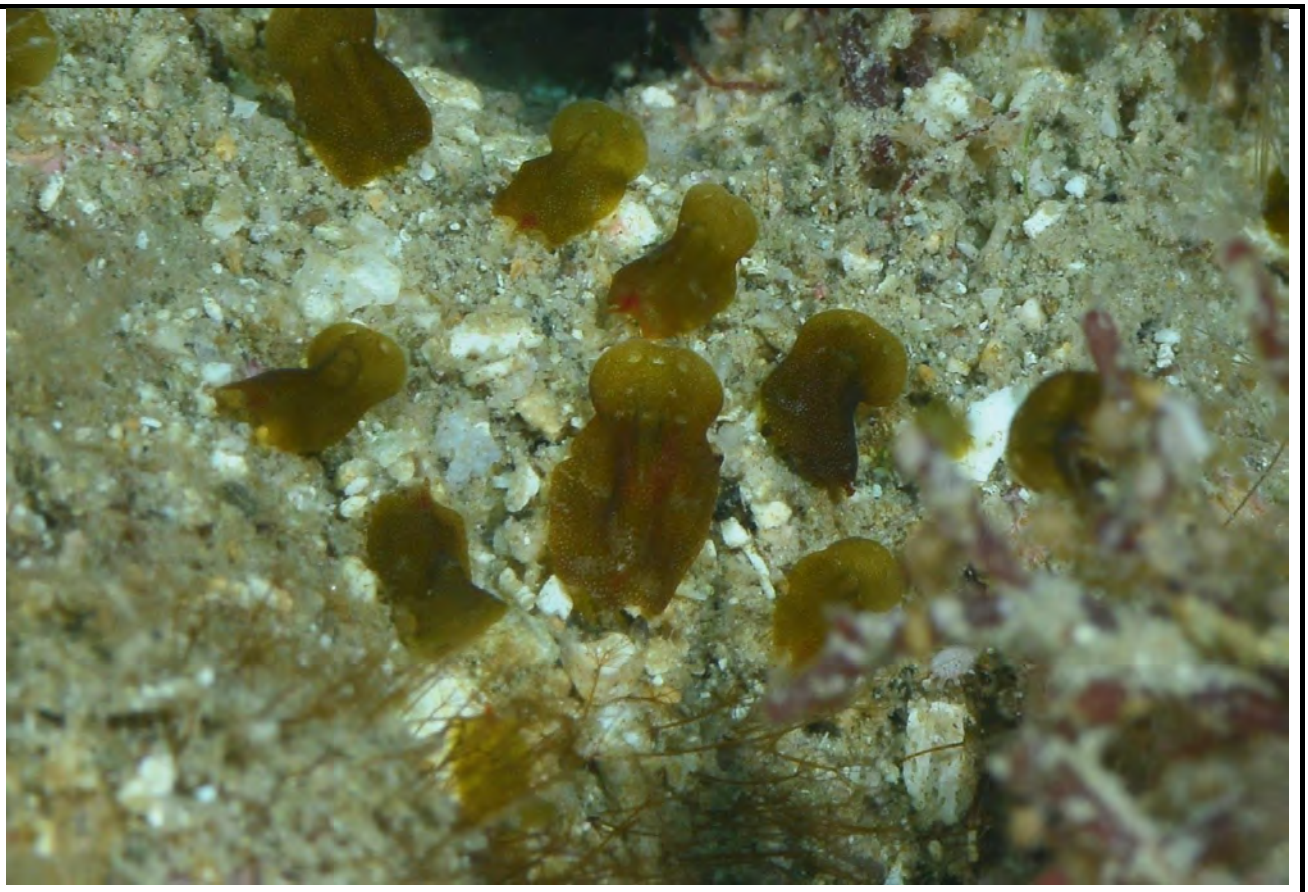


圖 3-2-22、礁石洞穴口處密集地出現野生三尾扁蟲

4. **【實驗四、棲地模擬實驗】**

＊ 說明：為探討三尾扁蟲野外散部情形與光行為之關聯性，設計出一模擬棲地裝置進行實驗，紀錄結果時將模擬棲地分成多個區域，如示意圖，並討論兩種情形-連續照光與自然光源，差異在於自然光源組經過了白天→黑夜→白天的過程。此外定義洞穴口管中(0-4cm)管口組成的區域，由此進行比較。

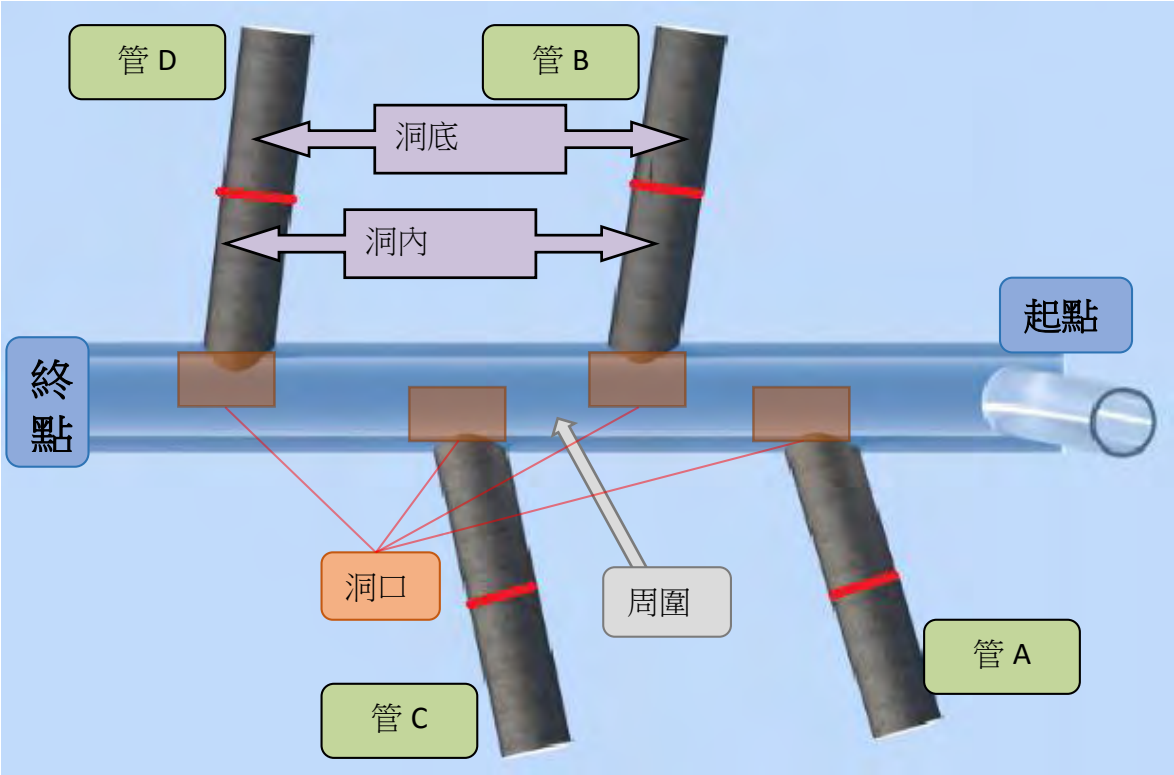


圖 3-2-23 棲地分區示意圖

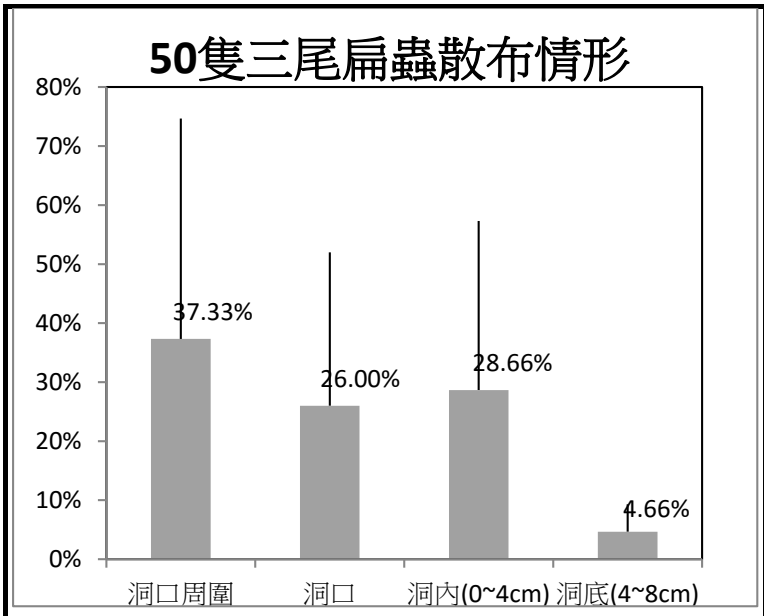


圖 3-2-24 棲地模擬自然光源 24 小時紀錄

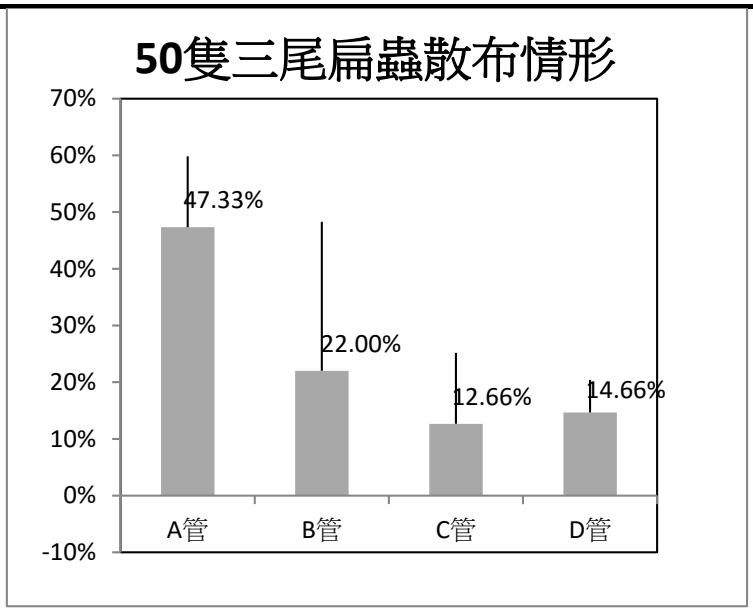


圖 3-2-25 棲地模擬自然光源 24 小時紀錄
各區塊扁蟲散布情形與支管關係

表 3-2-2 棲地模擬自然光源 24 小時紀錄
各區塊扁蟲散布情形與洞穴關係
ANOVA 分析結果

變源	SS	自由度	F	P-值
組間	0.173167	3	18.62007	0.000575

表 3-2-3 棲地模擬自然光源 24 小時紀錄
各區塊扁蟲散布情形與支管關係
ANOVA 分析結果

變源	SS	自由度	F	P-值
組間	0.229167	3	18.18783	0.000623

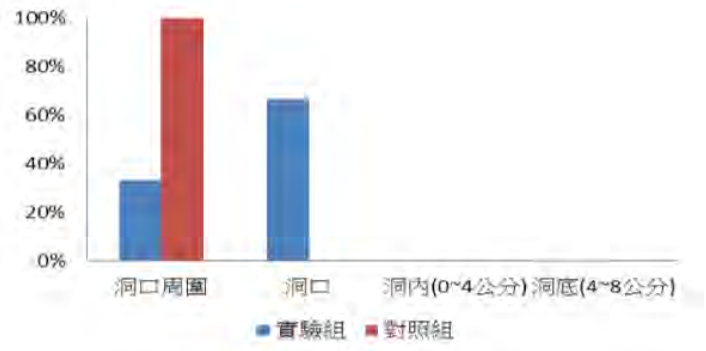


圖 3-2-26 實驗棲地 3 小時連續照光紀錄
各區塊扁蟲散布情形與洞穴關係

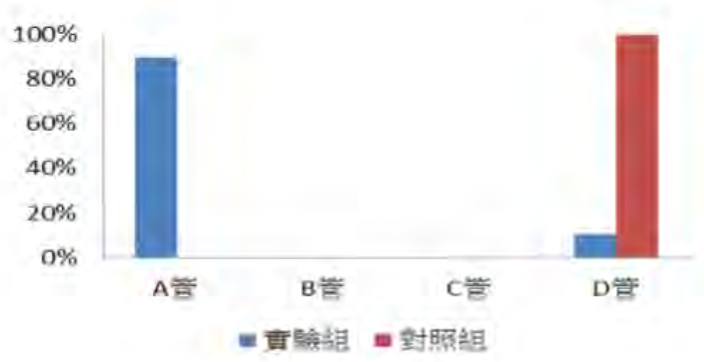


圖 3-2-27 實驗棲地 3 小時連續照光紀錄
各區塊扁蟲散布情形與支管關係

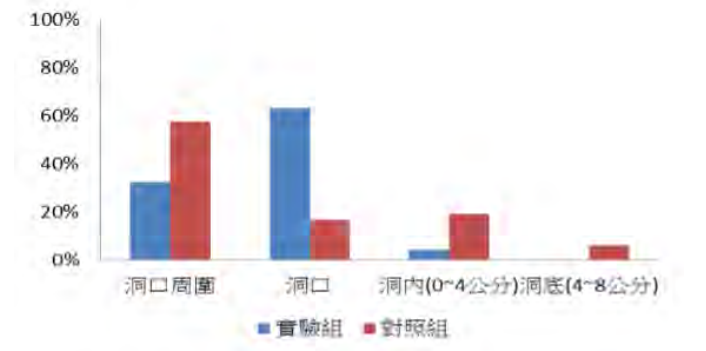


圖 3-2-28 實驗棲地自然光源 24 小時紀錄
各區塊扁蟲散布情形與洞穴關係

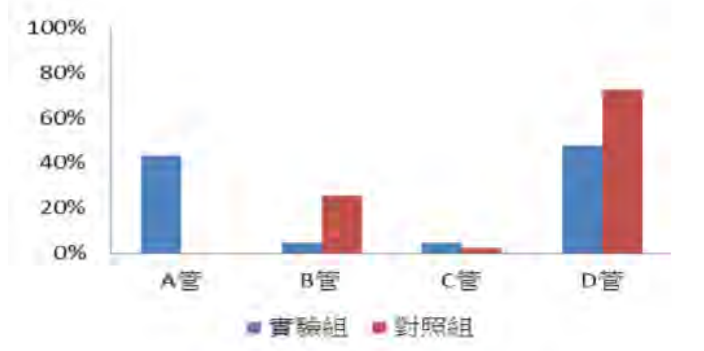


圖 3-2-29 實驗棲地自然光源 24 小時紀錄
各區塊扁蟲散布情形與支管關係

圖 3-2-24、圖 3-2-25 為在模擬棲地裝置中之實驗結果，從中圖 3-2-24 可以看出三尾扁蟲多散佈於洞穴口處(約佔 54.66%)；從圖 3-2-25 中則可看出三尾扁蟲多散佈在 A 管(約佔 47.33%)，也就是最靠近光源處，出現光聚性，證明三尾扁蟲確實感應的到洞穴的存在並且傾向散佈於此。

圖 3-2-26、圖 3-2-27、圖 3-2-28、圖 3-2-29 為在實驗棲地裝置中之實驗結果，其中又分為實驗組與對照組從圖 3-2-26 中可以看到對照組(無遮光)之個體多散佈於洞穴以外之處，相對的實驗組(A、D 兩管遮光)則多散佈於洞口處，說明洞穴的有無直接影響了三尾扁蟲的散佈情形；從圖 3-2-27 中可以看出對照組之個體多散佈於 D 管(約佔 99%)，也就是最遠離光源處，呈現完全光避性，相對的實驗組則多分佈於 A 管(約佔 90%)，也就是最靠近光源處，出現光聚性。圖 3-2-28、圖 3-2-29 為條件改為 24 小時自然光照之實驗結果，可分別對應至圖 3-2-26、圖 3-2-27，結果大致相符，也就是對照組多散佈於洞穴以外、D 管，而實驗組多散佈於洞穴口、A、D 兩管。

(三) 三尾扁蟲(*Convolutriloba*)體內共生藻(*Zoochlorellae*)之生理研究

【實驗五、光反應效率實驗】不同色光下共生藻的光合作用效率比較

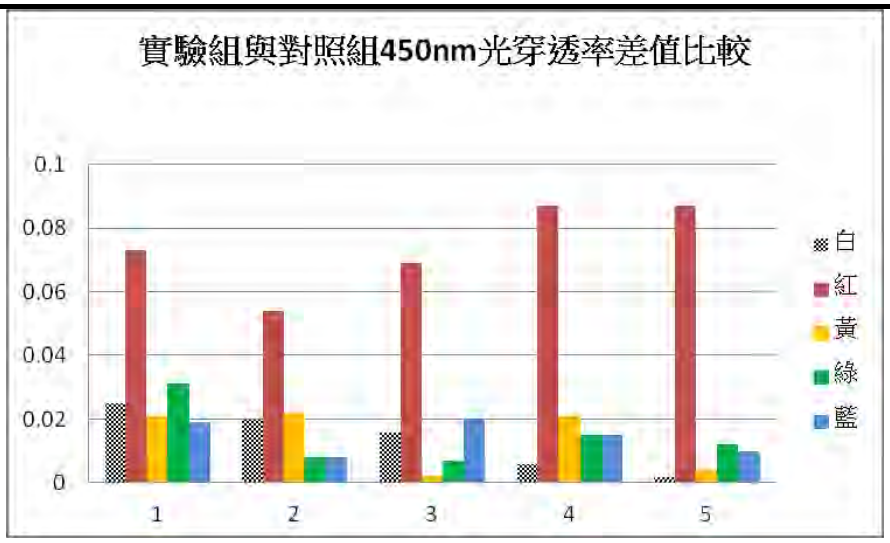
表 3-3-1 實驗組與對照組 450nm 光穿透率差值

	白	紅	黃	綠	藍
data1	0.025	0.073	0.021	0.031	0.019
data2	0.02	0.054	0.022	0.008	0.008
data3	0.016	0.069	0.002	0.007	0.02
data4	0.006	0.087	0.021	0.015	0.015
data5	0.002	0.087	0.004	0.012	0.01

說明

定義對照組與其對應實驗組的 450nm 光穿透率差值為其反應效益，差值越大表示指示劑還原比例越高，即光反應效率越高。重複相同實驗五次以進行分析。

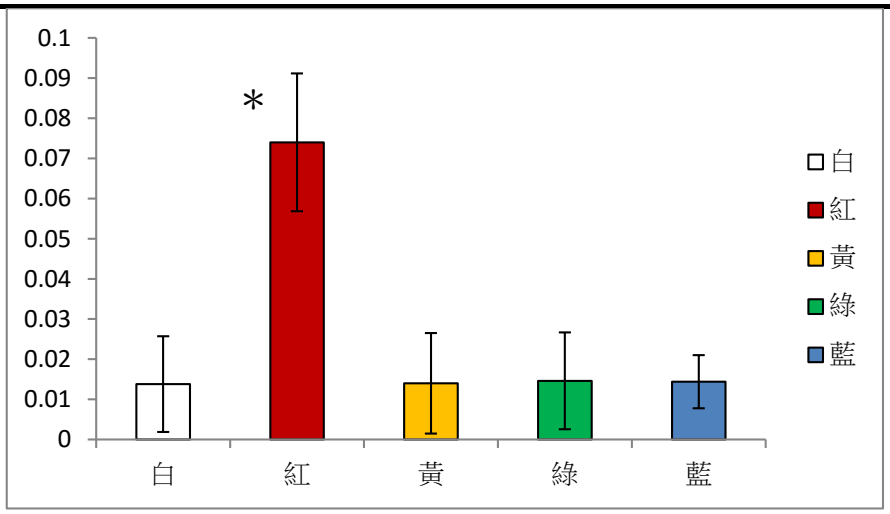
圖 3-3-1、 實驗組與對照組 450nm 光穿透率差值長條圖



說明

從長條圖可以明顯看出紅光源組的數據遠大於其他色光源組，ANOVA 分析、T 檢定結果為顯著差異。

圖 3-3-2 實驗組與對照組 450nm 光穿透率差值之平均值



說明

＊表示顯著差異 (P<0.05)，誤差值取 95%信賴區間

表 3-3-2 紅光與白光 T 檢定-顯著差異

	白光	紅光
平均數	0.0138	0.074
變異數	9.22E-05	0.000191
觀察值個數	5	5
自由度	4	
T 統計	-6.12059	
P(T≦t)單尾	0.001805	
臨界值：單尾	2.131847	

表 3-3-3 白光與綠光進行 T 檢定-P>0.05

	白光	綠光
平均數	0.0138	0.0146
變異數	9.22E-5	9.43E-05
觀察值個數	5	5
自由度	4	
T 統計	-0.17079	
P(T≦t)單尾	0.436339	
臨界值：單尾	2.131847	

表 3-3-4 白光與藍光進行 T 檢定- P>0.05

	白光	藍光
平均數	0.0138	0.0144
變異數	9.22E-05	2.83E-05
觀察值個數	5	5
自由度	4	
T 統計	-0.14569	
P(T≦t)單尾	0.445605	
臨界值：單尾	2.131847	

表 3-3-5 白光與黃光進行 T 檢定- P>0.05

	白光	黃光
平均數	0.0138	0.14
變異數	9.22E-05	0.000102
觀察值個數	5	5
自由度	4	
T 統計	-0.04241	
P(T≦t)單尾	0.484102	
臨界值：單尾	2.131847	

表 3-3-6 五組資料進行 ANOVA 分析-顯著差異

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.014306	4	0.003577	35.25074	8.54E-09	2.866081

處理**【實驗五、光反應效率實驗】**數據時，先將五組資料進行 ANOVA 分析，探討其光反應效率是否與不同色光環境有關係，ANOVA 分析結果顯示五組資料顯著差異，代表色光確實影響著共生藻行光合作用的效率。更進一步處理，將四種色光的反應效益分別與白光做 T 檢定分析，檢定不同色光是否有不同影響。T 檢定的結果只有紅光與白光呈現顯著差異，也就是四種色光底下，只有紅光環境下共生藻的光反應效率明顯提升。

(四) 三尾扁蟲(*Convolutriloba*)分類學研究

1. 新種: 有關三尾扁蟲的研究主要來自世界各大水族館的觀察報告，至今沒有任何野外棲地的發現，本研究的海水生態缸來自屏東海生館，並意外的在墾丁紅柴坑鄰近海域發現野生族群，此地點與海生館距離僅十多公里，故起初推測兩者極可能為同種，其後經由型態分析、COI 基因分析等親緣關係鑑定後，型態學與分子生物學兩者結果相符，證明本種為 *Convolutriloba* 屬之新種，而究其野生棲地而論，極有可能是台灣地區之原生種

2. 顯微鏡下可以清楚看到共生藻在扁蟲體內分布均勻，可知其共生於扁蟲組織之間，而有行光合作用的功能，且(Shannon *et al*, 2007)指出扁蟲的養分大量來自於其體內共生藻之光合作用，可見扁蟲與共生藻之間的關聯性非常密切，甚至顯著地影響扁蟲的行為。目前尚未觀察到本種扁蟲有進食行為，與 Shannon 的研究樣本仍可進食略有不同，由此可知我們研究的種類，其與共生藻間的相互依存程度，更加緊密。

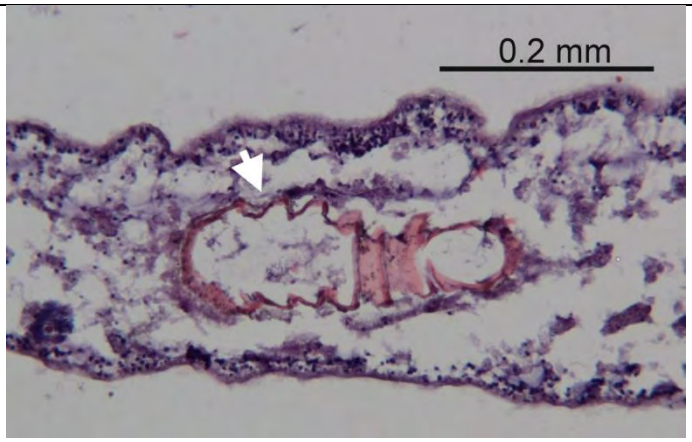


圖 3-4-1

說明: 墾丁紅柴坑野生三尾扁蟲切片記錄，發現體內存留攝食甲殼動物之外骨骼

3. 眼域(eyefields):扁蟲的光行為被推測是由滲透壓控制(Shannon III ,2007)，此推測並不成立。從(表 3-1-1)中可以看出是否產生光避性是因扁蟲透過眼域感測環境，而不具眼域的個體則因此無法表現光行為，然而不具眼域的個體如何在無法感光的情況下與共生藻穩定共生，以及其選擇棲地的依據為何仍需進一步探討。從(圖 3-1-10)觀

察到眼域無共生藻及色素細胞的特性，代表該處並無受到共生藻影響、亦無色素細胞的保護，證明扁蟲確實靠眼域來感應各種色光。

4. 色素細胞: 已知表皮色素細胞與扁蟲的防禦、分泌等功能有關，但其真正功能並未完全清晰(中文文獻二)。我們根據扁蟲的生理特性與其他海洋生物的例子，研判這是扁蟲演化出的藍光保護構造，橘紅色應與短波長光的吸收相關，再加上**【實驗五、光反應效率實驗】**的結果，藍光都不被共生藻所喜好，同時從相關文獻中找到先例，某些種的干貝及海鞘都有類似藍光保護構造緊密分布於體表，以防止生物受到藍光傷害，而這些分泌物都與共生藻的刺激有關(Ishikura *et al*,1997、Maruyama *et al*, 2003、Hirose *et al*, 2004、Hirose *et al*, 2007)，不同的是干貝及海鞘都屬無法移動的生物，而扁蟲具移動能力可以找尋適合自己生存的場所，躲避藍光並降低其造成的傷害，或許也是因為如此其色素細胞的分布並不緊密，從(圖 3-1-9)可發現，藍光依然可從縫隙中穿透， 也因此才會有特殊的光行為——光避性(photophobia)與光聚性(photoaccumulation)

5. 三尾扁蟲橫向斷裂生殖後產生的兩種新個體，分別為有尾無頭(圖 3-1-4)以及有頭無尾(圖 3-1-5)的個體，且本實驗發現有尾無頭的個體失去了應有的光避性行為，間接證明了眼域對判斷周遭光環境而言非常重要，也由此可知三尾扁蟲的光避性是一種主動的趨性行為，而我們認為光聚性行為也同樣屬於扁蟲的主動行為。

(五) 三尾扁蟲(*Convolutriloba*)生理學研究

1. 三尾扁蟲的生理

【實驗一、連續黑暗實驗】中可以看到在完全黑暗環境下扁蟲 30 小時候開始死亡，4 天內便全數死亡，相同環境條件，在有餵食的情況下扁蟲則可生存至近 19 日(Shannon III ,2007)，但本種並無觀察到有進食行為，故其對共生藻的依賴性更大，光避性與光聚性等光行為的生理意義也更顯著。**【實驗二、色光跑道實驗】**中則可以看出光避性的程度確實受到色光環境影響，相對其他色光而言，紅光環境下扁蟲光避性最不顯著。數據處理上我們以 50%個體數分布界線呈現趨勢，實際上許多個體甚至完全沒有光避性行為，而散布在照度強的起點附近。

由三尾扁蟲在缸內、野外之散布情形可知其不會寄生或傷害珊瑚、藻類等底棲生物，顛覆一般水族業者及大眾的刻版印象

2. 共生藻*(Zoochlorellae)*與三尾扁蟲*(Convolutriloba)*的共生關係

從【實驗一、連續黑暗實驗】扁蟲在四天內快速的死亡現象，可以看出在共生關係中，共生藻行光合作用所產生的養分對於扁蟲有非常大的重要性，是扁蟲生存所須能量的主要來源。同時，我們也在觀察中發現扁蟲體型縮小，顯示其體內共生藻的死亡，因此，扁蟲必須具備感光能力並移動至共生藻能有效行光合作用的地點，使扁蟲與共生藻皆能生存，為互利共生行為。

從**【實驗二、色光跑道實驗】**和**【實驗五、光反應效率實驗】**歸納出：紅光對兩者造成的影響不同於其他色光，扁蟲在紅光下光避性弱，共生藻在紅光下光反應效率高，結合兩者即為扁蟲共生的理論，意即，扁蟲在紅光下的行為不同是因環境適合共生藻行光合作用，間接的幫助自己獲得足夠能量，因此可以將紅光比喻成兩者共生關係的媒介，這個理論可以合理的推廣至其他色光，也就是扁蟲光避性的強弱，決定於共生藻在該色光環境下是否能有效行光合作用。眼域不具共生藻的特性(圖3-1-1)，再加上扁蟲體內的能量來源完全來自共生藻的光合作用(Shannon, et al, 2007)，證明了兩者的共生關係存在彼此控制的機制，扁蟲利用環境條件控制共生藻生長，而共生藻則透過能量提供控制扁蟲生長。

(六) 三尾扁蟲(*Convolutriloba)*生態學研究

比較扁蟲在海水生態缸與野生棲息地的散佈情形後，發現兩者結果差異極大，不同環境會導致扁蟲在選擇棲息地時有截然不同的結果。探討完扁蟲與共生藻的共生關係後，便可以從共生的角度來解釋扁蟲的光行為。光避性不是完全的避光，光聚性也不是完全的光聚，而是取決於扁蟲為提高共生藻光合作用效率而聚集在光照處，或是為抑制共生藻行光合作用而躲到暗處，這也解釋了扁蟲在野外棲地分布情形。**【實驗四、棲地模擬實驗】**證明了避光與光聚需經時間調節，而實驗室內光照、黑暗交錯的環境就彷彿在野外的扁蟲經歷無數白天黑夜的變化，而自然的處在洞穴與外界的交界附近。延伸出的 “實驗棲地” 實驗更排除了多數變因，經由實驗組與對照組的比較，直接驗證了扁蟲在野外環境的散布情形，也就是只在洞穴口出現的現象，完全是受到光照影響

四、結論與應用

(一)結論

- 扁蟲在紅光下光避性弱；在綠、藍光下光避性強。
- 體內共生藻(*Zoochlorellae*)在紅光下光反應效率高；在綠、藍光下光反應效率低。
- 光聚性與光避性的形成是扁蟲與共生藻兩者的共生關係，彼此控制的結果
- 眼域為影響扁蟲光行為的主要因素，而色素細胞極可能為其藍光保護構造。
- 首次發現三尾扁蟲(*Convolutriloba*)野外棲地並模擬成功，在光照、黑暗交錯環境下扁蟲會分布在洞穴口附近，是光避性與光聚性調節的自然結果。
- 經由外型表徵比對、COI 基因序列比對，確定本種為 *Convolutriloba* 屬之新種，並且極可能是台灣地區之特有種。

(二) 未來展望

目前儲有酒精標本，以期將來做 DNA 鑑定與基因庫比對，如此便有更確鑿的證據來確定我們的研究生物是否為新種。一個生物體，不需進食而靠光和氧即可存活，這個驚人的現象值得深究，礙於儀器與研究技術，無法深入探討扁蟲體內共生藻除了提供能量，是否還提供了一些生命必要的元素。由於扁蟲為適應環境而產生的特殊光行為，以及與體內共生藻的特殊共生關係是長期演化而形成的模型，我們期許能在自然界中發現更多類似案例或著能把這個模型擴大，推廣至其他神秘的海洋生物。

(三) 教案設計探討活動

配合基礎生物(下)第六單元-生物與環境，兩物種間的交互作用與利害關係。

1. **名稱**:三尾扁蟲與共生藻的互利共生
2. **目的**:藉由不同色光下，三尾扁蟲的行為以及體內共生藻的光反應效率，推論兩者的互利共生關係。
3. **說明:** 扁蟲能夠選擇紅光環境棲息，有利於共生藻行光合作用，而光合作用產生的養分提供扁蟲繁殖、生長所需能量，藉此可知兩者為互利共生
4. **器材、藥品、生物**:分離後的共生藻、離心管、離心機、振盪器、各色光 LED、顯微光譜儀(可用分光光度計取代)、玻片、滴管、DCPIP(光反應褪色指示劑)、自製長型跑道、三尾扁蟲、照度計

5. **步驟:**

1. 扁蟲的避光行為

(1) 將自製長型跑道固定於光源前方適當距離，

(2) 以照度計控制光強度並以標籤紙標示跑道上各位置照度

(3) 將扁蟲放在跑道起點，等個體完全不移動時記錄結果

2. 共生藻光反應效率檢測

(1) 將扁蟲置於內含 0.9%生理食鹽水之離心管並靜置 15~20 分鐘，利用滲透壓差原理使扁重體表破裂，體內共生藻游離

(2) 將樣本離心(5000 轉 3 分鐘)後再將上清液去除，加入海水約 0.5 mL 及 DCPIP 一滴

(3) 取一空離心管加入海水 0.5 mL 及 DCPIP 一滴作為對照組

(4) 將實驗組與對照組放置於設計好的色光環境內靜置 40~50 分鐘後再將樣本離心 3000 轉 5 分鐘

(5) 取離心後樣本之上清液行 450nm 光穿透度、吸收度分析(顯微光譜儀、分光光度計)

6. **結果:**

(1) 扁蟲的避光行為

I. 以 50%個體數分布界線呈現趨勢

(2) 共生藻光反應效率檢測

I. 取上清液量測 450nm 光吸收度或穿透率值

II. 比較不同色光環境的數據，可利用 ANOVA 檢定、T 檢定等統計方法來分析數據比較差異

7. **問題與討論:**

(1) 試以扁蟲生存的環境推論紅光為兩者共生媒介的原因

(2) 為什麼 DCPIP(2,6-dichlorophenolin dophenol)能用於檢定光反應效率，其原理?

(3) 試想扁蟲與共生藻的共生關係具有什麼樣的生態意義? 重要性何在?

8. **參考答案:**

(1) 三尾扁蟲的野外生存環境為海底 8 公尺深處，此環境中之可見光以長波長為主，恰好為扁蟲體內共生藻有效行光反應之波長，由此可以推論共生藻乃是適應該環境生存而直接影響了三尾扁蟲在紅光底下的生理行為

(2) DCPIP 為常用之光反應褪色指示劑，原理是取代光反應中之電子傳遞物 $NADP^+$ 還原而褪色，也就是常聽到的希爾反應(Hill' s reaction)其反應式如下:

希爾反應 :

$$2H_2O + 2DCPIP \rightarrow 2DCPIPH_2 + O_2$$

(3) 三尾扁蟲與體內共生藻之互利共生直接的影響了扁蟲在野外的散布情形，亦即散布於洞穴口的現象，此外，一個需要大量能量生長、繁殖、移動的動物竟能不進食而完全依賴體內共生藻行光合作用提供的養分，在生態系中是非常罕見的，固其生態意義不容小覷

五、參考文獻

(二) 中文文獻

1. 基礎生物(下)第六章－兩物種間交互作用
2. 海洋舞者-揭維邦、郭士杰，台灣的多歧腸海扁蟲 ，2014，海洋生物博物館，

(三) 英文文獻

1. Ishikura, M., C. Kato, and T. Maruyama. "UV-absorbing substances in zooxanthellate and azooxanthellate clams." *Marine Biology* 128.4 (1997): 649-655.
2. Maruyama, Tadashi, Euichi Hirose, and Masaharu Ishikura. "Ultraviolet-light-absorbing tunic cells in didemnid ascidians hosting a symbiotic photo-oxygenic prokaryote, Prochloron." *The Biological Bulletin* 204.2 (2003): 109-113.
3. Hirose, Euichi, et al. "Ultraviolet absorption in ascidian tunic and ascidian-Prochloron symbiosis." *Journal of the Marine Biological Association of the UK*84.04 (2004): 789-794.
4. Hirose, Euichi, and Mamiko Hirose. "Body colors and algal distribution in the acoel flatworm Convolutriloba longifissura: histology and ultrastructure."*Zoological science* 24.12 (2007): 1241-1246.
5. Shannon, Thomas, Walter I. Hatch, and William K. Fitt. "Evidence of photosynthate translocation in an algal-acoel symbiotic system: An in vivo, qualitative approach." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*382.1 (2009): 69-75.

6. III, Thomas Shannon, and Johannes G. Achatz. "Convolutriloba macropyga sp. nov., an uncommonly fecund acoel (Acoelomorpha) discovered in tropical aquaria." *Zootaxa* 1525 (2007): 1-17.
7. Åkesson, Bertil, et al. "Fission in Convolutriloba longifissura: asexual reproduction in acoelous turbellarians revisited." *Acta Zoologica* 82.3 (2001): 231-239.
8. Gschwentner, Robert, et al. "Fine structure and evolutionary significance of sagittocysts of Convolutriloba longifissura (Acoela, Platyhelminthes)."*Invertebrate Biology* (1999): 332-345.
9. Bartolomaeus, T., and I. Balzer. "Convolutriloba longifissura nov. spec.(Acoela)-the first case of longitudinal fission in Plathelminthes." *Microfauna Marina* 11 (1997): 7-18.
10. Winsor, L. "Marine turbellaria (Acoela) from north Queensland." *Memoirs of the Queensland Museum* 28.2 (1990): 785-800.
11. Hendelberg, Jan, and B. Åkesson. "Convolutriloba retrogemma gen. et sp. n., a turbellarian (Acoela, Platyhelminthes) with reversed polarity of reproductive buds." *Fortschr Zool* 36 (1988): 321-327.
12. Shannon III, Thomas. "Photosmoregulation: Evidence of host behavioral photoregulation of an algal endosymbiont by the acoel *Convolutriloba Retrogemma* as a means of non-metabolic osmoregulation. "
13. Tamura, Koichiro, et al. "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0." Molecular biology and evolution 30.12 (2013): 2725-2729.

【評語】050006

很有趣也很有價值的研究。研究內容分為兩個主要部分，前半部是分類，後半部是生態（共生）。建議分類部分對新緣分析理論更作深入的了解，對生態部分有更多數據與統計會更好。