

花蓮縣第 66 屆國民中小學科學展覽會

作品說明書

科 別：生物科

組 別：☒國中組 ☐高中組

作品名稱：感官節律光刺激對斑馬魚學習行為之影響：一項以
GENUS理論為啟發的行為研究

關 鍵 詞：斑馬魚（*Danio rerio*）、

Gamma 頻率光刺激

（Gamma-frequency Light Stimulation）、

T 迷宮學習（T-maze Learning）（最多三個）

編 號：（由教育處統一編列）

摘要

本研究探討 40 Hz 規律光刺激是否影響斑馬魚 (*Danio rerio*) 之行為表現。根據 GENUS (gamma entrainment using sensory stimulation) 理論，節律性感官刺激可誘發大腦 gamma 節律並影響認知功能，惟相關研究多集中於哺乳類，對魚類模型仍缺乏驗證。本研究以雄性成年斑馬魚為對象，建構非侵入式 40 Hz LED 光刺激系統，並結合 T 迷宮測試，比較光刺激組 (GENUS) 與對照組 (Control) 之行為差異。結果顯示，光刺激組在潛伏期、錯誤次數與正確率上呈現較差趨勢，但未達統計顯著 ($p > .05$)，然而 effect size 分析顯示兩組間具有中等程度差異 (Cohen's $d \approx 0.5$)，暗示潛在效應存在。進一步分析行為變異結構，本研究建立反應時間 (latency) 與變異係數 (coefficient of variation, CV) 之數學關係模型，發現兩者呈現穩定負相關。線性回歸顯示，GENUS 組之關係顯著強於對照組 ($R^2 = 0.764$ vs. 0.155)，且共變數分析 (ANCOVA) 顯示 latency 與組別之交互作用達顯著 ($P = 0.00175$)，表示 GENUS 顯著改變 latency 與行為變異之間的關係結構。此結果指出，GENUS 並非僅影響行為表現之平均值，而是重組行為中速度與穩定性之耦合關係。綜合而言，本研究顯示 40 Hz 光刺激在斑馬魚中可能未直接改善行為表現，但已對行為系統之內在結構產生影響，支持 GENUS 可能透過神經同步機制改變行為調控模式。此結果亦提出一項重要觀點：即使傳統指標未達顯著差異，透過行為變異與數學模型分析，仍可揭示潛在神經機制變化。本研究因此提供一種以行為變異結構推論神經機制之創新分析方法，並拓展 GENUS 理論於非哺乳類模型之應用。

壹、前言

一、研究動機

大腦神經細胞會產生多種節律性電活動，其中 gamma 波(約 30 – 80 Hz)被認為與學習、記憶、注意力及訊息整合等高階認知功能密切相關。Gamma 節律能促進不同腦區之神經同步活動，強化突觸可塑性與長期增益作用（long-term potentiation, LTP），並參與記憶形成與鞏固歷程。

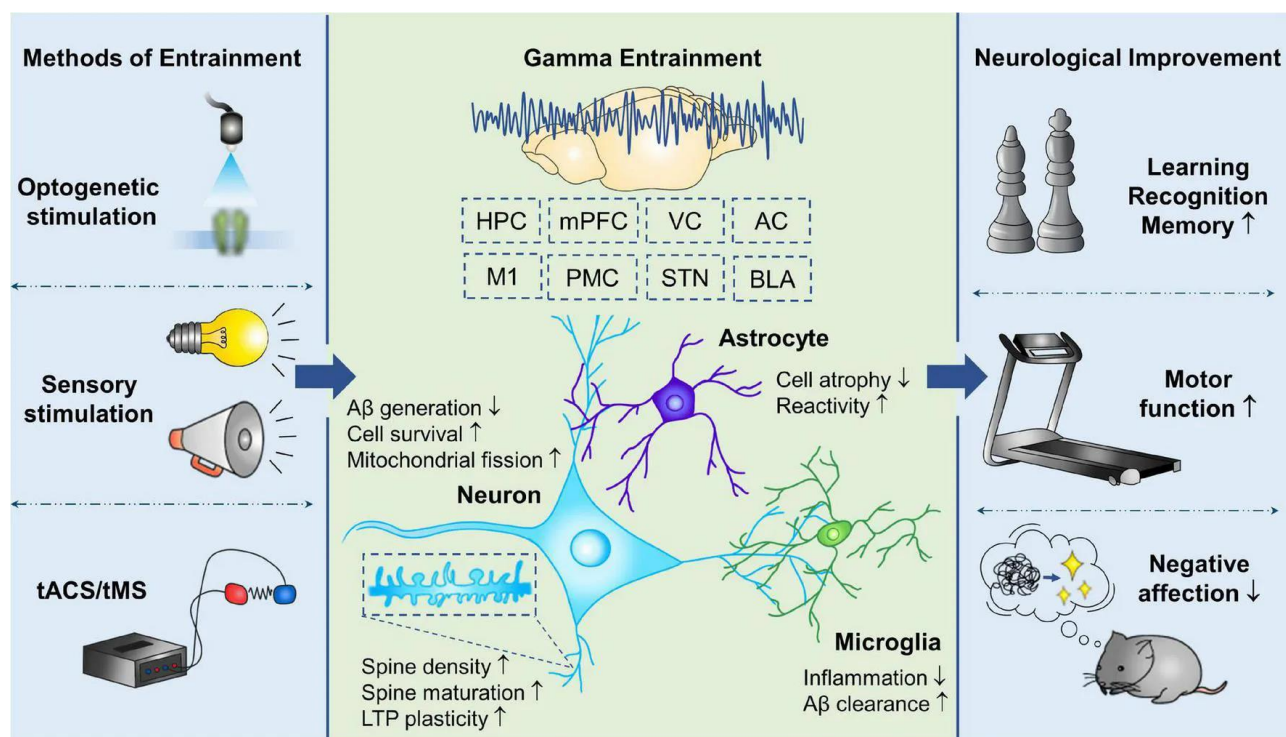


圖1 Gamma 節律同步（Gamma entrainment）對大腦功能影響示意圖。

本圖說明透過規律的感官刺激（如 40 Hz 光刺激），可以誘發大腦產生 gamma 節律同步現象。當大腦不同區域產生同步活動時，能提升神經連結與突觸可塑性，並調節神經元與膠細胞（如微膠細胞）的功能，進而改善學習與記憶能力、動作功能及情緒表現。本研究即以此理論為基礎，探討 40 Hz 光刺激是否影響斑馬魚的學習行為。

（資料來源：Guan et al., 2022 Front. Cell. Neurosci. 16:962957. doi: 10.3389/fncel.2022.96295）(1)

近年來，透過規律感官刺激（如光或聲音）誘發大腦產生 gamma 同步活動的方法——即 GENUS（gamma entrainment using sensory stimulation）——逐漸受到重視，並已在哺乳類動物研究中顯示其具促進認知功能與神經調控之潛力。

然而，目前相關研究多集中於小鼠與人類模型，對於此類節律性刺激是否能影響其他模式生物之學習行為，仍缺乏系統性探討。因此，有必要進行跨物種驗證，以釐清 GENUS 理

論之適用範圍與生物學意義。

斑馬魚 (*Danio rerio*) 具有高度發達的視覺系統與良好的行為可塑性，且其神經系統在演化上具有一定保守性，已廣泛應用於神經科學與行為研究。因此，本研究選擇斑馬魚作為實驗模型，探討節律性光刺激對學習行為之影響。

二、目的

本研究旨在探討 40 Hz 規律光刺激(屬於 gamma 頻率)是否會影響斑馬魚之學習表現，並評估 GENUS 理論於魚類模型之適用性。

本研究具體目的如下：

- (一) 建立非侵入式 40 Hz LED 光刺激系統。
- (二) 利用 T 迷宮測試評估斑馬魚之行為表現。
- (三) 比較光刺激組 (GENUS) 與對照組 (Control) 之差異。
- (四) 分析節律性光刺激對行為表現之影響趨勢。

三、文獻回顧

Gamma 節律在中樞神經系統中扮演重要角色，與神經同步、資訊整合及認知功能密切相關。研究指出，gamma 活動可促進突觸可塑性與長期增益作用 (long-term potentiation, LTP)，並參與學習與記憶之形成與維持 (2)。

近年來，透過規律感官刺激誘發 gamma 同步活動的研究逐漸增加。Guan 等人 (2022) 之綜述研究指出，gamma entrainment 可透過多種方式誘發，包括感官刺激（光或聲音）、光遺傳刺激以及非侵入式電刺激等。該研究顯示，gamma 同步可影響神經元與膠細胞之功能，例如提升突觸密度、增強 LTP 可塑性、調節 microglia 活性及降低神經發炎反應，進而影響認知表現 (1)。

此外，Adaikkan 與 Tsai (3)亦指出，gamma entrainment 可能透過調控神經網絡與膠細胞互動，影響學習與記憶相關神經迴路，顯示其在神經調控與疾病治療上具有潛力。然而，其效果可能依賴刺激條件與物種差異。

在動物行為模型方面，斑馬魚已被廣泛應用於學習與記憶研究。Tan (4)等人指出，斑馬魚

具有良好的空間學習與記憶能力，並可透過 T 迷宮或 Y 迷宮等行為測試進行評估，為神經行為研究的重要模式生物。然而，目前 GENUS 相關研究多集中於哺乳類動物，其對學習與記憶之影響亦存在結果不一致的情形 (3)。

此外，雖有研究顯示 40 Hz 光刺激可影響神經節律與突觸功能，但其行為層級效果可能受到物種差異、刺激參數及實驗設計影響 (5)。因此，目前尚缺乏針對魚類模型之系統性驗證研究，亦不清楚 GENUS 效應是否能在斑馬魚之行為層級中呈現。基於此，本研究透過 40 Hz 光刺激結合 T 迷宮行為測試，探討節律性刺激對斑馬魚行為表現之影響，以補足跨物種研究之不足。

貳、 研究設備及器材

一、斑馬魚飼養與行為測試裝置

(一) 斑馬魚飼養系統（慈濟大學斑馬魚實驗室）

健康成年的雄性斑馬魚（*Danio rario*）（六個月大，取自於慈濟大學斑馬魚核心實驗室考量雌性會有賀爾蒙干擾，故未選用）、魚缸、水質控制器、加溫器、照明設備、飼料等。

雄性斑馬魚（*Danio rario*，品種：AB strain），共12隻，單隻平均重量：0.5克，飼養平均溫度：27℃。



圖2 所有斑馬魚（作者實拍）



圖3 單隻斑馬魚（作者實拍）



圖4 飼料（作者實拍）

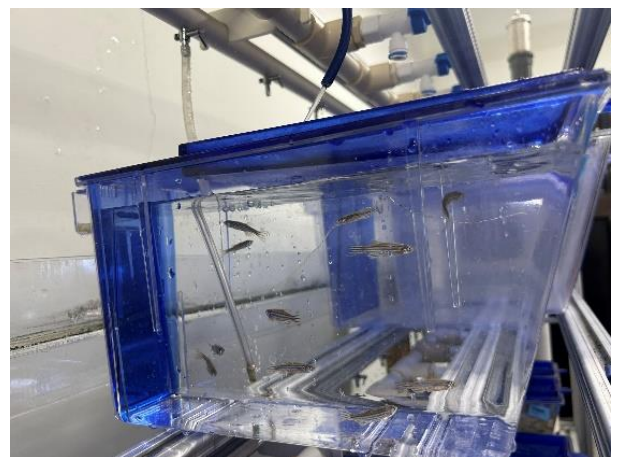


圖5 飼養裝置（作者實拍）

(二) T 迷宮實驗裝置

1. 壓克力製透明 T 型迷宮（T-maze）。
2. 食物投放系統。

3. 恆溫水循環設備。

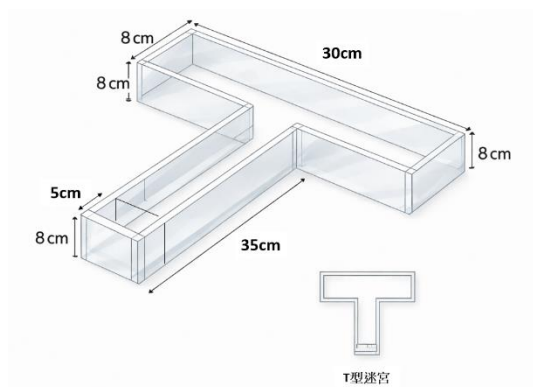


圖6 T迷宮實驗裝置圖（作者自行繪製）

圖7 T迷宮實驗裝置圖（作者實拍）

（三） 行為紀錄系統

1. iPhone 6手機（上視角）。



圖8 iPhone 6手機（作者實拍）

二、40 Hz裝置（GENUS 實驗核心）

（一） 波形產生器（Function Generator）

1. 輸出 40 Hz TTL 方波訊號，驅動開關板進行閃爍控制。

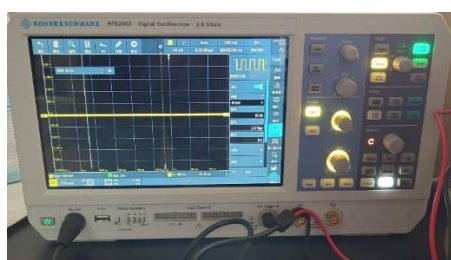


圖9 波形產生器（Function Generator）（作者實拍）

（二） TTL（Transistor – Transistor Logic）控制 USB 電源開關板（控制光源閃爍）

1. 類型：MOSFET / Load Switch。
2. 規格：5V， $\geq 3A$ ，IN/GND 控制腳。



圖10 TTL控制USB 電源開關板（作者實拍）

（三） USB 電源供應器（5V / 3A 穩定輸出）

1. 使用手機快充頭。



圖11 手機快充頭（作者實拍）

（四） 波形產生器組裝電源開關板後示意圖



圖12 實驗組裝實拍示意圖（作者實拍）

（五） 實驗組裝示意圖

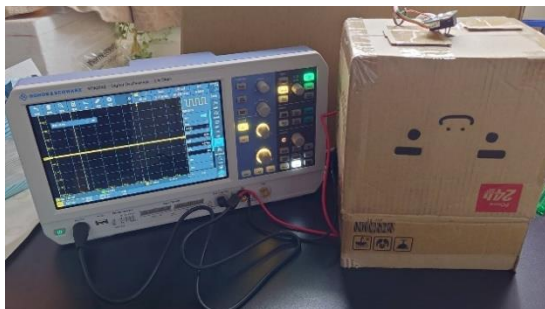


圖13 實驗組裝實拍示意圖（作者實拍）

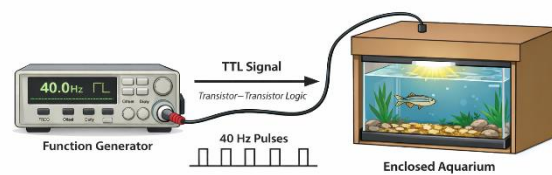


圖14（作者自行繪製）

參、研究過程或方法

一、實驗動物與倫理審查

本研究使用健康雄性的成年斑馬魚 (*Danio rerio*)。實驗前以群養方式飼養至少兩週，以確保環境適應與健康穩定。

實驗期間水溫維持 26 – 28°C，光週期設定為 14 小時光照／10 小時黑暗 (14/10)。測試前禁食 12 – 18 小時，以維持攝食動機一致性。

本研究已向慈濟醫院實驗動物照護及使用委員會 (IACUC) 提出申請，並於 2026 年 2 月 10 日通過審查，確保實驗過程符合動物福利與倫理規範。（佛教慈濟醫療財團法人花蓮慈濟醫院實驗動物照護及使用委員會審查同意書，編號：115-01）

二、實驗設計與變因控制

（一）實驗分組，本研究採兩組比較設計：

- 實驗組：接受 40 Hz 規律光刺激
- 對照組：不接受閃爍光刺激 (0 Hz，恆亮光源)

除光刺激頻率外，其餘飼養條件、測試時間與實驗流程皆保持一致，以降低干擾變因。

（二）變項定義

- 自變項 (Independent variable)：光刺激頻率 (40 Hz vs. 0 Hz)
- 依變項 (Dependent variables)：
 1. 潛伏期 (Latency)
 2. 錯誤次數 (Error count)
- 控制變項 (Controlled variables)：水溫、光週期、測試時間、迷宮尺寸、獎勵量、試次間隔 (Inter-Trial Interval, ITI) 等均維持一致，以確保實驗內部效度。

三、節律性光刺激系統

本研究建構非侵入式 40 Hz 規律光刺激系統，以模擬 GENUS (gamma entrainment using sensory stimulation) 之感官刺激模式。

- 光源設備：LED 光源板
- 控制系統：TTL 控制模組搭配波形產生器，產生穩定 40 Hz 閃爍頻率
- 電源供應：5 V／3 A USB 穩定電源輸出

- 光源位置：設置於魚缸上方
- 刺激範圍：完整覆蓋實驗區域

實驗組於每日行為測試前接受規律光刺激；對照組則維持恆亮光源（0 Hz），不提供節律性刺激。

本系統具非侵入性、頻率穩定與可重複性高之特點，可作為後續節律性刺激研究之實驗平台。

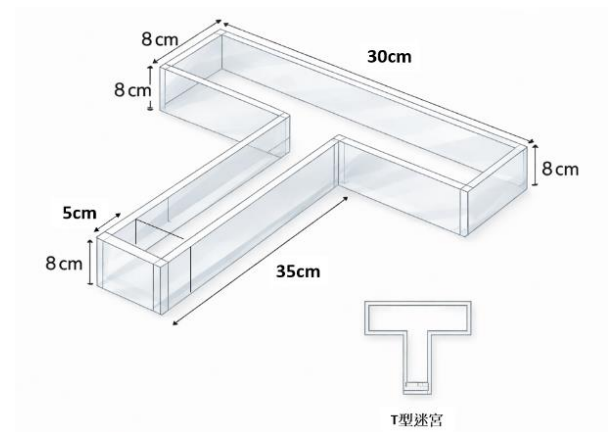
四、T 迷宮學習行為測試

（一） 迷宮規格

本研究使用標準 T 型水迷宮：

（如右圖示，同圖6 T迷宮實驗裝置圖，作者自行繪製圖示）

- 起始臂長：35 cm
- 左右臂長：30 cm
- 寬度：8 cm
- 水深：8 cm
- 材質：透明壓克力



每日固定於上午 10:00 進行測試，以降低晝夜節律影響。

（二） 實驗流程

1. 迷宮熟悉期（Day 0）

- 每尾魚自由探索無獎勵迷宮 5 - 10 分鐘，以降低新奇環境造成之焦慮反應。

2. 迷宮測試（Day 1）

- 左右臂貼不同顏色提示(右臂有綠色色卡，左臂無)，不提供食物。
- 每尾魚進行 5 次試驗。

若單側選擇比例 $\geq 70\%$ ，則判定具偏好並排除，以避免先天偏側影響學習結果。

3. 正式訓練與測試（Day 1 - 5）

- 連續 5 天學習訓練。
- 每日 5 次試驗（trials）。
- ✧ 正確選擇定義：魚體完全進入正確臂端。

✧ 回饋機制：

- 正確 → 給予少量飼料（10 - 20 秒內食用）。
- 錯誤 → 不給獎勵。

試次間隔（Inter-Trial Interval, ITI）：60 秒。

五、行為紀錄與統計分析

（一）行為資料記錄

以 iPhone 6 上視角全程錄影，並進行目視分析與紀錄：

- 潛伏期（Latency, 秒）
- 每日錯誤次數（Error count）
- 學習曲線變化

（二）資料處理方式

1. 潛伏期統一轉換為秒數。
2. 未完成選擇（如未進入任一臂）視為181秒。
3. 未完成選擇行為額外加一次錯誤次數（adjusted errors）。

（三）統計分析方法

1. 資料單位：以「每尾魚每日平均值」作為分析單位。
2. 組間比較：採獨立樣本 t 檢定。
3. 時間序列分析：採混合設計重複量測變異數分析（Mixed-design Repeated Measures ANOVA），檢驗：
 - 組別主效應（Group effect）
 - 時間主效應（Day effect）
 - 交互作用（Group × Day）
4. 顯著水準：

$$\alpha = .05$$

（四）效果量分析

為呈現實質差異大小，本研究計算 Cohen' s d：

$$d = \frac{M_{40Hz} - M_{control}}{SD_{pooled}}$$

並依標準解釋：

- $d = 0.2$ ：小效果
- $d = 0.5$ ：中效果
- $d = 0.8$ ：大效果

（五） 加權綜合學習指標

為整合速度與準確性，本研究建立加權綜合學習指標(Weighted Learning Index, WLI)：

$$WLI = 0.7 \times (1 - Error_{norm}) + 0.3 \times (1 - Latency_{norm})$$

說明：

- $Error_{norm}$ 、 $Latency_{norm}$ 為標準化後數值。
- 權重設定反映「準確性優先於速度」之學習特性。

此方法可避免單一指標限制，提升整體學習評估之敏感度與解釋力。

（六） 變異係數 (Coefficient of Variation, CV)

變異係數 (CV) 為標準差除以平均值，用來表示資料的相對變異程度，常用於比較測試結果的穩定性。

$$CV(\%) = \left(\frac{SD}{Mean} \right) \times 100\%$$

六、實驗流程

本研究流程從斑馬魚準備開始，經由 40 Hz 光刺激處理後，進行 T 迷宮學習測試，收集潛伏期與正確率等行為資料，接著進行統計分析與加權整合分析，最後評估學習效果。

整合感官刺激、行為測試與統計分析，以系統性評估節律性光刺激對學習行為之影響。

肆、研究結果

一、潛伏期（Latency）結果

本研究比較控制組(CTL)與 GENUS 組在五天學習測試中的反應潛伏時間(Latency, sec)。

從圖15可觀察到：整體趨勢在所有五個測試日中，GENUS 組的平均 latency 均高於 CTL 組。

- 時間變化（Day effect）：

CTL 組在 Day 1 至 Day 4 呈現上升趨勢，Day 5 略下降。

GENUS 組則在 Day 1 至 Day 4 持續上升，Day 5 亦有下降。

- 組間差異（Group difference）

Day 1：GENUS 明顯高於 CTL。

Day 2 - 4：差異持續存在。

Day 5：差距略為縮小，但仍維持 GENUS > CTL。

變異性（Variation）：各組誤差範圍（error bars）較大，顯示個體間差異明顯。

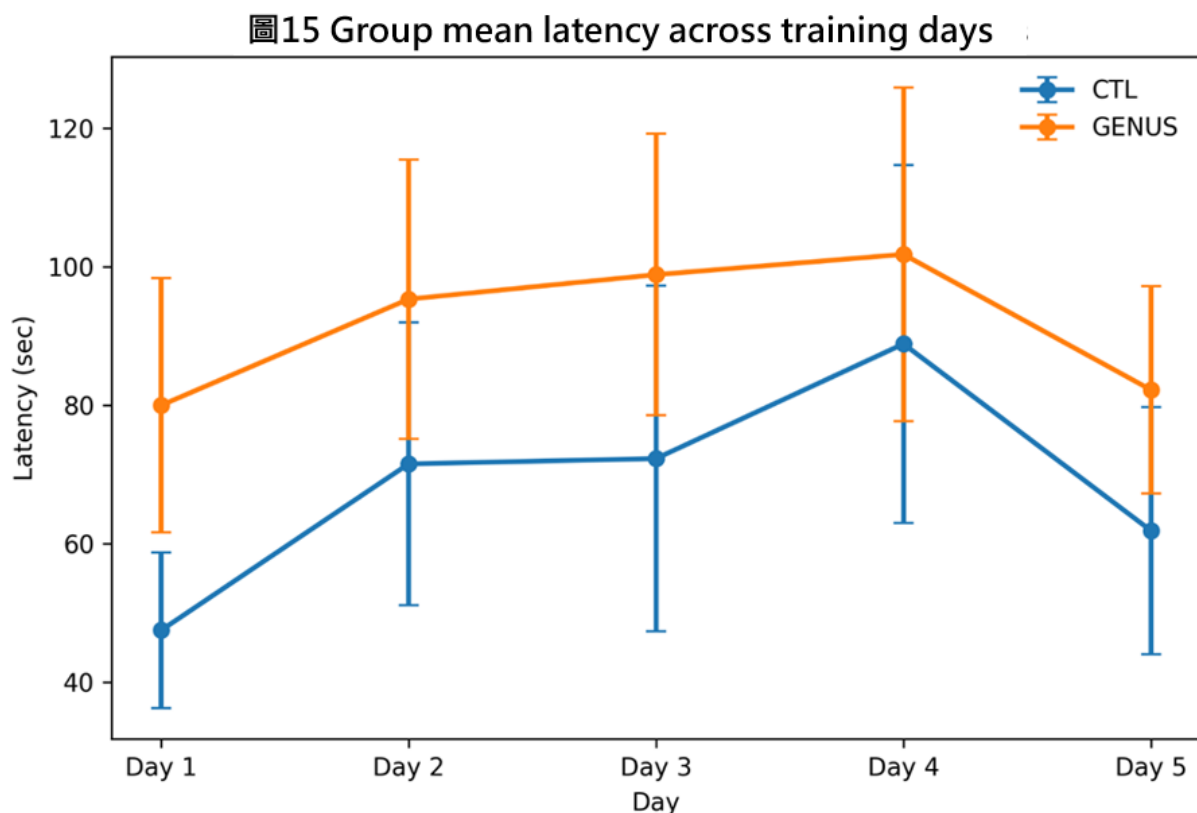


圖15. 各組斑馬魚每日反應時間變異係數（CV, %）之比較（平均值 ± 標準差）。

CV (coefficient of variation) 表示反應時間之變異程度。CTL 為對照組（無光刺激）；GENUS

為 40 Hz 光刺激組。資料以平均值 $\pm$ 標準差 (SD) 呈現，各組樣本數 $n = 6$ 。40 Hz 光刺激對潛伏期 (latency) 之影響，無照光組與 40 Hz 光刺激組斑馬魚於T迷宮學習試驗中各訓練日之平均潛伏期 (平均值 $\pm$ 標準差) 比較，此圖呈現兩組斑馬魚在五天訓練中的平均潛伏期變化，可觀察學習趨勢與組間差異。(作者自行繪製)

二、錯誤次數 (Error count) 結果

本研究比較CTL組與GENUS組在五天內的變化情形。結果顯示，GENUS組在所有時間點的錯誤次數平均值皆高於CTL組，且兩組皆於第4天達到最高值。然而，各組數據的標準差較大，顯示個體間差異明顯。進一步以獨立樣本t檢定分析各時間點差異，結果顯示五天的p值皆大於0.05，未達統計顯著差異。雖然GENUS組呈現較高的數值趨勢，但在統計上無法證明其與CTL組之間具有顯著差異。

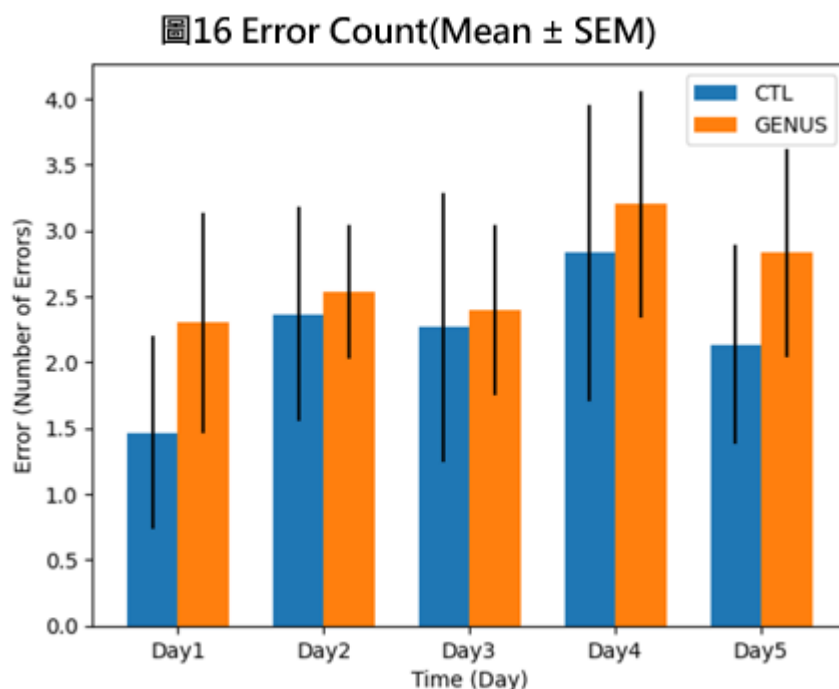


圖16. 各組斑馬魚於不同測試日之反應時間 (Latency) 變化 (平均值 $\pm$ 標準誤)。

反應時間越短代表行為表現越佳。CTL 為對照組；GENUS 為 40 Hz 光刺激組。資料以平均值 $\pm$ 標準誤 (SEM) 呈現，各組樣本數 $n = 6$ 。40 Hz 光刺激對錯誤次數 (error count) 之影響，無照光組與 40 Hz 光刺激組斑馬魚於各訓練日之變異係數 (CV) 與標準差比較 (含每日 t 檢定)。此圖顯示兩組在各天的行為變異程度，並透過 t 檢定比較組間差異，可觀察光刺激對行為穩定性的影響。(作者自行繪製)

三、加權綜合學習指標 (WLI)

由於實驗數據存在極端值（例如 181, 174.6）並有很大變異（SD 很高），因此在計算權重時我們以 robust normalization將潛伏期與錯誤次數予以標準化。

$$\frac{x - \text{median}}{IQR}$$

使用中位數（median）與四分位距（IQR, interquartile range）進行資料標準化，以降低極端值對分析結果的影響。IQR=Q3-Q1，Q1 =扣掉median 前半段的中位數，Q3 = 扣掉median後半段的中位數。

四、行為變異與失敗風險之分析

本研究利用加權學習指標（WLI）分析CTL組與GENUS組在五天內的行為表現變化。結果顯示，CTL組整體表現較穩定，各時間點WLI變化幅度較小；相較之下，GENUS組在第4天出現較明顯下降，顯示其行為表現受到較大影響。整體趨勢顯示，兩組皆由第1天至第4天逐漸下降，並於第5天回升，但GENUS組的變化幅度較大（見圖17.A）。

在個體分析中可觀察到，GENUS組具有較大的個體差異，部分個體在第4天WLI明顯降低，我們設定0.4為失敗閾值，CTL組多數維持於閾值以上，顯示GENUS組較容易出現行為失敗的情形（見圖17.B）。

進一步以失敗率（WLI < 0.4）分析發現，GENUS組自第3天開始失敗比例上升，並在第4與第5天達到最高（50%），高於CTL組約33.3%的比例。此結果顯示GENUS主要增加行為失敗的風險，而非僅影響平均表現（見圖17.C）。

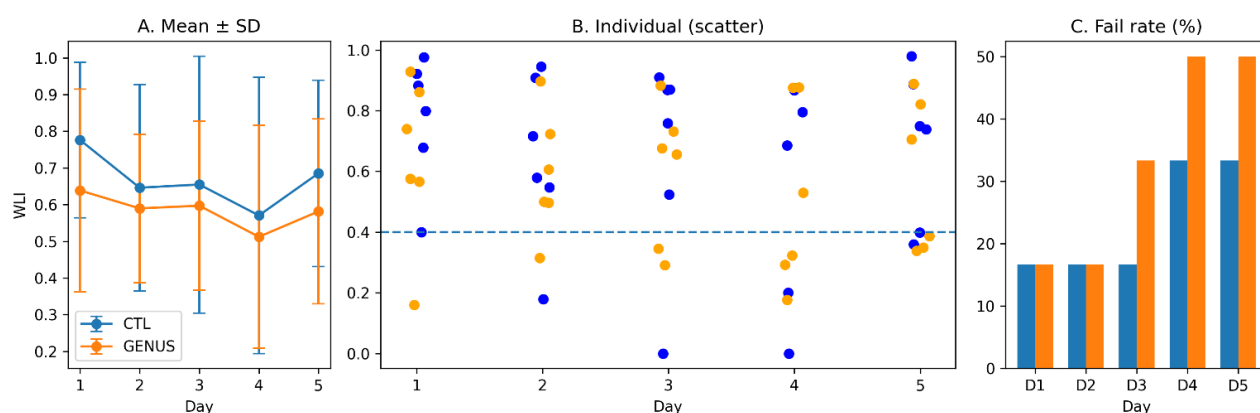


圖17. 各組斑馬魚於不同測試日之錯誤次數（Error count）比較（平均值 ± 標準誤）。錯誤次數代表未正確進入目標臂之次數。CTL 為對照組；GENUS 為 40 Hz 光刺激組。資料以平均值 ± 標準誤（SEM）呈現，各組樣本數 n = 6。40 Hz 光刺激對加權學習指標

(WLI)之影響，第1天至第5天加權學習指標(WLI)之變化：(A) 各組WLI平均值(Mean $\pm$ SD)，顯示CTL組表現較穩定，GENUS組於第4天出現明顯下降。(B) 個體資料散點圖(含0.4閾值虛線)，顯示GENUS組在第4天有較多個體低於閾值，呈現行為失敗現象。(C) 失敗率分析(WLI<0.4)，顯示GENUS組自第3天開始失敗率上升，並在第4與第5天達到最高。(作者自行繪製)

五、權重敏感度分析(WLI robustness)：



圖18. 各組斑馬魚加權學習指標(WLI)於不同測試日之變化(平均值 $\pm$ 標準誤)。

WLI (weighted learning index) 整合反應時間與錯誤次數，用以評估整體行為表現，數值越高代表表現越佳。CTL 為對照組；GENUS 為 40 Hz 光刺激組。資料以平均值 $\pm$ 標準誤 (SEM) 呈現，各組樣本數 $n=6$ 。本圖呈現不同錯誤權重 ($w=0.5-0.9$) 對加權學習指標(WLI)之影響。隨權重增加，WLI 數值整體下降，但各天之變化趨勢維持一致。(作者自行繪製)

在本圖顯示在不同錯誤權重設定下 ($w=0.5-0.9$)，WLI 隨訓練天數之變化情形。結果顯示，隨著錯誤權重增加，整體 WLI 數值呈現下降趨勢，反映錯誤在指標中的影響程度提高。然而，各權重條件下之變化趨勢一致，皆呈現第 1 天至第 4 天逐漸下降，並於第 5 天回升之型態。

此結果顯示，雖然權重設定會影響 WLI 的絕對數值，但不會改變整體趨勢，顯示本研究之結果具有穩定性（robustness）。因此，WLI 作為整合行為指標在不同權重設定下仍具解釋力。

六、無照光組（CTL）與 40 Hz 光刺激組（GENUS）各訓練日變異係數（CV，平均值 $\pm$ 標準差）比較圖：

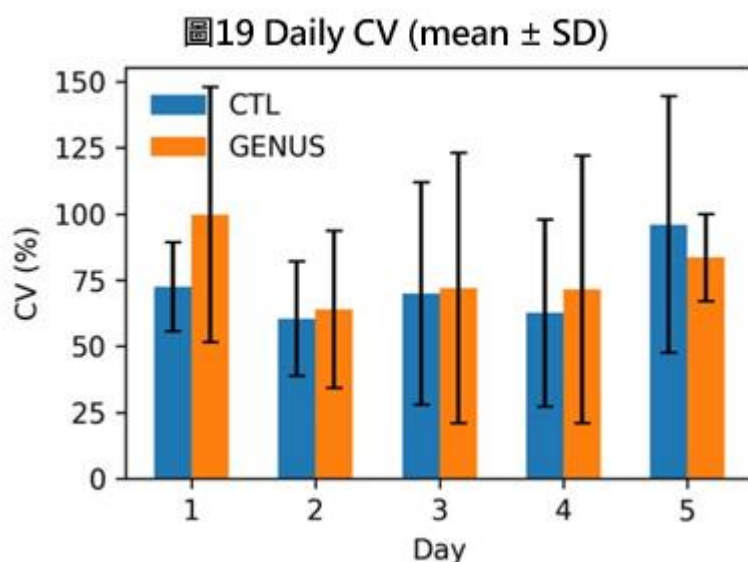


圖19. 本圖呈現無照光組(CTL)與 40 Hz 光刺激組(GENUS)於各訓練日之變異係數(CV)平均值與標準差。（作者自行繪製）

本圖顯示兩組在各訓練日之行為變異程度。整體而言，GENUS 組於多數時間點呈現較高 CV，顯示其行為表現較不穩定，且標準差亦較大，反映個體差異較明顯。兩組皆未呈現明顯隨時間下降之趨勢，顯示學習過程中行為穩定性未顯著提升。

此外，第 5 天兩組 CV 皆上升，可能與實驗後期疲勞或策略改變有關。

七、無照光組（CTL）與 40 Hz 光刺激組（GENUS）潛伏期與變異係數（CV）之關係（線性回歸分析）

下圖顯示潛伏期（latency）與變異係數（CV）之關係。兩組皆呈現負相關趨勢，表示反應時間越長，行為變異性越低。然而，GENUS 組之斜率較陡（-0.773 vs. -0.280），且解釋力顯著較高（ $R^2 = 0.764$ vs. 0.155），顯示在光刺激條件下，latency 與行為穩定性之關聯性顯著增強。

此結果顯示 GENUS 並非僅影響行為表現之平均值，而是改變行為中「速度(latency)」與「穩定性 (CV)」之耦合關係。

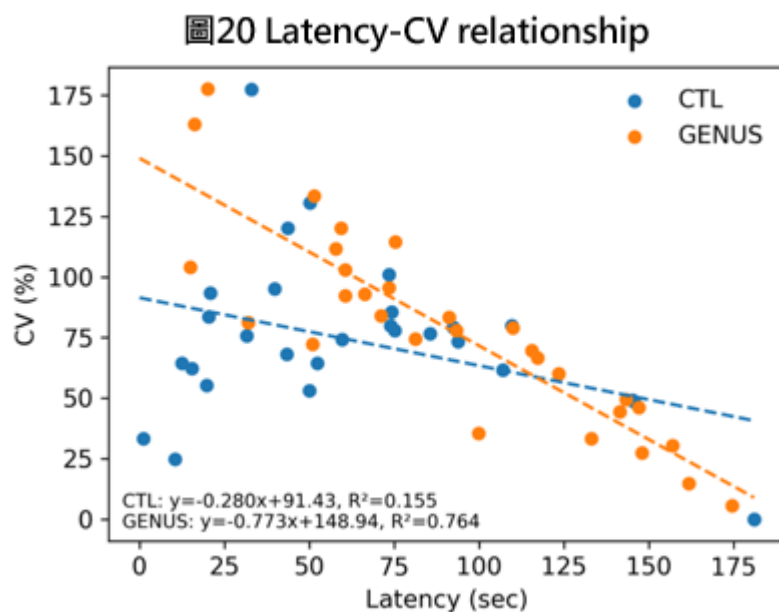


圖20. 反應時間 (Latency) 與變異係數 (CV) 之關係。(作者自行繪製)

每一資料點代表單一個體之測量值。CTL 為對照組 (無光刺激)；GENUS 為 40 Hz 光刺激組。兩組皆呈現負相關趨勢，其線性迴歸結果如下：

CTL 組： $CV = -0.280 \times \text{Latency} + 91.43$ ($R^2 = 0.155$)

GENUS 組： $CV = -0.773 \times \text{Latency} + 148.94$ ($R^2 = 0.764$)

顯示 GENUS 組之反應時間與行為變異性之間具有較強之線性關係，可能反映其對行為穩定性與調控機制之影響。

伍、 討論

一、40 Hz 光刺激對潛伏期(latency)之影響

潛伏期（latency）為評估學習效率之重要指標，反應時間越短通常代表行為表現越佳。由圖15可見，對照組（CTL）整體潛伏期較低，顯示其在迷宮任務中具有較佳的行為表現；相較之下，GENUS 組潛伏期較高，顯示其可能出現學習延遲（learning delay），或採取不同的行為策略（behavioral strategy shift）。

過去研究指出，40 Hz（ γ 頻率）刺激與注意力、學習及記憶功能密切相關，並可透過調控神經網路同步影響認知表現 (6)。然而，相關研究多集中於疾病模型中之功能改善。本研究結果顯示，在正常行為學習情境下，40 Hz 刺激未必提升學習效率，顯示其效果可能具有情境依賴性。

在時間變化上，兩組於 Day 1 至 Day 4 均呈現潛伏期上升趨勢，可能與任務熟悉後動機下降、食物獎勵吸引力減弱，或反覆測試所產生之疲勞效應（fatigue effect）有關。行為研究指出，重複測試可能導致習慣化（habituation）、壓力累積或動機改變，進而影響行為表現 (7-9)。此外，動物在學習過程中亦可能調整探索與決策策略，使表現不呈現單純線性改善 (10)。

至於 Day 5 潛伏期下降，可能反映行為逐漸穩定或環境適應完成。過去研究指出，隨經驗累積，動物行為會趨於穩定並降低變異性，與記憶鞏固（memory consolidation）及神經網路穩定化有關 (8, 11, 12)。

綜合而言，本研究推測 GENUS（40 Hz）刺激並非單純抑制學習能力，而可能透過調整神經同步與決策策略，影響行為反應時間。此結果與 γ 振盪在注意力、知覺整合與決策歷程中的角色一致 (13 - 15)，並顯示其影響可能表現在行為策略層級，而非單純的認知提升或下降。

二、40 Hz 光刺激對錯誤次數(error count)之影響

本研究結果顯示，GENUS 組在各時間點之錯誤次數普遍高於 CTL 組，顯示在本實驗條件下，40 Hz 光刺激未能改善錯誤表現。然而，各時間點差異均未達統計顯著（ $p > .05$ ），顯示觀察到之差異可能來自隨機變異。

此結果可能與生物個體差異有關。動物行為資料常具有高度變異性，可能導致數據分散並降低統計檢定力 (16)。此外，本研究觀察到兩組於第 4 天皆出現錯誤次數上升，推測可能與疲勞效應、環境適應或操作變異有關。相關研究指出，時間因素會影響行為測量穩定性並增加變異性 (17)。

在統計呈現方面，本研究採用標準誤 (SEM) 作為誤差指標，以反映平均值之估計精確度。SEM 適用於比較組間平均差異，但若誤用於描述資料分散程度，可能低估實際變異性，因此在解讀時需審慎 (18)。

此外，本研究樣本數較少 ($n=6$)，可能導致統計檢定力 (statistical power) 不足，使潛在差異未能被偵測。未來研究可透過增加樣本數、強化實驗控制或採用雙因子變異數分析，以提升結果之穩定性與解釋力。

三、40 Hz 光刺激對加權學習指標 (WLI) 之影響

本研究以加權學習指標 (WLI) 整合潛伏期與錯誤次數，以評估整體行為表現。結果顯示，兩組皆呈現 Day 1 至 Day 4 下降、Day 5 回升之趨勢，但 GENUS 組下降幅度較大，顯示其行為表現波動性較高。

在個體層級分析中，GENUS 組呈現較高變異性，部分個體於第 4 天出現顯著表現下降 ($WLI < 0.4$)。此結果顯示 GENUS 的影響具有個體差異特性，平均值可能掩蓋部分極端反應。相關研究亦指出，動物學習與記憶表現具有顯著個體差異 (19)。

進一步分析顯示，GENUS 組自第 3 天起低表現個體比例上升，並於第 4-5 天達到最高 (約 50%)，高於 CTL 組 (約 33.3%)，顯示 GENUS 主要增加行為失敗之機率，而非均勻降低所有個體表現。此現象與壓力或外在刺激對部分個體產生選擇性影響之研究結果一致 (20)。

此外，本研究以 $WLI=0.4$ 作為行為失敗閾值，該閾值不僅符合數據分布特徵，亦與行為表現變化一致，顯示其具有生物學意義。

綜合而言，GENUS 並非均勻降低整體表現，而是增加個體差異性，使部分個體更易進入低表現狀態，顯示在行為分析中應同時考慮個體差異與失敗率，而非僅依賴平均

值。

四、反應時間（latency）與變異係數（CV）之關係

本研究發現，僅以平均值比較時，GENUS 與 CTL 組在 CV 上未達顯著差異（圖 19），顯示傳統平均值分析可能無法揭示行為系統之細微變化。然而，個體層級分析顯示 latency 與 CV 之間存在穩定負相關，反映反應時間與行為穩定性之間的權衡關係，與速度－準確性取捨（speed – accuracy trade-off）理論一致 (22)。

值得注意的是，此關係在不同組別中呈現差異：CTL 組相關性較低（ $R^2 = 0.155$ ），而 GENUS 組則呈現高度線性關係（ $R^2 = 0.764$ ）（圖20），顯示 GENUS 可能強化反應速度與變異之間的耦合關係（coupling structure）。

此結果支持「行為變異具有功能性」之觀點，即變異並非純粹噪音，而可能反映神經網路調控狀態 (23-25)。此外， γ 振盪已被證實可促進神經同步與訊息整合 (26, 27)，可能使行為輸出呈現更一致且可預測之模式。

整體而言，本研究提出以 latency – CV 關係分析行為變異結構之方法，不僅補充傳統平均值分析之不足，也提供由行為層級推論神經機制之可能途徑。

陸、 結論

本研究探討 40 Hz 規律光刺激 (GENUS) 對斑馬魚 (*Danio rerio*) 行為表現之影響。結果顯示，在本實驗條件下，光刺激組在潛伏期、錯誤次數及整體行為指標上皆呈現較差趨勢，但未達統計顯著差異 ($p > .05$)。然而，效果量分析顯示兩組之間具有中等程度差異 (Cohen's $d \approx 0.5$)，顯示 40 Hz 光刺激可能對行為表現產生一定影響。

進一步分析發現，GENUS 並未均勻影響所有個體，而是增加行為表現之變異性，使部分個體更容易出現低表現或失敗狀態。此結果指出，節律性光刺激的影響可能表現在行為穩定性與策略調整，而非單純提升或降低學習能力。

此外，本研究透過 latency - CV 關係分析發現，GENUS 可能改變反應速度與行為變異之間的耦合結構，顯示其影響不僅限於平均表現，而可能涉及神經調控機制的改變。

然而，本研究仍存在若干限制，包括樣本數較少及個體差異較大，可能導致統計檢定力不足，使潛在差異未能達到顯著。未來研究可增加樣本數、優化實驗設計，並結合神經活動量測 (如腦電或影像技術)，以進一步驗證 GENUS 在不同物種中的作用機制。

綜合而言，本研究未觀察到 40 Hz 光刺激對斑馬魚行為表現之顯著促進效果，但結果顯示其可能影響行為變異性與個體表現分布。進一步分析顯示，GENUS 可能改變反應時間與行為變異之間的關係 (latency - CV 結構)，反映其對行為穩定性與調控機制之潛在影響。本研究建立斑馬魚節律光刺激與行為分析之實驗平台，為跨物種神經節律研究提供初步實驗基礎。

柒、 參考文獻資料

1. Guan A, Wang S, Huang A, Qiu C, Li Y, Li X, et al. The role of gamma oscillations in central nervous system diseases: Mechanism and treatment. *Front Cell Neurosci.* 2022;16:962957.
2. Manippa V, Filardi M, Vilella D, Logroscino G, Rivolta D. Gamma (60 Hz) auditory stimulation improves intrusions but not recall and working memory in healthy adults. *Behav Brain Res.* 2024;456:114703.
3. Adaikkan C, Tsai LH. Gamma Entrainment: Impact on Neurocircuits, Glia, and Therapeutic Opportunities. *Trends Neurosci.* 2020;43(1):24-41.
4. Tan JK, Nazar FH, Makpol S, Teoh SL. Zebrafish: A Pharmacological Model for Learning and Memory Research. *Molecules.* 2022;27(21).
5. Barzegar Behrooz A, Aghanoori MR, Nazari M, Latifi-Navid H, Vosoughian F, Anjomani M, et al. 40 Hz light preserves synaptic plasticity and mitochondrial function in Alzheimer's disease model. *Sci Rep.* 2024;14(1):26949.
6. Chen X, Shi X, Wu Y, Zhou Z, Chen S, Han Y, et al. Gamma oscillations and application of 40-Hz audiovisual stimulation to improve brain function. *Brain Behav.* 2022;12(12):e2811.
7. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988;31(1):47-59.
8. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 2006;1(2):848-58.
9. Rankin CH, Abrams T, Barry RJ, Bhatnagar S, Clayton DF, Colombo J, et al. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol Learn Mem.* 2009;92(2):135-8.
10. Gerlai R. Zebrafish antipredatory responses: a future for translational research? *Behav Brain Res.* 2010;207(2):223-31.
11. Takeuchi T, Duzskiewicz AJ, Morris RG. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1633):20130288.
12. Dudai Y, Karni A, Born J. The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron.* 2015;88(1):20-32.
13. Iaccarino HF, Singer AC, Martorell AJ, Rudenko A, Gao F, Gillingham TZ, et al. Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. *Nature.* 2016;540(7632):230-5.
14. Martorell AJ, Paulson AL, Suk HJ, Abdurrob F, Drummond GT, Guan W, et al. Multi-sensory Gamma Stimulation Ameliorates Alzheimer's-Associated Pathology and Improves Cognition. *Cell.* 2019;177(2):256-

71.e22.

15. Fries P. A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn Sci.* 2005;9(10):474-80.
16. Lord SJ, Velle KB, Mullins RD, Fritz-Laylin LK. SuperPlots: Communicating reproducibility and variability in cell biology. *J Cell Biol.* 2020;219(6).
17. Vaux DL, Fidler F, Cumming G. Replicates and repeats--what is the difference and is it significant? A brief discussion of statistics and experimental design. *EMBO Rep.* 2012;13(4):291-6.
18. Nagele P. Misuse of standard error of the mean (SEM) when reporting variability of a sample. A critical evaluation of four anaesthesia journals. *Br J Anaesth.* 2003;90(4):514-6.
19. Matzel LD, Han YR, Grossman H, Karnik MS, Patel D, Scott N, et al. Individual differences in the expression of a "general" learning ability in mice. *J Neurosci.* 2003;23(16):6423-33.
20. Devilbiss DM, Jenison RL, Berridge CW. Stress-induced impairment of a working memory task: role of spiking rate and spiking history predicted discharge. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(9):e1002681.
21. Crawley JN. Behavioral phenotyping of rodents. *Comp Med.* 2003;53(2):140-6.
22. Heitz RP. The speed-accuracy tradeoff: history, physiology, methodology, and behavior. *Front Neurosci.* 2014;8:150.
23. Dinstein I, Heeger DJ, Behrmann M. Neural variability: friend or foe? *Trends Cogn Sci.* 2015;19(6):322-8.
24. Garrett DD, Kovacevic N, McIntosh AR, Grady CL. The importance of being variable. *J Neurosci.* 2011;31(12):4496-503.
25. Stein RB, Gossen ER, Jones KE. Neuronal variability: noise or part of the signal? *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(5):389-97.
26. Buzsáki G, Wang XJ. Mechanisms of gamma oscillations. *Annu Rev Neurosci.* 2012;35:203-25.
27. Yamamoto J, Suh J, Takeuchi D, Tonegawa S. Successful execution of working memory linked to synchronized high-frequency gamma oscillations. *Cell.* 2014;157(4):845-57.