



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Effects of the Symbiotic Bacterium, *Xenorhabdus indica*, from the Entomopathogenic Nematode, *Steinernema abbasi*, and Its Metabolites on Insect Hemocytes and Cell Lines **【Research report】**

台灣產蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) 之共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 及其代謝物對昆蟲血球及細胞株之影響 **【研究報告】**

Mi-Hau Tsai, Li-Cheng Tang*, and Roger F. Hou*
蔡米皓、唐立正*、侯豐男*

*通訊作者E-mail: rhoul@nchu.edu.tw; lctang@nchu.edu.tw

Received: 2011/10/13 Accepted: 2011/12/23 Available online: 2010/12/01

Abstract

The symbiotic bacterium of the entomopathogenic nematode, *Steinernema abbasi* Taiwan strain, has been identified as being *Xenorhabdus indica*. Its cultured filtrates from the primary form were toxic to SF21 and S2 cell lines, causing cellular necrosis even after being autoclaved for 20 min, while those from the secondary form were not toxic to either of these two cell lines. In addition, the cultured filtrates of both forms were not toxic to the mammalian cell line, BHK21. In vitro assays, the necrotic rates of *Galleria mellonella* hemocytes at 24 h after treatment with the cultured filtrates of symbiotic bacteria were significantly different from those of the control, whereas the rates treated with *X. indica* lipopolysaccharide (LPS) were similar to those of the control. These results indicate that necrosis in *G. mellonella* hemocytes occurs 24 h after being treated with the filtrates. Hemolytic rates of rat and goat red blood cells (RBCs) as treated with cultured filtrates from both forms of *X. indica* were not significantly different from those of the control, showing that the cultured filtrates did not contain hemolytic substances. Inactivated bacterial cells (primary form) caused serious paralysis in *G. mellonella* larvae and eventually killed the insects. This symptom was found to be similar to that of being injected with LPS extracted from the primary form. However, these inactivated bacterial cells were not effective against *Spodoptera litura* larvae. Therefore, it is suggested that LPS is neurotoxic to *G. mellonella* larvae. Hemolytic rates of rat and goat RBCs treated with inactivated bacteria (primary form) were significantly different from those of the control. In vivo assays, the inactivated bacterial cells were capable of causing necrosis and subsequently killing the hemocytes of both the *G. mellonella* and *S. litura* larvae. They were, however, comparatively less destructive to *S. litura* hemocytes. In vitro assays, LPS from *X. indica* (primary form) was not markedly detrimental to *G. mellonella* hemocytes compared with the control group, suggesting that LPS is not a major factor affecting the insect immune system. Therefore, it is speculated that LPS and certain substances when released into the insect hemocoel from symbiotic bacteria could hamper the insect's immune system, resulting in the proliferation of symbiotic bacteria and nematodes, and subsequently cause septicemia to rapidly kill the insect hosts.

摘要

台灣產蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) 之共生菌為 *Xenorhabdus indica*。其在體外培養下僅原生型菌 (primary form) 可分泌具有殺蟲活性之代謝物，對昆蟲細胞株 SF21 及 S2 會造成細胞壞死 (necrosis)，但對仔倉鼠腎細胞株 BHK-21 則無活性。共生菌濾液在體外處理大蠟蛾 (*Galleria mellonella*) 血球，於 24 h 後之壞死率與對照組具有顯著性差異，但以 *X. indica* 之脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS) 處理之大蠟蛾血球壞死率與對照組並無顯著差異，顯示此濾液對大蠟蛾血球具破壞性。以原生型及次生型 (secondary form) 濾液處理大鼠及山羊血球之試驗結果，其溶血率皆與對照組無顯著差異，顯示濾液中並無溶血性物質。去活性之原生型共生菌體對大蠟蛾幼蟲會造成嚴重麻痺進而死亡，此病徵與萃取原生型菌之 LPS 注入大蠟蛾幼蟲所產生的症狀相似，但對斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 幼蟲則無影響，顯示 *X. indica* 之 LPS 對大蠟蛾具神經毒。去活性之共生菌體對大鼠及山羊之溶血率均與對照組具顯著差異。在體內下，去活性之共生菌體對大蠟蛾及斜紋夜蛾幼蟲之血球均會引起壞死現象，惟對斜紋夜蛾較不明顯。原生型共生菌 (*X. indica*) 之 LPS 在 in vitro 下，對大蠟蛾血球之作用與對照組無顯著差異，顯示其 LPS 並非以破壞血球之免疫系統為主要因素。由以上結果推論，共生菌釋放到昆蟲血體腔中所分泌之 LPS 及某些代謝物，會抑制昆蟲免疫系統無法啟動，以致共生菌及線蟲能順利增殖，並引起敗血症，在短時間內殺死昆蟲。

Key words: *Steinernema abbasi*, *Xenorhabdus indica*, hemocyte, cell line, lipopolysaccharide

關鍵詞: 蟲生線蟲、共生菌、脂多醣體、血球、細胞株。

Full Text: [PDF \(5.44 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

台灣產蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) 之共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 及其代謝物對昆蟲血球及細胞株之影響

蔡米皓、唐立正*、侯豐男*

國立中興大學昆蟲學系 40227 台中市國光路 250 號

摘 要

台灣產蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) 之共生菌為 *Xenorhabdus indica*，其在體外培養下僅原生型菌 (primary form) 可分泌具有殺蟲活性之代謝物，對昆蟲細胞株 SF21 及 S2 會造成細胞壞死 (necrosis)，但對仔倉鼠腎細胞株 BHK-21 則無活性。共生菌濾液在體外處理大蠟蛾 (*Galleria mellonella*) 血球，於 24 h 後之壞死率與對照組具有顯著性差異，但以 *X. indica* 之脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS) 處理之大蠟蛾血球壞死率與對照組並無顯著差異，顯示此濾液對大蠟蛾血球具破壞性。以原生型及次生型 (secondary form) 濾液處理大鼠及山羊血球之試驗結果，其溶血率皆與對照組無顯著差異，顯示濾液中並無溶血性物質。去活性之原生型共生菌體對大蠟蛾幼蟲會造成嚴重麻痺進而死亡，此病徵與萃取原生型菌之 LPS 注入大蠟蛾幼蟲所產生的症狀相似，但對斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 幼蟲則無影響，顯示 *X. indica* 之 LPS 對大蠟蛾具神經毒。去活性之共生菌體對大鼠及山羊之溶血率均與對照組具顯差異性。在體內下，去活性之共生菌體對大蠟蛾及斜紋夜蛾幼蟲之血球均會引起壞死現象，惟對斜紋夜蛾較不明顯。原生型共生菌 (*X. indica*) 之 LPS 在 *in vitro* 下，對大蠟蛾血球之作用與對照組無顯著差異，顯示其 LPS 並非以破壞血球之免疫系統為主要因素。由以上結果推論，共生菌釋放到昆蟲血體腔中所分泌之 LPS 及某些代謝物，會抑制昆蟲免疫系統無法啟動，以致共生菌及線蟲能順利增殖，並引起敗血症，在短時間內殺死昆蟲。

關鍵詞：蟲生線蟲、共生菌、脂多醣體、血球、細胞株。

*論文聯繫人

Corresponding email: rhou@nchu.edu.tw; lctang@nchu.edu.tw

前 言

台灣產之蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) (Nematoda: Steinernematidae) 繼 the Sultanate of Oman (Elawad *et al.*, 1997) 之後為第二個採集地，其共生菌經鑑定為 *Xenorhabdus indica*，屬於革蘭氏陰性腸內菌科 (Enterobacteriaceae) 細菌 (Tsai *et al.*, 2008)。共生菌存於其侵染性幼期 (infective juvenile, IJ) 腸道中，當 IJs 侵入寄主昆蟲體內後，會先蛻去二齡幼蟲之表皮，將共生菌大量釋出 (Dunphy and Thurston, 1990; Wang *et al.*, 1994)，在寄主體內增殖並分泌多種代謝物，如 indole derivatives、dithiopyrolones (xenorhabdins)、benzopyran-1-one derivatives (xenocoumacins) 等 (Li *et al.*, 1996)，使寄主昆蟲在 24~48 h 內因敗血症 (septicemia) 迅速死亡 (Poinar, 1990; Boemare, 2002)。共生菌也會產生一些組織分解酵素，如卵磷脂酶 (lecithinase)、脂酶 (lipase) 及蛋白酶 (proteinase) 等 (Forst and Clarke, 2002)。其作用係在分解昆蟲組織，以提供線蟲生長之營養來源，有助於線蟲在昆蟲體腔中的世代繁殖 (Han *et al.*, 1991)。因此，蟲生線蟲、共生菌和昆蟲間形成三者食性系統 (tri-trophic system)。此共生菌與線蟲間的共生關係與昆蟲致病上的轉換模式，頗值得深入研究，在未來生物製劑的發展上可望具有應用之潛力。

細胞死亡的形式可分成兩大類，一類為細胞凋亡 (apoptosis)，另一類為壞死 (necrosis)。壞死細胞型態改變主要由兩個病理過程所引起，即酶性消化與蛋白變化，造成細胞自溶性 (autolysis)，其參與過程的酶主要來自死亡細胞本身；另一為細胞異溶性 (heterolysis)，其參與過程的酶主要來自於浸

潤壞死組織內白色細胞溶酶體。初期會造成細胞質中粒線體與內質網之腫脹、崩解、結構脂的游離、空泡化、蛋白質顆粒增多、核發生萎縮或斷裂等病變。在含水量高的細胞，因細胞內水泡不斷增大，並發生溶解導致細胞結構完全消失，最後細胞膜與胞器破裂，DNA 降解，細胞內容物流出，引起組織的發炎反應 (inflammation) (Kerr *et al.*, 1972; Hirsch *et al.*, 1997)。

蟲生線蟲對昆蟲免疫的防禦機制可歸納為躲避、忍受及抑制三種方式 (Dowds and Peters, 2002)。昆蟲的免疫反應，如吞噬作用 (phagocytosis)、包囊 (encapsulation) 或瘤結反應 (nodulation) 等細胞性免疫 (cellular immunity)，可對抗外來物的侵染 (Poinar, 1979; Peters *et al.*, 1997)；亦可利用 cecropin 誘發或由 lysozyme 等抗菌物質進行體液性免疫 (humoral immunity)。蟲生線蟲之共生菌 (*Xenorhabdus spp.*) 能避開昆蟲免疫反應，展現病原性，其為線蟲殺死寄主之主要因素 (Brehelin *et al.*, 1990; Dunphy and Webster, 1991)。而共生菌躲避血球的附著，似乎與其細胞膜活性有關 (Dunphy and Webster, 1991)，其中脂多醣體 (lipopolysaccharides, LPS) 為革蘭氏陰性細菌外膜的主要成分 (Nikaido and Nakae, 1979)，當共生菌在昆蟲體液中無論是活的或死的菌體，其 LPS 都會被釋出；另外，細菌的外膜乃由脂蛋白、蛋白質、LPS 及磷脂所構成。LPS 本身具有抵抗吞噬作用及避免膽鹽、抗生素及有毒物質進入菌體之功能，使菌體免於受到危害。LPS 係由三部分所構成：1) o-specific side chain：由核心 (core) 向外延伸，不同細菌間 o-specific side chain 上的碳水化合物組成不同，故有不同的抗原性；2) Core polysaccharide：用以與 Lipid A 連結；3)

Lipid A：其作用係將 **LPS** 固定於外膜上，並具有穩定外膜的功能 (Raetz and Whitfield, 2002)。**Lipid A** 含有兩個 **glucosamide sugar** 衍生物，每個衍生物上接三個脂肪酸及磷酸或焦磷酸，有些細菌的 **Lipid A** 具有內毒素 (endotoxin) 功能，對動物具有毒性，如 *Xenorhabdus nematophila* 外膜上的 **Lipid A** 會抑制原酚氧化酶 (phenoloxidase) 之活化；過去的研究已發現共生菌會抑制昆蟲體內的 **eicosanoids** 及其衍生物的合成，以達抑制瘤結作用 (Hammond *et al.*, 1984; Dunphy and Webster, 1988, 1991; Dunphy and Halwani, 1997)。台灣產之蟲生線蟲 (*S. abbasi*) 屬於亞熱帶之寄生性線蟲，在生物防治上具有應用之潛力，其共生菌 (*X. indica*) 在殺蟲機制上，目前仍不清楚。本研究目的乃在於了解此蟲生線蟲共生菌抵抗寄主免疫反應及其代謝物對昆蟲血球及其他細胞之破壞，以致產生殺蟲效力。

材料與方法

一、供試昆蟲

由田間採集之斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 卵塊，以 1.5% 次氯酸鈉 (NaOCl) 進行消毒，再以無菌水漂洗三次，待幼蟲孵化後以半人工飼料 (Ou-Yang and Chu, 1988) 餵飼，並置於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 之定溫箱中 ($70 \pm 10\% \text{RH}$, 12L:12D) 進行累代飼育。挑出五齡初蛻幼蟲，以 30 孔飼育盤進行單隻飼養，以供作試驗之蟲體。

大蠟蛾 (*Galleria mellonella*) 係由彰化縣員林鎮之廢棄蜂箱中採集而得，於飼育箱 ($37 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\% \text{RH}$, 13L:11D) 中，以人工飼料 (麥粉 250 g、奶粉 100 g、甘油 150 g、蜂蜜 150 ml) 進行累代飼育，以備試

驗之用。

二、蟲生線蟲來源

台灣產之蟲生線蟲 (*S. abbasi*) 為本研究室於 1998 年在花蓮縣甘藷田土壤中採集並以斜紋夜蛾誘釣而得 (Liao *et al.*, 2001)。以斜紋夜蛾六齡幼蟲進行活體繼代培養。當蟲生線蟲 **IJs** 由感染致死的幼蟲體內遷出時，以 **White's trap** (White, 1927) 收集 **IJs** 後，以 0.1% formalin 進行體表消毒三次，再以無菌水漂洗三次，以海綿吸附保存於 20°C 全黑暗定溫箱 ($90 \pm 10\% \text{RH}$)。

三、共生菌分離及培養

蟲生線蟲 (*S. abbasi*) 以接觸感染斜紋夜蛾或大蠟蛾幼蟲，待 48 h 蟲體死亡後，以 70% ethanol 進行體表消毒 5 min，再以無菌水漂洗三次。用消毒過之剪刀剪破原足使體液流出，再用移殖環 (loop) 沾取體液劃線培養於 **NBTA** (每公升含 peptone 5.0 g、beef extract 3.0 g、agar 5.0 g、bromothymol blue 0.025 g 及 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 0.04 g) (Akhurst, 1980) 平板上，置於全黑暗生長箱 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) 中培養 2~3 天後，挑取藍綠色單一菌落 (single colony)，經反覆純化三次得到共生菌原生型菌株 (primary form)。將純化後之共生菌以 nutrient broth (NB; 每公升含 peptone 5.0 g、beef extract 3.0 g、agar 15 g; pH 7.0) 於全黑暗 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 生長箱中震盪培養 (150 rpm、48 h)，以供後續試驗之用。次生型菌落 (secondary form) 係在原生型菌培養的過程中所分離所得，其在 **NBTA** 培養基上，呈現紅色菌落，周圍有透明多醣體；培養方式仍依原生型菌培養方式，震盪培養 24 h。

四、細胞株之培養

將原有保存的 IPLB-SF-21 AE SF21 (*Spodoptera frugiperda* cell line, SF21)、*Drosophila* Schneider S2 及仔倉鼠腎細胞株 (BHK-21) 等，細胞株解凍後分別以 Grace's insect medium (Gibco BRL, NY, USA) 含 10% fetal bovine serum (Biological Industries, Israel)、Schneider's medium 及 MEM (minimal essential medium, Eagle's base) 等培養基進行培養。待細胞平貼於培養皿底部，並生長至形成單層 (monolayer) 細胞層，再個別以新鮮培養基沖洗，並將細胞懸浮液轉移至新的細胞培養皿中，加以繼代培養，供作後續試驗之用。

五、*In vitro* 大蠟蛾血球之製備

大蠟蛾血球之製備係先將大蠟蛾末齡幼蟲置於冰上 20 min，待靜止不動後，以 70% ethanol 進行體表消毒。以消毒過的剪刀剪去偽足末端，抽取體液加入 (1:5) sterile anticoagulant buffer (62 mM NaCl、100 mM glucose、10 mM EDTA、30 mM tri-sodium citrate 及 26 mM citric acid) 進行血球漂洗 (Mead *et al.*, 1986)。經離心 (800 x g, 15 sec) 2 次，去除上清液後，加入 PBS buffer 20 μ l 回溶，再移置細胞培養皿，加入 Grace's insect medium 靜置 30 min 後，血球貼於細胞培養皿內，完成供試之血球。

六、共生菌原生型及次生型菌培養濾液對 SF21 細胞株之影響

依共生菌 (*X. indica*) 培養方式，因生長速度不同，將原生型菌培養 72 h，次生型培養 48 h 後，進行離心 (6000 rpm, 20 min)，取上清液，再以 0.22 μ l Millipore 濾膜過濾成無菌之濾液；另將原生型菌濾液經高溫高壓

蒸氣滅菌 (121°C、1.1 bar、20 min)，再各別將不同處理之濾液以 10% 加入 SF21 細胞培養液 中，並以加入 10% NB medium 為對照組。將其置於 25 \pm 1°C 生長箱中培養，分別於 12 及 24 h 後以顯微鏡觀察並計算細胞壞死率。

七、SF21 細胞株經共生菌培養濾液處理後掃描式電子顯微鏡之觀察

依上述方式所培養的 *X. indica* 原生型、次生型菌液及 *Steinernema carpocapsae* (All strain) 之原生型 (*X. nematophila*) 菌之濾液，將已培養之共生菌培養液以 0.22 μ l Millipore 濾膜過濾，將濾液分別以 10% 加入 SF21 細胞培養皿中，以 NB medium 為對照組，12 h 取樣觀察並進行固定及脫水。經處理過後之 SF21 細胞株小心去除培養基後，以 4% formaldehyde，在 4°C 固定 30 min，以 PBS buffer 漂洗，待沉澱後去除上清液，加入 1% osmium acid，靜置 30~60 min 並在 4°C 下，以 PBS 漂洗，待沉澱後去除上清液，完成固定。接著分別以 50、70、80、90 及 95% ethanol 各進行 15 min 脫水 3 次，再用絕對酒精脫水 15 min，進行 3 次，最後將絕對酒精轉換成 100% acetone，以 100% acetone 處理 15 min 3 次之步驟，重複進行兩次。脫水後保存於 4°C 下，以便在電子顯微鏡觀察時，在液態氮覆蓋後保存液能完全揮發，再以 Field Emission Scanning Electron Microscope (JSM-6330F, JEOL, Tokyo, Japan) 進行觀察。

八、共生菌培養濾液對不同細胞株及大蠟蛾血球之影響

將原生型共生菌依上述方式震盪培養 72 h 後，進行離心 (6,000 rpm) 20 min，取上

清液，再以 0.22 μ l Millipore 濾膜過濾，做為細胞株測試之濾液。供試昆蟲細胞株有 SF21、S2 及仔倉鼠腎細胞株 (BHK-21) 及大蠟蛾血球，分別培養於細胞培養皿上待細胞平貼後加入 10% 濾液，以加入 10% NB medium 為對照，分別置於 25 及 37°C 培養箱中培養，於 3、6、12 及 24 h 各取樣，在倒立顯微鏡 (IMT-2, Olympus, Japan) 下觀察，並計算細胞壞死率。另外，大蠟蛾血球壞死率計算，先以 trypan blue 染色後，觀察並計算血球死亡率。

九、去活性共生菌體對大蠟蛾與斜紋夜蛾幼蟲血球及 SF21 細胞株之影響

將共生菌之原生及次生型菌株分別依上述方式震盪培養，因生長速度不同，原生型菌培養 48 h，次生型菌培養 24 h 後，進行離心 (6,000 rpm) 20 min，去除上清液，以 PBS 調整菌液濃度為 1×10^8 cfu/ml，進行高溫高壓滅菌 20 min。待冷卻後以微量注射器將滅菌過的菌液，由幼蟲腹部末端倒數第 2~3 節的節間膜注入幼蟲體內 (20 μ l/larva)，並以注入不含菌液之 NB medium 為對照。供試幼蟲為斜紋夜蛾六齡初期及大蠟蛾末齡幼蟲，48 h 後抽取體液於顯微鏡下觀察血球壞死情形。另將無活性原生及次生型菌液加入 1% 於供試驗 SF21 培養液中，24 h 後於顯微鏡下觀察血球及細胞是否有壞死情形。

十、共生菌之 LPS 對 SF21 細胞株、大蠟蛾血球及蟲體之影響

根據 Yi and Hackett (2000) 方法加以修改，以快速少量萃取 LPS。依上述共生菌的培養方式，先將菌體培養於 NB 培養基中進行震盪 (150 rpm, 25°C) 培養 48 h 後，離心 (6,000 rpm) 20 min，去除上清液，再以無菌

水漂洗一次。離心後的沈澱物 (pellet) (由 10 ml 菌液所得) 加入 1.0 ml Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) 再懸浮，置於室溫下 15 min，加入 200 μ l chloroform，經震盪後並置於室溫下 15 min，離心 (12,000 rpm) 10 min，取上清液，再加入無菌水回溶剩餘的脂多醣體，震盪後靜置 15~30 min，再離心，此步驟重複 2~3 次，將萃取所得的脂多醣體上清液混合後，以 3 種不同 MW 孔徑的分子篩 (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 U.S.A.) 篩過後，加無菌水離心去鹽，再進行冷凍乾燥，加入 200 μ l ddH₂O 進行回溶。由於在 LPS 純化過程中容易受核酸及蛋白質的污染，故以 RNase (8 mg/ml) 及 DNase (10 mg/ml) 作用 1 h，去除核酸，再以 Proteinase K (20 μ g/ml) 37°C 作用 1 h 去除 RNase、DNase 及菌體的蛋白質。在 65°C、作用 20 min 去除 Proteinase K 活性，再以離心濃縮管 Centriplus YM-3 (Centrifugal Filter Unit, 3000 MWCO) 加入 ddH₂O 漂洗濃縮去除雜質及核酸及蛋白質分解酶，並以 10% SDS-PAGE 進行電泳分析。依 Perdom and Montero (2006) 之方法，以分光光譜儀 (U-2800, Hitachi, Japan) 用 190~600 nm 波長測定 LPS 純度。

所分離之 LPS 進行 SF21 細胞株測定，乃將培養的 SF21 細胞株加入 10% LPS，置於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 全黑暗生長箱中培養，以加入 10% NB medium、PBS buffer 加 Proteinase K，37°C 作用 1 h 後再去除活性及依上述方式純化 *Escherichia coli* 之 LPS 等做為對照。另將製備完成之大蠟蛾血球在 *in vitro* 條件下加入 10% *X. indica* 原生型之 LPS，於顯微鏡下觀察，以加入 10% PBS buffer 作對照。LPS 對大蠟蛾幼蟲影響試驗，以注入法將萃取

所得之 LPS 以 20 μ l/larva，於幼蟲腹部節間膜注入幼蟲體腔中，另以注入不含 LPS 之 NB medium 為對照組。

十一、紅血球 (red blood cell, RBC) 溶血活性試驗

溶血活性的測試方式以血液瓊脂平板 (blood agar plates, Creative Microbiological, Taiwan) 與液態溶血兩種方式進行分析 (Raw and Welch, 1994)。血液瓊脂平板係用來區分溶血性及非溶血性細菌，以移植環沾取原生型及次生型共生菌進行劃線培養，分別置於 25 及 37°C 生長箱中，48 h 後觀察是否有溶血環 (clearing surrounding) 出現；另外，以原生型及次生型共生菌之 LPS 進行溶血性試驗，取 20 μ l/disc 置於 37°C 生長箱中，觀察是否有溶血環出現。

進行液態溶血分析及紅血球之製備，乃將山羊及大鼠血液以 1:10 之 PBS buffer 混合後離心 (180 x g) 5 min，漂洗三次後，再以 PBS buffer 調整濃度為 2%。依上述共生菌液體培養方式將濾液以 0.22 μ l Millipore 濾膜過濾，進行冷凍乾燥再以 PBS buffer 回溶至原容積作為供試濾液，並加入 10% 原生型及次生型共生菌之 LPS 及 10% 去活性原生型菌體 (1×10^8 cfu/ml)，對紅血球進行溶血性測試。取測試濾液 500 μ l 及 2% 紅血球溶液 250 μ l 混合後置於 37°C，分別於 1 及 2 h 離心，將完整的紅血球離下，以 PBS buffer 作為對照。取上清液測定其在 540 nm 下的吸光值 (OD₅₄₀) 供計算溶血率。依據 Brillard *et al.* (2001) 溶血百分比之計算公式：【(A₅₄₀ 測試濾液之紅血球吸光值 - 對照組 A₅₄₀ 紅血球吸光值) / 純水使紅血球完全溶解之 A₅₄₀ 吸光值】 $\times 100$ ，計算之。

十二、資料統計分析

利用 SPSS (Statistical Products and Services Solutions) 統計軟體計算其平均值及標準差，再利用二因子變異數分析 (ANOVA)，採 $p < 0.05$ 顯著水準比較各處理組差異之顯著性，再進行 Tukey's studentized range test (HSD) 比較處理間之差異。

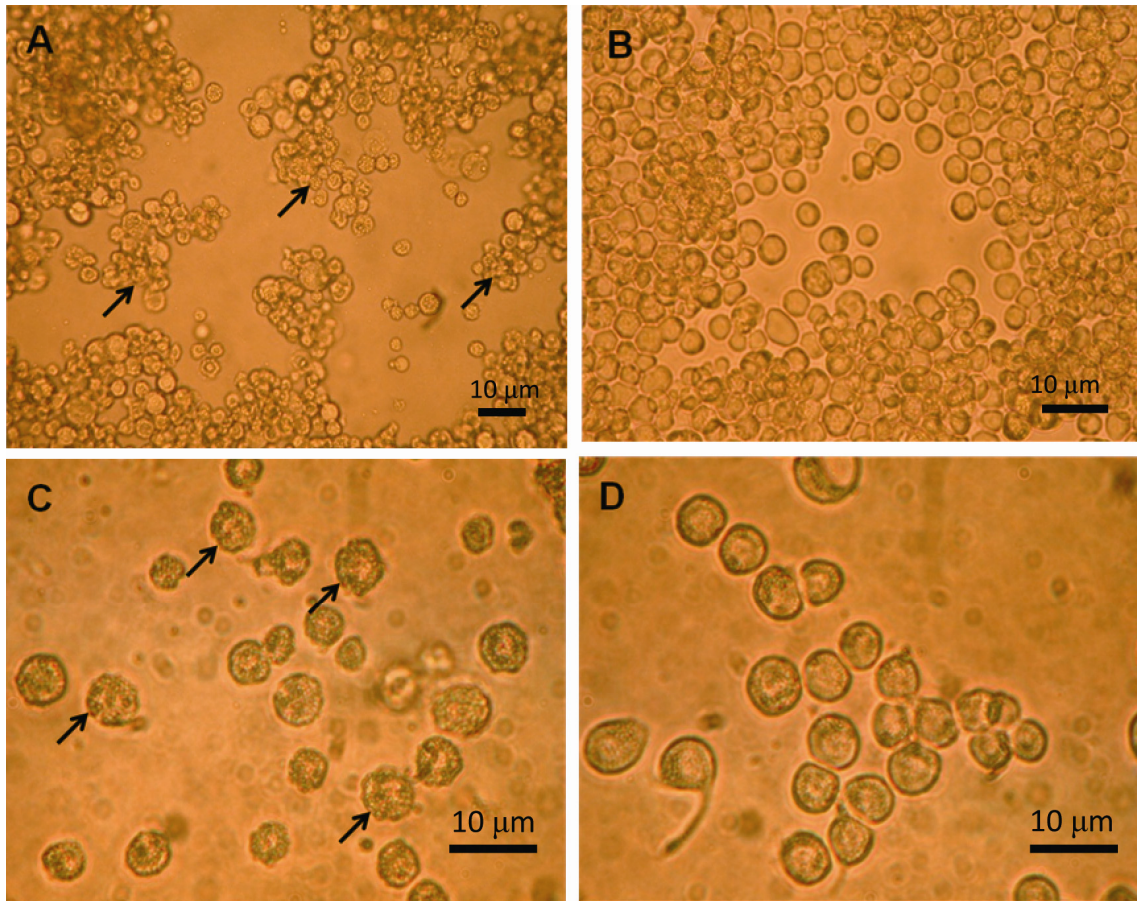
結 果

一、共生菌原生及次生型菌培養液對 SF21 細胞株之影響

共生菌 (*X. indica*) 原生型菌培養濾液處理 SF21 細胞株，經 12 及 24 h 後，分別造成 82.77 ± 9.15 與 $97.47 \pm 2.45\%$ 細胞壞死率；其濾液經高溫處理後仍可造成 80.23 ± 1.10 與 $95.60 \pm 2.5\%$ 的 SF21 細胞壞死率，而對照組 NB medium 及次生型菌株之培養濾液，則不造成 SF21 細胞之死亡 (圖一、表一)。原生型菌濾液與經高溫處理之濾液對 SF21 細胞株之細胞壞死率，經統計分析無顯著差異，顯示共生菌培養濾液中含有造成細胞壞死且具熱穩定性之物質，導致 SF21 細胞株產生病變死亡。於顯微鏡下觀察，最初細胞會腫脹，細胞膜完整性被破壞，最後引起細胞內物質的崩解，細胞質流出，而造成細胞壞死最大特徵為破壞成群的細胞，細胞結構全面溶解 (圖一)。

二、SF21 細胞株經共生菌培養之濾液處理後掃描式電子顯微鏡之觀察

以共生菌培養濾液處理 SF21 細胞株，以掃描式電子顯微觀察不 NB medium 的對照組、*X. nematophila* 原生型濾液或 *X. indica* 次生型濾液，細胞仍維持完整，細胞膜並未受到破壞，顯示 *X. nematophila* 原生型與 *X.*



圖一 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 培養濾液對 SF21 細胞株之影響。(A) 經 10% 原生型培養濾液處理之 SF21，造成細胞膜的病變，產生細胞壞死現象。(B) 經 10% 次生型培養濾液處理之 SF21，對細胞並無影響。(C) SF21 加入 10% 經高溫高壓處理之原生型培養濾液，仍會造成細胞壞死。(D) 對照組，經 10% NB medium 處理之 SF21。箭頭表示 SF21 細胞株產生壞死、皺縮及漂浮。

Fig. 1. Effect of *Xenorhabdus indica* on SF21 cell line after being treated with cultured filtrates. (A) SF21 treated with 10% cultured filtrate of primary form. (B) SF21 treated with 10% cultured filtrate of secondary form. (C) The cultured filtrate of primary form was toxic to SF21 after being autoclaved for 20 min. (D) Control, treated with 10% NB medium. Arrows indicate necrosis, shriveling, or floating of the SF21. Bar = 10 μ m.

indica 次生型菌在體外培養液中不分泌造成細胞壞死之有毒物質 (圖二 A、B、E)。而 *X. indica* 原生型濾液處理之 SF21 細胞膜表面受破壞，並開始有孔洞產生，細胞結構不完整，漂浮於細胞培養液中的細胞死亡，細胞質流出整個細胞瓦解 (圖二 C、D)。

三、共生菌培養液對不同細胞株及大蠟蛾血球之影響

原生型共生菌濾液對昆蟲細胞株 SF21 及 S2 可造成細胞壞死 (圖三、四)，在處理 3 h 已造成 35% 的 SF21 細胞壞死，但 S2 尚無細胞壞死；6 h 後 SF21 及 S2 細胞壞死率分別為 50 與 15%；12 h 後其細胞壞死率分別

表一 共生菌 *Xenorhabdus indica* 培養濾液對 SF21 細胞株造成之細胞壞死率

Table 1. The necrotic rate of the SF21 cell line treated with *Xenorhabdus indica* cultured filtrates

Treatments	Necrotic rate (%) (Means \pm SD)*	
	12 h	24 h
Filtrates of primary form	82.77 \pm 9.15 a	97.47 \pm 2.45 a
Filtrates of secondary form	0.00 b	0.00 b
Filtrates of primary form autoclaved	80.23 \pm 1.10 a	95.60 \pm 2.50 a
Control (NB medium)	0.00 b	0.00 b

* Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.

達到 93 與 45%；24 h 後其細胞壞死率分別高達 100 與 98% (圖三)。細胞受破壞初期，細胞會腫脹，細胞膜結構逐漸受破壞，最後導致細胞溶解 (圖四 A~D)。而對照組 C 與哺乳動物仔倉鼠腎細胞株 (BHK-21) 並無細胞壞死現象 (圖四 E、F)，顯示原生型共生菌培養之濾液只對昆蟲細胞 SF21 及 S2 細胞株具有破壞性，對哺乳動物細胞則無影響。在 *in vitro* 試驗，原生型菌於 25°C 下培養其濾液對大蠟蛾血球試驗經統計分析結果，處理時間越久其破壞性越顯著 ($df = 6$, $F = 2.789$, $p < 0.05$)，以 HSD test 分析結果，原生型濾液之處理與對照組 24 h 時具有顯著性差異 (表二)。由此可知在 25°C 培養下，原生型菌可產生對大蠟蛾血球具破壞性之物質。

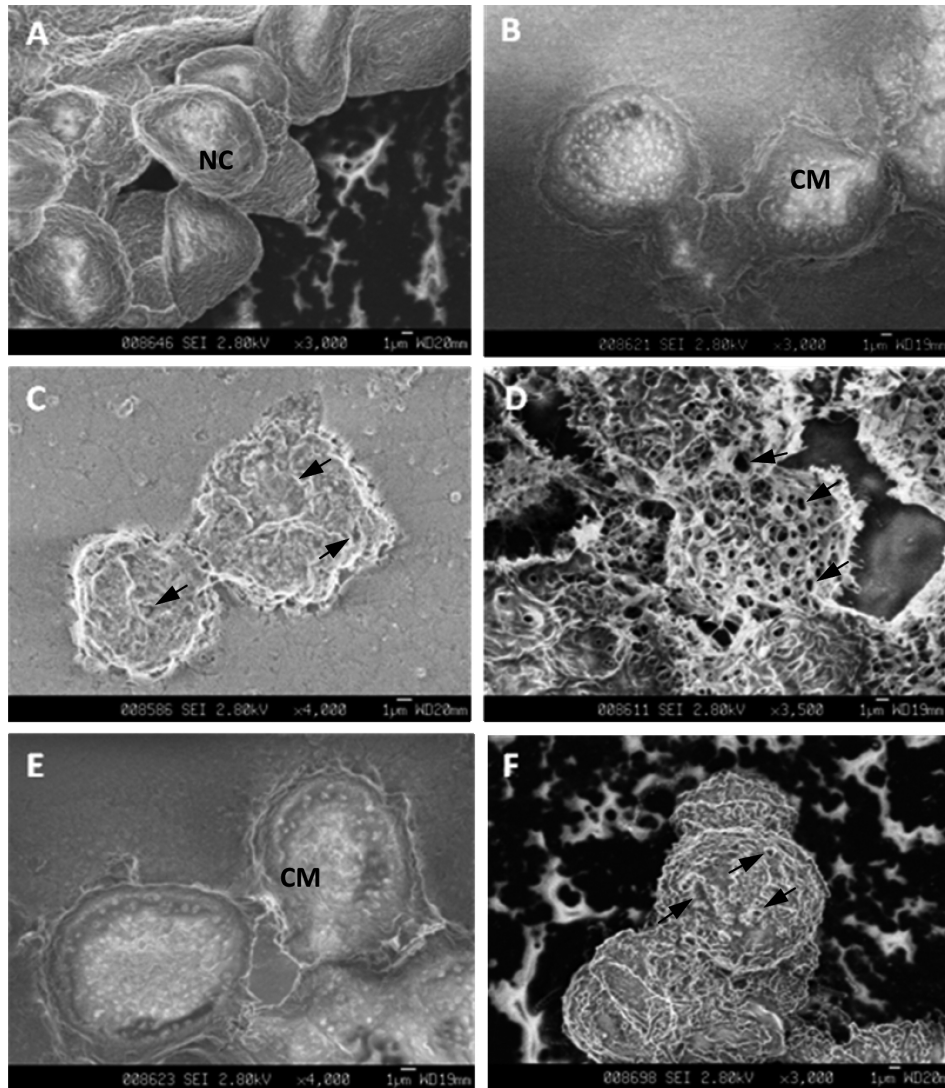
四、去活性共生菌菌體對大蠟蛾與斜紋夜蛾幼蟲血球及 SF21 細胞株之影響

去活性之原生型菌體以注射方式注入幼蟲體內 48 h 後，大蠟蛾幼蟲由大動脈 (aorta) 逐漸變黑，擴展至全身，使幼蟲活動力明顯降低，並產生嚴重的麻痺現象，進而造成幼蟲死亡。而去活性之次生型菌對大蠟蛾幼蟲不會引起麻痺及死亡現象；去活性之原生及次生型菌體對斜紋夜蛾幼蟲亦不會引起麻痺及死亡。去活性原生及次生型共生菌體處理大蠟蛾及斜

紋夜蛾幼蟲之血球 48 h 後，抽取其體液在顯微鏡下發現原生型及次生型共生菌體，對大蠟蛾血球均會造成血球萎縮及細胞膜的結構破壞，整個血球瓦解 (圖五 B、C)。但對斜紋夜蛾幼蟲，僅觀察到原生型菌對幼蟲少數血球具有壞死現象，而次生型菌對其幼蟲血球則無影響 (圖五 E、F)。去活性共生菌對 SF21 細胞之試驗結果顯示，只有原生型菌體對 SF21 細胞會產生細胞壞死 (圖五 H、F)，而次生型菌對 SF21 則無影響 (圖五 I)。由以上結果可知，去活性之原生型菌體會引起大蠟蛾幼蟲麻痺，並對大蠟蛾及斜紋夜蛾幼蟲血球及 SF21 細胞具有毒性，且原生型菌株的毒性較次生型菌強，斜紋夜蛾幼蟲較大蠟蛾幼蟲對兩型共生菌更具忍受性。

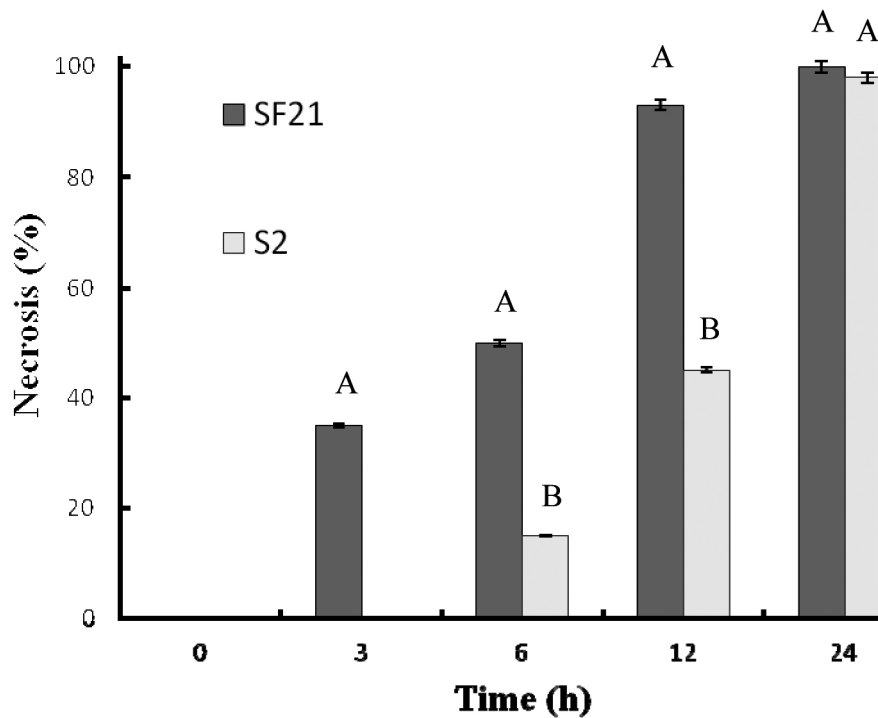
五、共生菌之 LPS 對 SF21 細胞株、大蠟蛾血球及蟲體之影響

由共生菌純化所得之 LPS 經電泳分析呈現階梯狀 (ladder-like) 圖譜 (圖六)，顯示 *X. indica* 所含的 LPS 屬於平滑性質 (smooth nature)，與革蘭氏陰性腸內菌科細菌特性相同。純化之 LPS 在 190~600 nm 範圍測定純度，得到兩個吸光高峰，其波長分別為 204 及 260 nm (圖七)。依據 Perdom and Montero (2006) 報告：204 nm 者為 LPS



圖二 掃描式電子顯微鏡觀察 SF21 細胞株處理共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 濾液 12 h 後之細胞膜受破壞情形。(A) 對照組，經 10% NB medium 處理之 SF21。(B) 經 10% *X. nematophila* (primary form) 濾液處理之 SF21。(C) 經 10% *X. indica* (primary form) 濾液處理之 SF21，12 h 後仍貼附在蓋波片上，其細胞膜已有孔洞產生，其結構已受破壞。(D) 經 10% *X. indica* (primary form) 濾液處理之 SF21，24 h 後懸浮在培養基中之細胞，其細胞膜已嚴重病變，細胞內物質流失進而造成細胞壞死。(E) 經 10% *X. indica* (secondary form) 濾液處理之 SF21，細胞膜未受到破壞。(F) 經去活性共生菌 *X. indica* (primary form) 菌體處理之 SF21，其細胞膜亦會有孔洞之病變產生。箭頭表示細胞膜病變後產生之孔洞。NC 表示正常細胞。CM 表示細胞膜。

Fig. 2. Scanning electron micrographs of the SF21 cell surface 12 h after being treated with cultured filtrates of *Xenorhabdus indica*. (A) Control, SF21 treated with 10% NB (nutrient broth) medium. (B) SF21 treated with 10% filtrates of *X. nematophila* (primary form). (C) SF21 treated with 10% filtrates of *X. indica* (primary form), and cells attached to the cover glass. (D) SF21 treated with the 10% filtrate of *X. indica* (primary form), and cells floating in the culture medium. (E) SF21 treated with 10% filtrates of *X. indica* (secondary form). (F) SF21 treated with bacterial cells of *X. indica*. Arrows indicate necrosis, shriveling, or floating of the SF21 cells. Bar = 1 µm. NC: normal cell. CM: cell membrane.



圖三 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 濾液對不同細胞株之細胞壞死率。

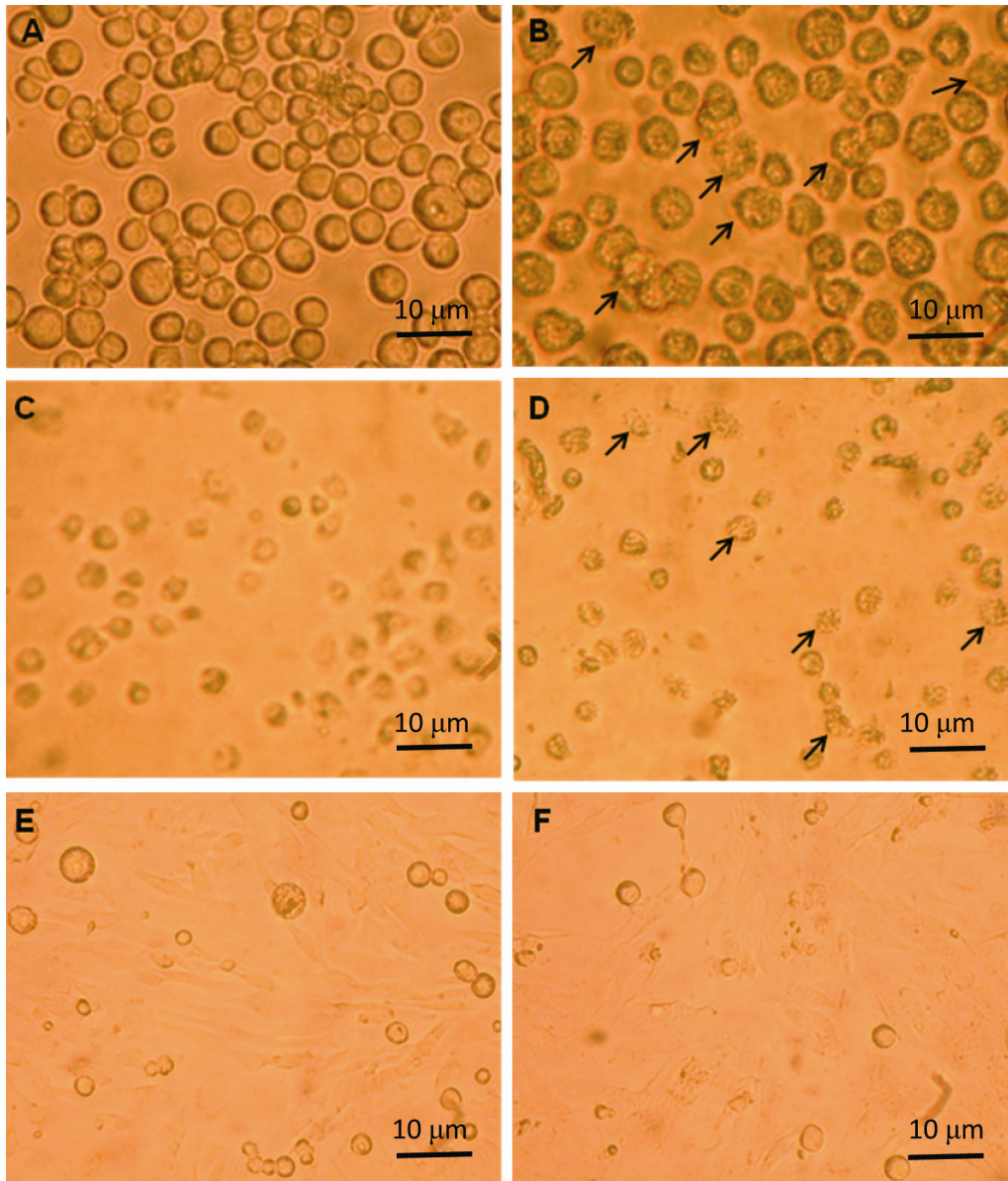
Fig. 3. Necrotic rates of SF21 and S2 cell lines after being treated with cultured filtrates of symbiotic bacterium, *Xenorhabdus indica*. Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.

部分，而 260 nm 為核酸部分。粗萃取之 LPS 仍含有少部分的核酸，但並無其他蛋白質的污染。所萃取之 LPS 對 SF21 細胞株的試驗，顯示 NB medium、PBS buffer 加上 Proteinase K 處理後，再以 65°C 去除其活性者及 *E. coli* 之 LPS 等各组對 SF21 均無影響，但共生菌所純化的 LPS 處理者，在 12 及 24 h 後所造成的壞死率分別可達 55.50 ± 3.06 及 $92.03 \pm 2.91\%$ (表二)，細胞亦呈現壞死現象。在 *in vitro* 條件下，原生型菌之 LPS 對大蠟蛾血球試驗結果，經統計分析與對照組並無顯著性差異 (表三)，故共生菌之 LPS 對大蠟蛾血球不會造成血球壞死。本研究將 LPS

注入大蠟蛾末齡幼蟲後，結果觀察到會造成幼蟲活動力降低，並產生嚴重麻痺現象，以致無法取食進而逐漸死亡之狀況。

六、共生菌濾液對紅血球之溶血活性測試

血液凝膠瓊脂溶血性試驗顯示，在 37°C 作用 48 h，*X. indica* 原生型及次生型共生菌均可產生溶血環，但在 25°C 培養至 72 h 原生型菌才有溶血環出現，而次生型菌則無 (圖八)。在液態溶血試驗結果，37°C 下作用時間越長溶血率越高 (大鼠： $df = 6, F = 67.99, p < 0.05$ ；山羊： $df = 6, F = 3.307, p < 0.05$)，但兩型菌濾液及 LPS 對大鼠及山羊紅血球之



圖四 SF21、S2 及 BHK21 細胞株處理共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 濾液後對細胞之影響。(A) 對照組 A，經 10% 之 NB medium 處理之 SF21。(B) 經 10% 共生菌 (原生型) 濾液處理之 SF21，細胞產生腫脹，細胞膜結構受破壞，最後產生細胞內物質崩解，造成細胞壞死。(C) 對照組 B，經 10% NB medium 處理之 S2。(D) 經 10% 共生菌 (原生型) 濾液處理之 S2，細胞膜亦受破壞，造成細胞壞死。(E) 對照組 C，經 10% NB medium 處理之 BHK21。(F) 經 10% 共生菌 (原生型) 濾液處理之 BHK21，其細胞不受影響。箭頭表示細胞產生壞死、皺縮及漂浮。

Fig. 4. Effects of *Xenorhabdus indica* on SF21, S2 and BHK21 cell lines after being treated with cultured filtrates. (A) Control A, SF21 treated with 10% NB medium. (B) SF21 cells treated with 10% cultured filtrates of primary form have produced cell necrosis, and their membrane structure is damaged. (C) Control B, S2 treated with 10% NB medium. (D) S2 treated with 10% cultured filtrates of primary form. The cells have produced necrosis. (E) Control C, BHK21 treated with 10% NB medium. (F) BHK21 treated with 10% cultured filtrates of primary form. Arrows indicate necrosis, shriveling, or floating of the cells. Bar = 10 μ m.

表二 共生菌 *Xenorhabdus indica* 脂多醣體 (LPS) 對 SF21 細胞株之壞死率

Table 2. Necrotic rate of the SF21 cell line treated with lipopolysaccharide (LPS) of *Xenorhabdus indica*

Treatments	Necrotic rate (%) (Means \pm SD)*	
	12 h	24 h
LPS of primary form	55.50 \pm 3.06 a	92.03 \pm 2.91 a
LPS of <i>E. coli</i>	0.00 b	0.00 b
NB medium	0.00 b	0.00 b
PBS buffer plus proteinase K	0.00 b	0.00 b

* Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.

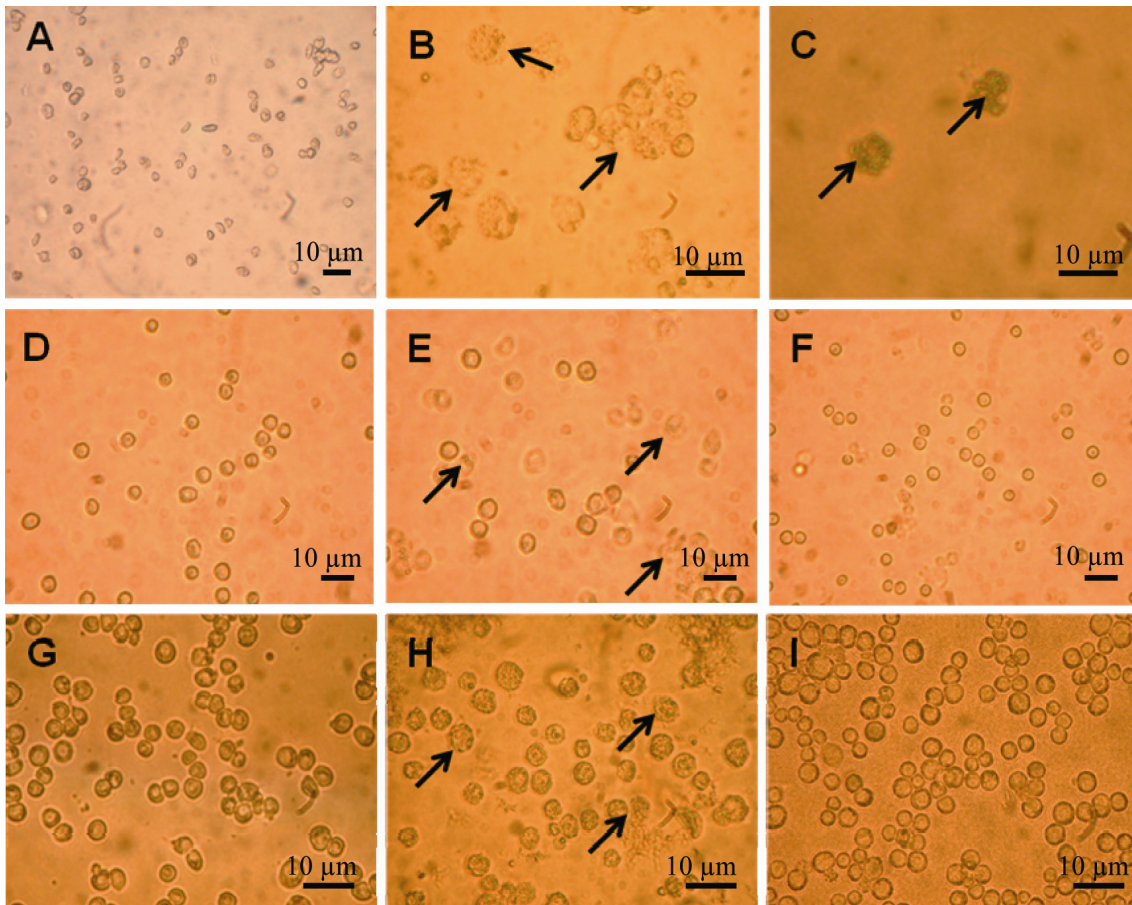
溶血率與對照組無顯著差異，而去活性之原生菌體對大鼠及山羊之溶血率與對照組則有顯著差異 (表四)。由以上結果可知，溫度會影響共生菌溶血性物質的產生；兩型菌在 25°C 下，由 *in vitro* 培養濾液中所分泌溶血性物質對山羊及大鼠紅血球之溶血現象並不高，但去活性原生菌體與紅血球接觸則有明顯溶血性。

討 論

蟲生線蟲共生菌在體外培養會有兩種菌落型態分別為原生型及次生型，在過去的研究中，與蟲生線蟲共生者以原生菌為主，而次生菌則多在體外培養後所產生的菌落型態，且無法提供線蟲生長所需的營養，兩型菌體之基因組相似，但表現的特性上卻不盡相同 (Forst and Clarke, 2002)，如共生菌 (*Xenorhabdus bovienii*) 只有原生型菌具有致病力，次生型菌則無 (Owuama, 2003)；但有些菌株，如 *P. asymbiotica* 之原生型及次生型菌株對昆蟲均具致病力 (Akhurst, 1980; Forst *et al.*, 1997)。某些種類共生菌經體外培養時會分泌具殺蟲活性之物質，有助於殺死寄主，但多數屬於非蛋白類之二次代謝產物，如 xenorhabdin II (Webster *et al.*, 2002)。在本研究中，*S. abbasi* 之共生菌 (*X. indica*) 原生型菌添加於蟲生線蟲人工培養基中，其 IJs 數

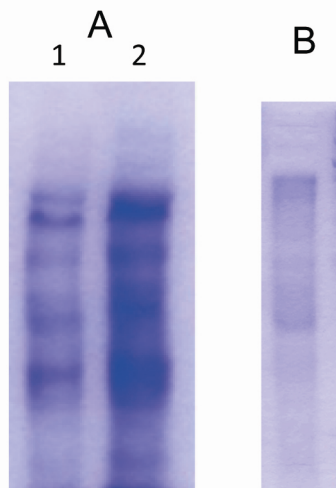
量可增加 50 倍，而次生型菌則無助於蟲生線蟲在人工培養基上生長 (data not shown)。其培養之濾液對 SF21 細胞株能在短時間內造成細胞壞死，所分泌之有毒物質主要由原生型菌產生，且具熱穩定性。共生菌研究上也發現類似的特性，如 *X. nematophila* HB310 及 *Xenorhabdus budapestensis*，在體外培養時於靜止期的後期，也會產生對熱具抗性之有毒物質，在殺蟲及抗菌上仍具有活性 (Wang *et al.*, 2005; Fodor *et al.*, 2010)。而次生型菌在培養之濾液中並無分泌有毒物質。由此可知 *X. indica* 原生型菌為 *S. abbasi* 之主要共生菌型態，而 *X. indica* 原生型菌在體外培養之濾液中所分泌者對昆蟲細胞具有毒性之物質，會造成細胞非自發性的壞死現象。本文在光學顯微鏡及掃描式電子顯微鏡下觀察，發現處理 6 h 的細胞呈現膨脹後開始萎縮，細胞膜結構受破壞，產生孔洞，之後細胞漂浮瓦解，此物質是否屬於蛋白類，仍需進一步研究。

目前發現 *Xenorhabdus* spp. 能造成昆蟲死亡之有毒物質繁多，研究最多者為 Tc toxin，其最初係在 *Photorhabdus luminescens* strain W14 上發現，此蛋白大小含蓋範圍廣泛，約 30~200 kDa，無論取食或注射對昆蟲均具毒性 (Bowen *et al.*, 1998; Bowen and Ensign, 1998; Guo *et al.*, 1999)。此外，Recombinant Txp40 toxin 對 SF9、SF21 及



圖五 去活性之共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 菌體對大蠟蛾 (*Galleria mellonella*) (A~C) 與斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) (D~F) 幼蟲血球及 SF21 細胞 (G~I) 處理 48 h 後之觀察。(A) 對照組 A, 大蠟蛾幼蟲注入 NB medium 處理之血球。(B) 大蠟蛾幼蟲注入去活性原生型共生菌體後, 造成血球之溶血現象。(C) 大蠟蛾幼蟲注入去活性次生型共生菌體後血球之溶血現象。(D) 對照組 B, 斜紋夜蛾幼蟲注入 NB medium 處理之血球。(E) 斜紋夜蛾幼蟲注入去活性原生型共生菌體後, 只有少部分血球產生溶血。(F) 去活性次生型共生菌體注入斜紋夜蛾幼蟲後其血球並無溶血產生。(G) 對照組 C, SF21 加入 10% 之 NB medium 處理。(H) SF21 加入 10% 去活性原生型共生菌體後, 細胞膜結構受破壞, 進而造成細胞壞死。(I) SF21 細胞株加入 10% 去活性次生型共生菌體後之細胞株並無受破壞。箭頭表示血球產生溶血及 SF21 細胞株產生細胞壞死、皺縮及漂浮。

Fig. 5. Effects of inactivated *Xenorhabdus indica* on hemocytes of *Galleria mellonella* (A-C), *Spodoptera litura* (D-F), and SF21 cell line (G-I) at 48 h after treatment. (A) Control A, *G. mellonella* larvae injected with NB medium. (B) *G. mellonella* larvae injected with the dead bacteria *X. indica* (primary form) causing hemolysis. (C) *G. mellonella* larvae injected with the dead bacteria *X. indica* (secondary form) causing hemolysis. (D) Control B, *S. litura* larvae injected with NB medium; (E) *S. litura* larvae injected with the primary form causing some hemolysis. (F) *S. litura* larvae injected with the secondary form. The blood was not affected. (G) Control C, SF21 treated with NB medium. (H) SF21 cells treated with the primary form bacterial cells causing necrosis. (I) SF21 cells treated with secondary form. The cells were not affected. Arrows indicate the necrosis, shriveling, or floating of hemocytes. Bar = 10 μ m.



圖六 共生菌 (*Xenorhabdus indica*) 脂多醣體 (LPS) 之電泳分析。(A) 在 7.5% SDS-PAGE 上粗萃取之 LPS, Lane 1: 5µl/well, Lane 2: 10µl/well。(B) 粗萃取之 LPS 經 DNase、RNase 及 Proteinase K 處理後以 12% SDS-PAGE 分析。

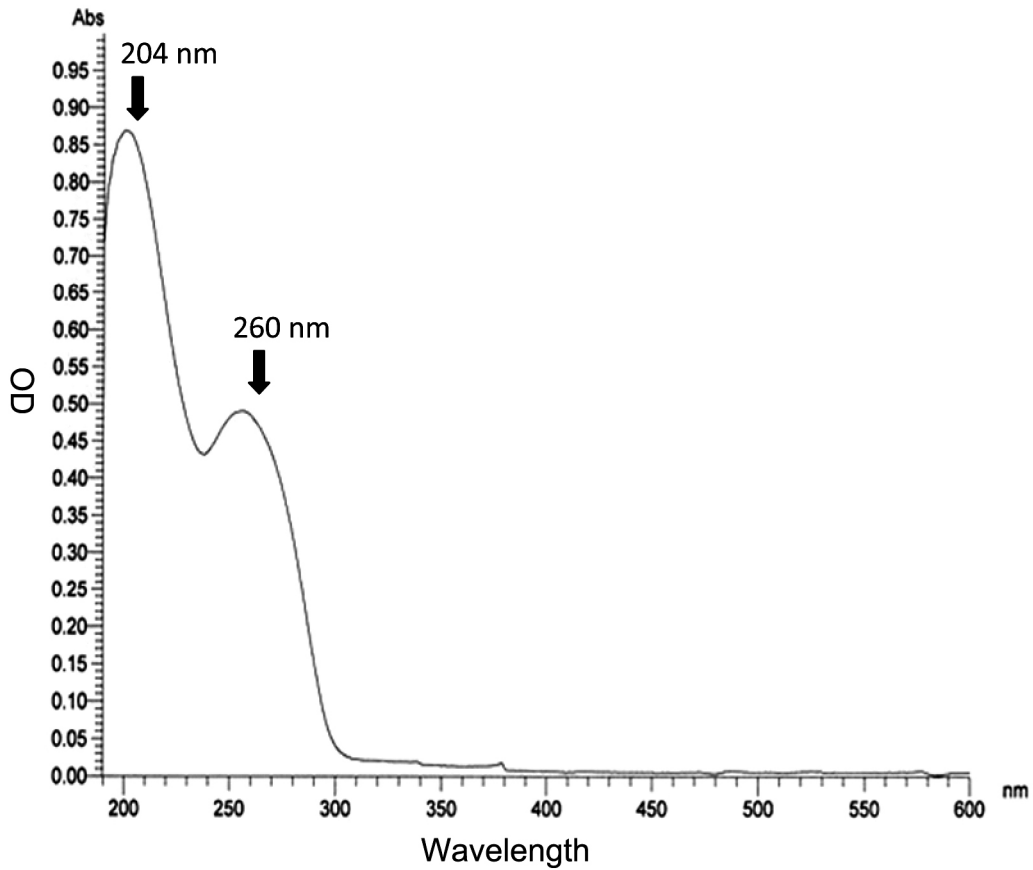
Fig. 6. Electrophoretic profiles of lipopolysaccharide purified from *Xenorhabdus indica*. (A) SDS-PAGE in 7.5% polyacrylamide gel, Lane 1: 5µl/well; Lane 2: 10µl/well. (B) SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel after DNase, RNase and Proteinase K treatment.

S2 具廣泛的殺蟲活性 (Laumond *et al.*, 1979)。本文發現 *X. indica* 之濾液對 SF21 及 S2 細胞株都具有毒性，但對哺乳動物的 BHK-21 細胞株不具毒性。雖然 Brown *et al.* (2006) 亦發現在 59 個菌株中均具一種毒素基因，即 *txp40*，且對雙翅目及鱗翅目昆蟲毒力表現較佳，但對哺乳動物細胞亦無影響。顯然其毒素的共同作用標的皆為昆蟲，亦即對昆蟲專一性高，故在生物製劑的開發上頗具潛力，而本地產的 *X. indica* 是否也具有 *txp40* 基因？值得進一步研究。在原生菌濾液對大蠟蛾血球的試驗中，發現 *X. indica* 所產生的二次代謝產物對血球，需在 24 h 後才會開始產生影響，且昆蟲細胞對共生菌濾液較血球敏

感；而共生菌所釋放之毒質能殺死寄主似非主要的殺蟲機制，造成敗血症可能才是主因。

本文發現去活性的菌體對大蠟蛾及斜紋夜蛾幼蟲血球均具破壞的現象，但不同種類的昆蟲對有毒物質的劑量容忍度亦有差異及菌體本身所含之有毒物質強弱也會影響，如 *X. nematophila* 所產生 LPS 及細胞性毒蛋白 (cytotoxic protein) 對大蠟蛾血球不具活性 (Ribeiro *et al.*, 1999)。此亦可能在去活性的過程中，高溫處理破壞菌體表面某些具毒性之胞內構造，如 *X. nematophila* 細胞外膜小囊 (outer membrane vesicle) 對 SF21 細胞株也有毒性 (Khandelwal and Banerjee-Bhatnagar, 2003)。本研究結果菌體對斜紋夜蛾血球的毒力降低，亦可能因類似此高溫破壞所致。共生菌如 *X. nematophilus* 與 *P. luminescens* 具有溶血性，會破壞參與昆蟲免疫反應之顆粒血球及血漿血球 (Brillard *et al.*, 2001)。本結果顯示兩型菌對紅血球的作用上亦有差異，過去的報告指出有些菌株會凝集紅血球，有些對紅血球具破壞性 (Forst and Clarke, 2002)。

在細菌中已知 LPS 為內毒素之一，其為細菌外膜的主要成分，具有熱穩定性，細菌一旦進入寄主體內，無論死亡或存活的菌體都會將 LPS 釋出 (Yokoo *et al.*, 1992)。在大蠟蛾血液中含有 LPS-binding protein (LBP) 可抑制共生菌 LPS 作用，而共生菌所產生的 LPS，其 Lipid A 部分與寄主血球上之 glucosaminyl 接受器結合後釋放出毒質，並抑制原酚氧化酶 (prophenoloxidase) 之作用，使昆蟲免疫反應無法啟動，一旦 LPS 超過一定的臨界量時，LBP 的功能將會喪失 (Dunphy and Thurston, 1990; Yokoo *et al.*, 1992; Dunphy and Halwani, 1997)，此印證本結果顯示共生菌及線蟲得以在昆蟲體內順利存活。由 *X. indica* 菌體萃取所得之 LPS，



圖七 共生菌之脂多醣體 (LPS) 經 DNase、RNase 及 Proteinase K 處理後以分光光譜儀掃描 190~600 nm 之吸光值。第一個坡峰，在 204 nm 為 LPS；第二個坡峰，在 260 nm 為核酸。

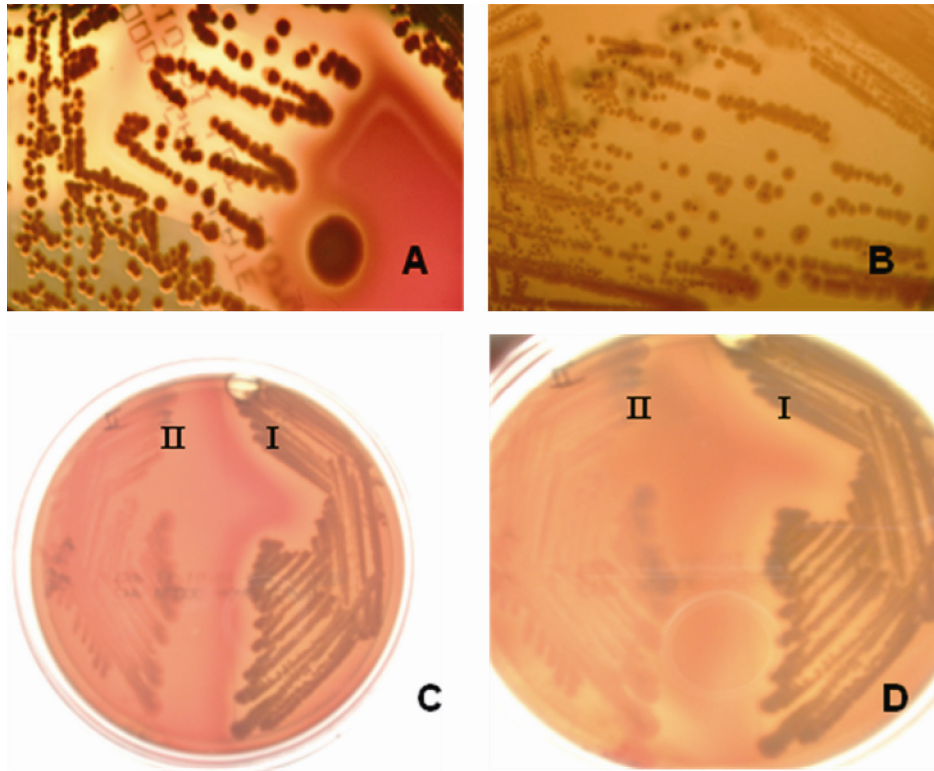
Fig. 7. Spectrophotometric scanner from 190-600 nm of pooled lipopolysaccharide fractions obtained in the chromatographic process after previous RNase, DNase and proteinase K treatment. The first peak at 204 nm corresponds to LPS; the second peak at 260 nm to oligonucleotides.

表三 共生菌 *Xenorhabdus indica* 培養濾液及脂多醣體 (LPS) 對大蠟蛾血球之壞死率

Table 3. Necrotic rate of *Galleria mellonella* hemocytes treated with cultured filtrates and lipopolysaccharide (LPS) of *Xenorhabdus indica*

Treatments	Necrotic rate (%) (Means \pm SD)*			
	3 h	6 h	12 h	24 h
Filtrates of primary form	6.05 \pm 1.09	7.99 \pm 1.54	9.29 \pm 2.05	14.13 \pm 3.16 a
LPS of primary form	6.92 \pm 1.65	7.29 \pm 1.76	8.16 \pm 2.23	10.52 \pm 2.16 b
NB medium	6.87 \pm 1.70	6.90 \pm 2.16	8.11 \pm 1.79	10.97 \pm 3.43 b

* Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.



圖八 共生菌 *Xenorhabdus indica* 在血液瓊脂平板上之溶血性測定。(A) 原生型菌在 37°C 培養 48 h 後產生之溶血環。(B) 次生型菌在 37°C 培養 48 h 後無溶血環產生。(C) 原生型菌在 25°C 培養 72 h 後仍可產生溶血環，而次生型菌則無。(D) 將 C 平板轉至 37°C 繼續培養 24 h 後，次生型菌仍可產生溶血環。

Fig. 8. Hemolytic activity of *Xenorhabdus indica* on blood agar plate. (A) Primary form produced clearing at 37°C, 48 h after culture. (B) Secondary form did not produce clearing at 37°C, 48 h after culture. (C) Primary form produced clearing at 25°C, 72 h after culture, but not the secondary form. (D) Plate C continued to incubate at 37°C for 24 h; subsequently, only the secondary form produced clearing.

表四 共生菌 *Xenorhabdus indica* 培養濾液、脂多醣體 (LPS) 及去活性菌體對大鼠及山羊紅血球之溶血率
Table 4. Hemolytic rates of red blood cells caused by *Xenorhabdus indica* culture supernatant, lipopolysaccharide (LPS) and inactivated primary form

Treatments	Hemolytic rate (%) (Means \pm SD)			
	Rat		Goat	
	1 h	2 h	1 h	2 h
Filtrates of primary form	2.41 \pm 3.78	10.91 \pm 6.11	4.35 \pm 4.12	6.64 \pm 2.99
Filtrates of secondary form	3.63 \pm 5.04	7.95 \pm 2.44	4.26 \pm 4.20	6.72 \pm 3.53
LPS of primary form	0.84 \pm 1.45	7.26 \pm 4.10	1.83 \pm 2.79	2.13 \pm 2.92
LPS of secondary form	1.37 \pm 1.19	13.66 \pm 17.05	3.90 \pm 5.41	5.35 \pm 5.25
Inactivated primary form	53.22 \pm 19.19*	62.26 \pm 18.91*	16.66 \pm 5.58*	41.70 \pm 25.95*

* Means between two incubating times in each animal tested are significantly different at 5% level according to Tukey's studentized range test.

在 *in vitro* 下，對大蠟蛾幼蟲血球不具有破壞性，但對哺乳動物紅血球之溶血率不高，此與文獻上的研究結果一致；正如由 *X. nematophila* 所萃取之 LPS，在 *in vitro* 下，對鱗翅目幼蟲血球及哺乳動物紅血球亦不具毒性 (Ribeiro *et al.*, 1999; Brillard *et al.*, 2001)。此結果表示 LPS 並非參與血球之溶血反應，但對昆蟲細胞具有毒性，呈現細胞壞死，引起大蠟蛾幼蟲麻痺，此現象與去活性 *X. indica* 之菌體注入大蠟蛾幼蟲產生的麻痺現象相似，顯示 LPS 在原生型菌致病機制上扮演重要角色，且可推測兩型共生菌在細胞壁結構上具有差異。

血液凝膠瓊脂溶血性試驗中發現，溫度會影響兩型共生菌產生溶血性物質的表現，在 37°C、48 h，兩型菌均有溶血環產生；而在 25°C 下只原生菌型在 72 h 才會產生溶血環。因此，可推測溫度影響細菌代謝率，進而影響溶血物質的產生。但次生型菌在 25°C 下，直至 96 h 仍無溶血現象，若移置 37°C 生長箱中即可恢復溶血性。在 *X. nematophila* 共生菌上也發現，培養液之上清液對人、兔子及老鼠紅血球不具活性，但移置於 4°C 下經 90 min 後，對兔子紅血球則會產生溶血反應 (Ryu *et al.*, 2002)，顯然溫度會影響溶血物質在血球細胞膜表面的結合 (binding)。液態溶血性試驗結果，兩型共生菌在 25°C 培養下之濾液，對大鼠與山羊 RBC 之溶血率及 LPS 對兩者之溶血率與對照組以 PBS buffer 處理者並無顯著差異；但去活性之原生型共生菌體對大鼠及山羊 RBC 之溶血率與對照組則有顯著差異。此結果表示菌體方為破壞蟲體免疫細胞之主要因素，而共生菌毒力的強弱，則有助於蟲生線蟲之致病力。

誌 謝

本文承蒙行政院農業委員會提供研究計畫 (95 農科-13.2.1-檢-B5) 之經費補助及本系杜武俊副教授提供細胞株，在此一併誌謝。

引用文獻

- Ou-Yang SC, Chu YI. 1988. The comparison of the development of the tobacco cutworm (*Spodoptera litura* (F.)) reared with natural and artificial diets. *Chinese J Entomol* 8: 143-150. (in Chinese)
- Akhurst RJ. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotic associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J Gen Microbiol* 121: 303-309.
- Boemare NE. 2002. Interactions between the partners of the entomopathogenic nematode complexes, *Steinernema-Xenorhabdus* and *Heterorhabditis-Photorhabdus*. *Nematology* 4: 601-603.
- Bowen DJ, Ensign JC. 1998. Purification and characterization of a high molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Appl Environ Microbiol* 64: 3029-3035.
- Bowen D, Rocheleau TA, Blackburn M, Andreev O, Golubeva E, Bhartia R, French-Constant RH. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* 280: 2129-2132.

- Brown SE, Cao AT, Dobson P, Hines ER, Akhurst RJ, East PD.** 2006. Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. *Appl Environ Microbiol* 72: 1653-1662.
- Brehelin M, Drif L, Boemare N.** 1990. Depression of defence reactions in insects by Steinernematidae and their associated bacteria. pp 213-217. In: Proceedings, Fifth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control; August 20-24, 1990; Adelaide, Australia: Society for Invertebrate Pathology.
- Brillard J, Riberio C, Boemare N, Brehélin M, Givaudan A.** 2001. Two distinct hemolytic activities in *Xenorhabdus nematophila* are active against immunocompetent insect cells. *Appl Environ Microbiol* 67: 2515-2525.
- Burman M.** 1982. *Neoaplectana carpocapsae*: toxin production by axenic insect parasitic nematodes. *Nematology* 28: 62-70.
- Dowds BCA, Peters A.** 2002. Virulence mechanisms. pp 79-98. In: Gaugler R, Kaya HK (eds). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Dunphy GB, Webster JM.** 1988. Lipopolysaccharides of *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) and their haemocyte toxicity in non-immune *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera) larva. *J Gen Appl Microbiol* 134: 1017-1028.
- Dunphy GB, Thurston GS.** 1990. Insect immunity. pp 301-323. In: Gaugler R, Kaya HK (eds). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Dunphy GB, Webster JM.** 1991. Antihemocyte surface components of *Xenorhabdus nematophilus* var. *dutki* and their modification by serum of non-immune larvae of *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* 58: 40-51.
- Dunphy GB, Halwani A.** 1997. Haemolymph proteins of larvae of *Galleria mellonella* detoxify endotoxins of the insect pathogenic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *J Insect Physiol* 43: 1023-1029.
- Elawad S, Ahmad W, Reid AP.** 1997. *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from the sultanate of Oman. *Fundam Appl Nematol* 20: 435-442.
- Fodor A, Fodor AM, Forst S, Hogan JS, Klein MG, Lengyel K, Sáringer G, Stackebrandt E, Taylor RAJ, Lehoczky Ě.** 2010. Comparative analysis of antibacterial activities of *Xenorhabdus* species on related and non-related bacteria in vivo. *J Microbiol Antimicrob* 2: 36-46.
- Forst S, Clarke D.** 2002. Bacteria-nematode symbiosis. pp 57-77. In: Gaugler R (ed). *Entomopathogenic Nematology*. CABI Press, London.

- Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E.** 1997. *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu Rev Microbiol* 51: 47-72.
- Guo L, Fatig RO, Orr GL, Schafer BW, Strickland JA, Sukhapinda K, Woodsworth AT, Petell JK.** 1999. *Photorhabdus luminescens* W-14 insecticidal activity consists of at least two similar but distinct proteins-purification and characterization of toxin A and toxin B. *J Biol Chem* 274: 9836-9842.
- Hammond SM, Lambert SM, Rycroft AN.** 1984. The bacterial cell surface. London: Croom Helmn. 226pp.
- Han R, Wouts WM, Li L.** 1991. Development and virulence of *Heterorhabdus* spp. strains associated with different *Xenorhabdus luminescens* isolations. *J Invertebr Pathol* 58: 27-32.
- Hirsch T, Marchetti P, Susin SA.** 1997. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15: 1573-1581.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Khandelwal P, Banerjee-Bhatnagar N.** 2003. Insecticidal activity associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl Environ Microbiol* 69: 2032-2073.
- Laumond C, Mauléon H, Kermarrec A.** 1979. Données nouvelles sur le spectre d'hôtes et le parasitisme du nematode entomophage *Neoplectana carpocapsae*. *Entomophaga* 24: 13-27.
- LeBeck LM, Gaugler R, Kaya HK, Hara AH, Johnson MW.** 1993. Host stage suitability of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *J Invertebr Pathol* 62: 58-63.
- Li J, Chen G, Webster JM.** 1996. *N*-(Indole-3-ylethyl)-2'-hydroxyl-3'-methylpentanamide, a novel indole derivative from *Xenorhabdus nematophilus*. *J Nat Prod* 59: 1157-1158.
- Liao CY, Tang LC, Pai CF, Hsiao WF, Briscoe BR, Hou RH.** 2001. A new isolate of the entomopathogenic nematode, *Steinernema abbasi* (Nematoda: Steinernematidae), from Taiwan. *J Invertebr Pathol* 77: 78-80.
- Mead GP, Ratcliffe NA, Renwantz L.** 1986. The separation of insect haemocyte types on Percoll gradients: methodology and problems. *J Insect Physiol* 13: 167-177.
- Nikaido H, Nakae T.** 1979. The outer membrane of gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol* 19: 163-250.
- Owuama CI.** 2003. Invasion of insect blood

- tissue by *Xenorhabdus bovienii*. Microbiology 153: 183-189.
- Park Y, Kim Y.** 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. J Insect Physiol 46: 1469-1476.
- Perdomo R, Montero V.** 2006. Purification of *E. coli* 055:B5 lipopolysaccharides by size exclusion chromatography. Biotecnologia Aplicada 23: 124-129.
- Perters A, Gouge DH, Ehlers RU, Hague NGM.** 1997. Avoidance of encapsulation by *Heterorhabditis* spp. infecting larvae of *Tipula orleracea*. J Invertebr Pathol 70: 161-164.
- Poinar GO Jr.** 1979. Nematodes for biological control of insects. Boca Raton, Florida: CRC Press. 277pp.
- Poinar GO Jr.** 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. pp 23-61. In: Gaugler R, Kaya HK (eds). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Raetz CR, Whitfield C.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. Annu Rev Biochem 71: 635-700.
- Ribeiro C, Duvic B, Oliveira P, Givaudan A, Palha F, Simões N, Brehélin M.** 1999. Insect immunity: effects of factors produced by a nematobacterial complex on immunocompetent cells. J Insect Physiol 45: 677-685.
- Rowe GE, Welch GA.** 1994. Assays of hemolytic toxins. Methods Enzymol 235: 657-667.
- Tsai MH, Tang LC, Hou RF.** 2008. The bacterium associated with the entomopathogenic nematode *Steinernema abbasi* (Nematoda: Steinernematidae) isolated from Taiwan. J Invertebr Pathol 99: 242-245.
- Van Sambeek J, Wiesner A.** 1999. Successful parasitism of locusts by entomopathogenic nematodes is correlated with inhibition of insect phagocytes. J Invertebr Pathol 73: 154-161.
- Wang QY, Nangong ZY, Lu XJ, Li XH, Li GX, Cui L.** 2005. Purification of insecticidal proteins from *Xenorhabdus nematophila* HB310 and detection of their insecticidal activity. Acta Entomol Sinica 48: 353-358.
- Wang Y, Gaugler R, Cui L.** 1994. Variations in immune response of *Popillia japonica* and *Acheta domesticus* to *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* species. J Nematol 26: 11-18.
- Webster JM, Chen G, Hu K, Li J.** 2002. Bacterial metabolites. pp 99-114. In: Gaugler R (ed). Entomopathogenic Nematology. CABI Press, London.
- White GF.** 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science 66: 302-303.
- Yi EC, Hackett M.** 2000. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and

lipid A from gram-negative bacteria.
Analyst 125: 651-656.

Yokoo S, Tojo S, Ishibashi N. 1992.
Suppression of the prophenoloxidase
cascade in the larval haemolymph of
the turnip moth, *Agrotis segetum* by
an entomopathogenic nematode,
Steinernema carpocapsae and its
symbiotic bacterium. *J Insect physiol*
38: 915-924.

收件日期：2011年10月13日

接受日期：2011年12月23日

Effects of the Symbiotic Bacterium, *Xenorhabdus indica*, from the Entomopathogenic Nematode, *Steinernema abbasi*, and Its Metabolites on Insect Hemocytes and Cell Lines

Mi-Hau Tsai, Li-Cheng Tang*, and Roger F. Hou*

Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung City 40227, Taiwan, ROC

ABSTRACT

The symbiotic bacterium of the entomopathogenic nematode, *Steinernema abbasi* Taiwan strain, has been identified as being *Xenorhabdus indica*. Its cultured filtrates from the primary form were toxic to SF21 and S2 cell lines, causing cellular necrosis even after being autoclaved for 20 min, while those from the secondary form were not toxic to either of these two cell lines. In addition, the cultured filtrates of both forms were not toxic to the mammalian cell line, BHK21. In *in vitro* assays, the necrotic rates of *Galleria mellonella* hemocytes at 24 h after treatment with the cultured filtrates of symbiotic bacteria were significantly different from those of the control, whereas the rates treated with *X. indica* lipopolysaccharide (LPS) were similar to those of the control. These results indicate that necrosis in *G. mellonella* hemocytes occurs 24 h after being treated with the filtrates. Hemolytic rates of rat and goat red blood cells (RBCs) as treated with cultured filtrates from both forms of *X. indica* were not significantly different from those of the control, showing that the cultured filtrates did not contain hemolytic substances. Inactivated bacterial cells (primary form) caused serious paralysis in *G. mellonella* larvae and eventually killed the insects. This symptom was found to be similar to that of being injected with LPS extracted from the primary form. However, these inactivated bacterial cells were not effective against *Spodoptera litura* larvae. Therefore, it is suggested that LPS is neurotoxic to *G. mellonella* larvae. Hemolytic rates of rat and goat RBCs treated with inactivated bacteria (primary form) were significantly different from those of the control. In *in vivo* assays, the inactivated bacterial cells were capable of causing necrosis and subsequently killing the hemocytes of both the *G. mellonella* and *S. litura* larvae. They were, however, comparatively less destructive to *S. litura* hemocytes. In *in vitro* assays, LPS from *X. indica* (primary form) was not markedly detrimental to *G. mellonella* hemocytes compared with the control group, suggesting that LPS is not a major factor affecting the insect immune system. Therefore, it is speculated that LPS and certain substances when released into the insect hemocoel from symbiotic bacteria could hamper the insect's immune system, resulting in the proliferation of symbiotic bacteria and nematodes, and subsequently cause septicemia to rapidly kill the insect hosts.

Key words: *Steinernema abbasi*, *Xenorhabdus indica*, hemocyte, cell line, lipopolysaccharide