

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050001
參展科別 動物學
作品名稱 探討線蟲於線蟲捕捉菌獵食壓力下之適應性
得獎獎項 四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學
指導教師 薛雁冰、李宏孝
作者姓名 周文瑋、盧佳欣

關鍵詞 線蟲、線蟲捕捉菌、獵食者-獵物共演化

作者簡介



我是周文瑋，就讀北一女中高三。一眨眼，我們也和線蟲與線蟲捕捉菌一起相處了一年多，從一開始懵懵懂懂什麼都不會，到現在可以很有自信的在科展的舞台和別人分享自己的研究。十分感謝一路上幫助我們的人，整個科展的旅程不只是完成一份報告，更是在過程中學會科學研究的方法，而我也從實驗室教授與學長姐身上看到作為一個科學家所擁有的態度與特質，大家對科學與生物的熱情深深感染著我。雖然有時候實驗結果可能不如預期，但過程中不斷發現新的事物，親自動手解決問題的感覺，讓我覺得做研究是一件很有趣也很有意義的事情！

我是盧佳欣，目前就讀北一女中科學班。一年前我們因緣際會的和線蟲與線蟲捕捉菌相遇，誤打誤撞的開啟養蟲和養菌的旅程，拾獲了許多意外的成長和驚喜。感謝實驗室學長姊、教授、專研老師和所有一路上支持我們的人，總是大方的提供資源與建議，讓我們得以摸索如何做一位研究者，並建構在實驗失敗中的挫折忍耐力。

摘要

獵食關係(predator-prey interaction)普遍存在於自然界中，本研究欲以線蟲與線蟲捕捉菌(nematode trapping fungi, NTF)做為探討獵食關係的分子模型，進一步了解獵食者與獵物的共同演化關係。依此，本研究設計了適性實驗以了解線蟲在線蟲捕捉菌獵食壓力下，其母體或子代行為與適應性變化。本研究發現，當暴露於線蟲捕捉菌所分泌的吸引力氣味分子 MMB，線蟲會降低其生長速率；而線蟲在被線蟲捕捉菌捕捉後，子代對線蟲捕捉菌與 MMB 之趨化性顯著降低，並可能透過 piRNA 路徑遺傳此行為改變，影響三個世代，藉此增加族群的適應性。本研究未來會進一步了解線蟲適應行為改變的分子機制，並希望能藉此系統增進對獵食者-獵物交互作用的了解。

Abstract

Predator-prey interaction is commonly seen in the nature. In our research, we use nematode-trapping fungi *Arthrobotrys oligospora* and nematodes *Caenorhabditis elegans* as our model to study predator-prey interaction and the co-evolution relationship from the perspective of nematodes. We designed fitness assays to study how P₀ worms and the following progeny react to the predation stress from the fungus. We found that *C. elegans* growth rate decreases after 48 hr exposure to *A.o.* odor MMB, and trapping will induce avoidance of *A.o.* by decreasing chemotaxis to both *A.o.* and MMB. Also, the *A.o.*-induced avoidance is transgenerational inherited, and it might require piRNA pathway and epigenetic modifier. These efforts will allow us to further investigate the molecular mechanism of this behavioral change during evolution, and gain more insights into the predator-prey interaction between nematodes and nematode-trapping fungi.

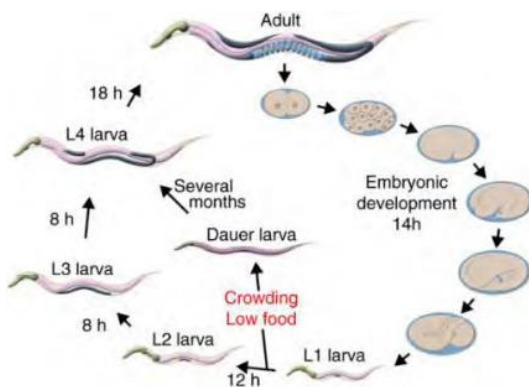
壹、前言

一、研究背景

(一) 秀麗隱桿線蟲(*Caenorhabditis elegans*)

秀麗隱桿線蟲(*Caenorhabditis elegans*)是分子生物學和發育生物學的最佳模式生物之一，具有簡單的神經系統，體積小且方便培養。一般的秀麗隱桿線蟲為雌雄同體，生長週期短，約兩天便能繁殖下一代，子代繁多。

C. elegans 的生活史可以分為幼蟲第一期(L1)、幼蟲第二期(L2)、幼蟲第三期(L3)、幼蟲第四期(L4)和成蟲期(adult)，如圖一。秀麗隱桿線蟲主要是食細菌線蟲，在野外可食用的細菌種類繁多，其中包含致病菌與大腸桿菌，實驗室中常利用 *E. coli* OP50 (以下簡稱 OP50) 作為食物來源。



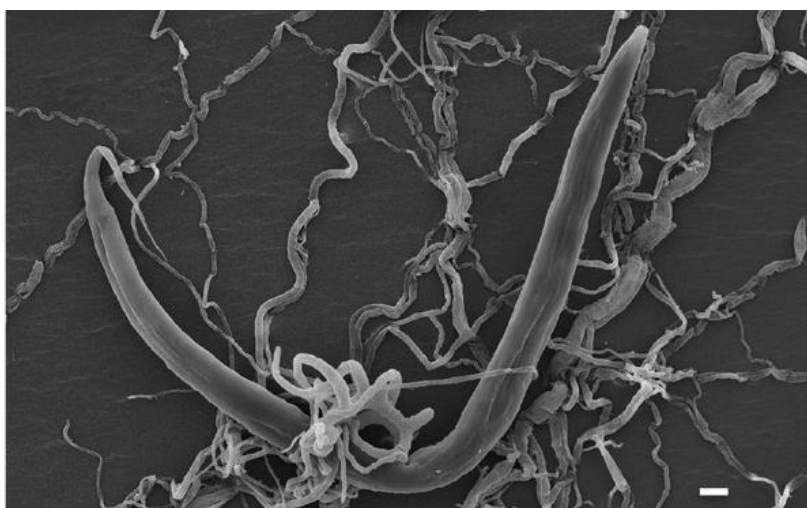
圖一 *C. elegans* 生活史 (Murgatroyd et al., 2010)

(二) *Arthrobotrys oligospora*

線蟲捕捉菌是部分以線蟲為食的真菌的總稱，其中 *A. oligospora* 是目前已知分布最廣、最常見的線蟲捕捉菌，在世界五大洲都有其分布。其生活環境多樣，可以生長於自然土壤、水域表面、動物排泄物中，甚至是嚴重污染的環境都有 *A. oligospora* 出現的紀錄，顯示 *A. oligospora* 具有強大的環境適應能力 (Niu and Zhang, 2011)。

近年來，*A. oligospora* 已成為研究線蟲與線蟲捕捉菌獵食關係的模式真菌 (Niu and Zhang, 2011; Ulzurrun and Hsueh, 2018)。 *A. oligospora* 在低營養環境下，能感知線蟲信號進而產生立體的黏著網路 (adhesive network) (圖二) 作為捕捉線蟲的陷阱；此黏著網路表面披覆黏液，可以黏附捕捉路過之線蟲，並發育特殊菌絲結構穿破線蟲體壁，破壞其組織器官，以吸取養分作為碳源與氮源。據以往研究顯示，*A. oligospora* 獵食能力對線蟲具普遍

性，可以捕捉多種線蟲，包括以農作物為食的植物寄生性線蟲、獵食性線蟲與腐生性線蟲。於實驗室環境下，其陷阱之捕捉率與線蟲死亡率均接近百分之百。因此相關研究有望應用於線蟲的病蟲害防治上。

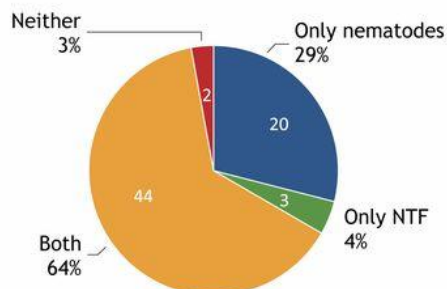


圖二 電子顯微鏡下拍攝線蟲捕捉菌之捕捉陷阱 (Hsueh et al. 2013, 2017)

(三)線蟲與線蟲捕捉菌的獵食關係(predator-prey interaction)

線蟲與真菌是地球上最普遍的一組獵食者與獵物之一。研究指出，在台灣山區的野外採集中，約有60%的樣本線蟲與線蟲捕捉菌共存（圖三），顯示這兩者在自然界中生存於相似生態棲位，可能面臨彼此施加的生存壓力，長期演化出多樣的適應能力(Yang et al., 2020)。

獵食關係(predator-prey interaction)普遍存在於自然界，而線蟲與線蟲捕捉菌可以做為探討獵食關係分子機制的簡化模型，進一步了解獵食者與獵物的共同演化關係。



圖三 在超過60%的土壤樣本中，線蟲與線蟲捕捉菌是共存的(Yang et al., 2020)

二、研究動機

線蟲(nematode)為地球上數量最多的多細胞生物，廣泛分佈於全球各生態系中，個體總數高達約 4.5×10^{20} 隻(Hoogen et al., 2019)。其中有許多種類的線蟲為植物寄生性線蟲，每年造成大量的農作物與經濟損失。線蟲捕捉菌(nematode trapping fungi, NTF)作為獵捕和消化線蟲的捕食真菌，在多數的土壤中與線蟲共存，利用寄生、製造陷阱、分泌神經毒素等方式殺死線蟲，以獲得有機養分。

線蟲和線蟲捕捉菌是地球上最普遍的獵食者-獵物關係之一；然而，它們交互作用關係與適應機制還有待深入研究。我們利用線蟲與線蟲捕捉菌作為獵食者-獵物關係(predator-prey interaction)的模型，並以線蟲的角度，探討獵食者-獵物交互作用的共同演化與線蟲適應性的分子機制。

三、研究目的

- (一)觀察不同環境下線蟲捕捉菌捕捉陷阱生長情形
- (二)比較線蟲與線蟲捕捉菌共同培養下的生長速率變化
- (三)比較線蟲與線蟲捕捉菌共同培養下的育雛數變化
- (四)比較被捕食的線蟲其子代育雛數差異
- (五)比較被捕食的線蟲其子代趨化性差異
- (六)探討被捕食與未被捕線蟲間是否存在警告傳訊行為
- (七)比較不同野生線蟲株之適應性

貳、研究方法與過程

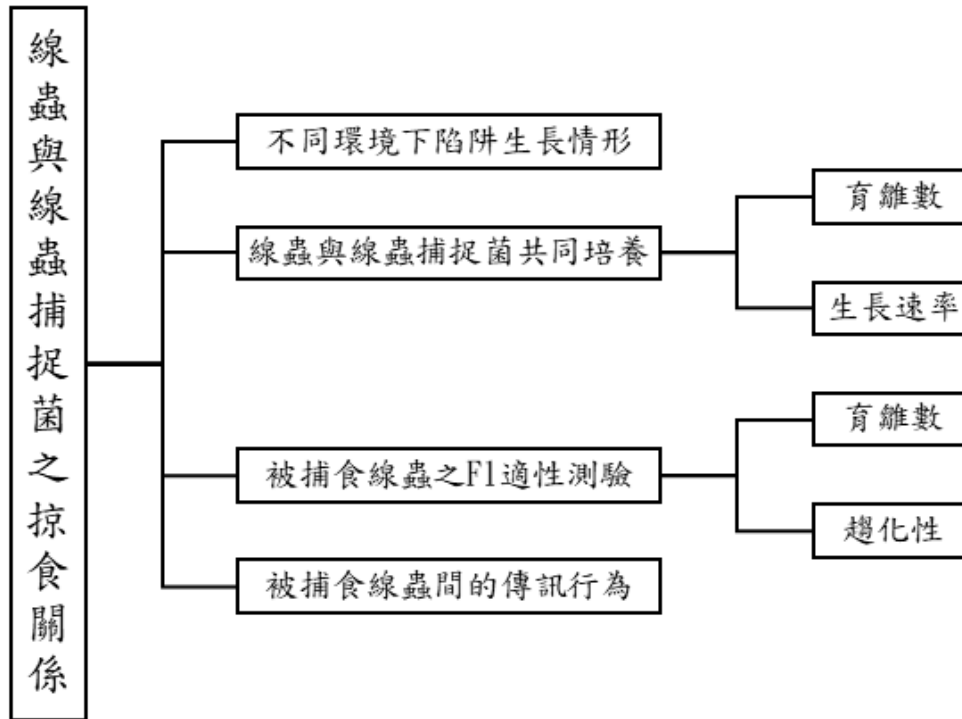
一、實驗器材

1.5mL 微量離心管、微量吸管、Parafilm、六公分培養皿、九公分培養皿、解剖顯微鏡、微分干涉相差顯微鏡、巴斯德玻璃吸管、玻璃毛細管、防震光學桌、樣品盒、細胞計數器、25°C 培養箱

二、實驗藥劑

M9 buffer (pH 7)、ddH₂O、95%酒精、礦物油、methyl 3-methyl-2-butenate (MMB)、NaN₃、NGM 培養基、PDA 培養基、LNM 培養基、Chemotaxis plate (CXP)

三、研究流程與方法



四、線蟲培養

(一) 以 NGM(nematode growth medium)培養 *C. elegans*，食物來源為 OP50，培養於室溫 25°C，每三天繼代一次並更換培養基。

(二) 單獨培養(single)：將一隻線蟲單獨置於一盤 NGM 培養基。

五、線蟲捕捉菌培養

(一) 以 LNM(low-nutrient medium)培養 *A. oligospora*，置於 25°C 培養箱生長 2 天。

(二) 以 PDA(potato dextrose agar medium)培養 *A. oligospora*，置於 25°C 培養箱生長 2 天。

(三) 誘導陷阱產生

以 M9 buffer 將 NGM 培養基上的 N2 線蟲洗入 1.5mL 離心管，以 M9 buffer 清洗兩次後將水分吸乾，將線蟲加入真菌培養基，並等待一天。

六、不同環境下 *A. oligospora* 的陷阱(trap)生長情形

接種 *A. oligospora* 於 LNM 與 PDA 培養基，生長兩天後分別加入線蟲，等待一天後觀察真菌陷阱生長情形。

七、與 *A. oligospora* 共同培養(co-culture)之線蟲育雛數(brood size)變化

接種 *A. oligospora* 於 NGM 培養基，生長兩天後每盤分別加入線蟲的卵約 50 顆，待線蟲生長至 L4 幼蟲，每盤挑出 3 隻線蟲進行單獨培養，每天將子代的幼蟲挑起並計算數量。

八、與 *A. oligospora* 共同培養(co-culture)之線蟲生長速率(growth rate)變化

本實驗分為三個組別進行：對照組(control)的線蟲培養在未進行任何處理的 NGM 培養基、MMB 實驗組(MMB)則於培養基的蓋子上滴加 MMB、共同培養組(NGM+*A.o.*)的線蟲從蛋及幼蟲時期即培養於有線蟲捕捉菌的環境。每組準備 2 盤，分別放置 24 小時、48 小時後觀察。

實驗時，挑約 30 隻成蟲至一盤 NGM 培養基，待其下蛋 1 小時後，挑約 10~30 顆蛋於各盤。等待 24 小時、48 小時後，以微分干涉相差顯微鏡(DIC microscopy)搭載 BSI 相機拍照並分析照片中蟲體長度。

(一) 對照組(control)

於未經任何處理的 NGM 培養基每盤挑入約 10~30 顆蛋。

(二) MMB 實驗組(MMB)

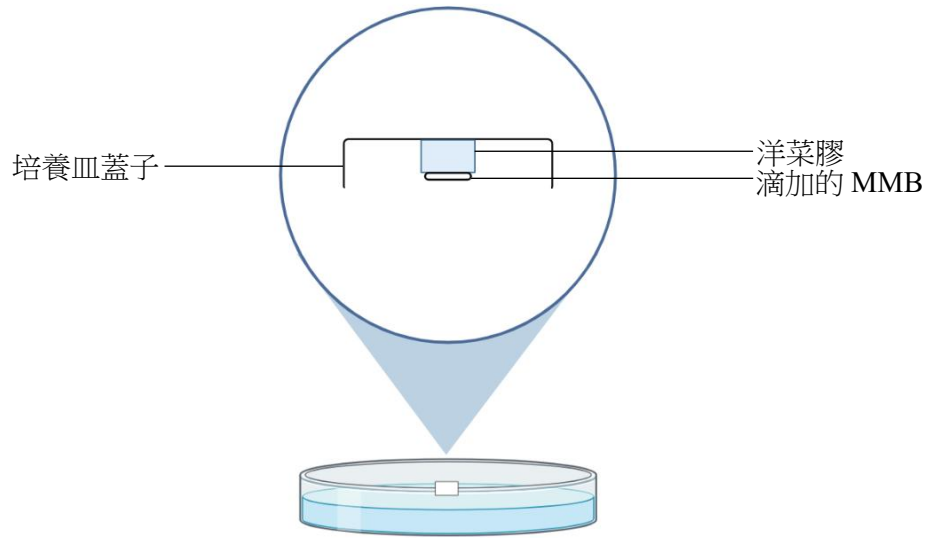
切下一小塊洋菜膠置於培養基的蓋子上，並於洋菜膠上滴加 1 μ L 的 MMB(100%) (圖四)。每盤挑入約 10~30 顆蛋，以 Parafilm 將培養皿封起。

(三) 共同培養組(NGM+*A.o.*)

接種 *A. oligospora* 於 NGM 培養基，生長兩天後，每盤挑入約 10~30 顆蛋。

(四) 影像處理

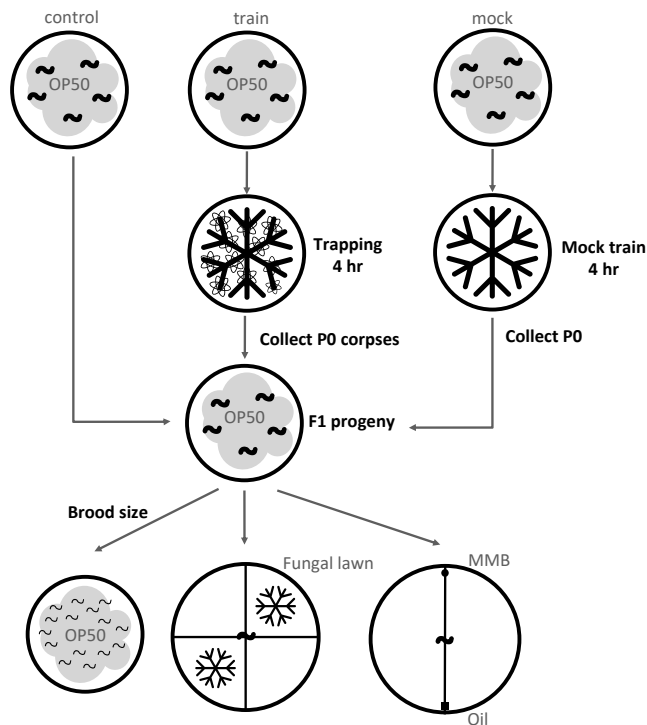
利用 ImageJ 的 Segmented line 分析照片中蟲體長度。



圖四 生長速率實驗裝置示意圖。

九、受捕線蟲子代之適性測驗(fitness assay)

本實驗分為三個組別進行：實驗組(trained)P₀與已被誘導產生陷阱之線蟲捕捉菌接觸四小時、模擬組(mock)P₀與尚未被誘導產生陷阱之線蟲捕捉菌接觸四小時、對照組(control)P₀則完全未預先接觸線蟲捕捉菌。(圖五)



圖五 受捕線蟲子代適性測驗示意圖。

(一) 訓練(training)

接種 *A. oligospora* 於 LNM 培養基，生長兩天，每盤加入線蟲誘導陷阱產生。第三天加入 P₀ 線蟲，等待 4 小時後將已死亡的 P₀ 線蟲蟲體挑至 NGM 培養基上，待隔天 L1 幼蟲(F1)從母體爬出後，將受真菌汙染的區域切除避免影響線蟲生長。

(二) 模擬訓練(mock train)

接種 *A. oligospora* 於 LNM 培養基，生長三天後加入 P₀ 線蟲，等待 4 小時後挑約 20 隻 P₀ 至 NGM 培養基上，隔天將 P₀ 挑起，保留 F1 幼蟲。

(三) 育雛數(brood size)

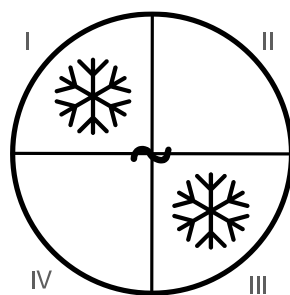
待 F1 子代生長至 L4 幼蟲，每組各挑 9 隻單獨培養，每天將子代的小蟲挑起並計算數量。

(四) 四點趨化性測試(4-point chemotaxis assay)

以 ddH₂O 將真菌培養基上的孢子洗入 1.5mL 離心管，以細胞計數器確認孢子密度(顆/mL)，如圖六，在 Chemotaxis plate 的第 I、III 區加入約 1000 ~ 1500 顆孢子，置於 25°C 培養箱生長 2 天。

待 F1 子代生長至成蟲，進行四點趨化性測試。待測線蟲以 M9 buffer 清洗兩次，再用 ddH₂O 清洗一次，以去除蟲體沾黏之 OP50。

實驗時，在 Chemotaxis plate 中央加入約 50~100 隻蟲，並在 I~IV 區中間處加入 NaN₃ 以麻痺行經的線蟲，以毛細管吸除多餘水分後，將 Chemotaxis plate 裝在樣品盒中置於防震光學桌。1 小時後計算四個區域的線蟲數量，並依圖六的公式計算 Chemotaxis index(CI)。CI 會介於 -1.0 ~ 1.0，-1.0 表示線蟲完全不被真菌吸引，而 1.0 表示完全被真菌吸引。

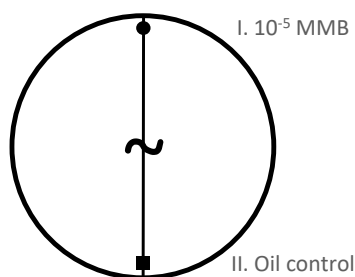


圖六 四點趨化性測試(4-point chemotaxis assay)示意圖。將 Chemotaxis plate 劃分為四個區域，*A. oligospora* 培養於第 I 和 III 區。

$$\text{Chemotaxis index (CI)} = \frac{\#(\text{I+III}) - \#(\text{II+IV})}{\#(\text{I+III}) + \#(\text{II+IV})}, -1.0 \leq \text{CI} \leq 1.0$$

(五) 兩點趨化性測試(2-point chemotaxis assay)

如圖七，在 Chemotaxis plate 中央加入約 50~100 隻蟲，在 I、II 區加入 1 μL NaN_3 以麻痺行經的線蟲後，分別加入 1 μL 10^{-5} MMB（以礦物油稀釋）與 1 μL 礦物油。以毛細管吸除多餘水分後，將 Chemotaxis plate 裝在樣品盒中置於防震光學桌。1 小時後計算四個區域的線蟲數量，並依圖七的公式計算 Chemotaxis index(CI)。CI 會介於-1.0 ~ 1.0，-1.0 表示線蟲完全不被真菌吸引，而 1.0 表示完全被真菌吸引。



圖七 兩點趨化性測試(2-point chemotaxis assay)示意圖。分別於 I 區和 II 區滴加 MMB 與礦物油。

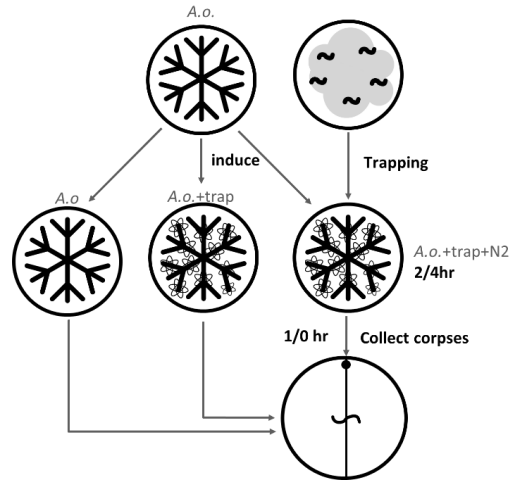
$$\text{Chemotaxis index (CI)} = \frac{\#(\text{I-II})}{\#(\text{I+II})}, -1.0 \leq \text{CI} \leq 1.0$$

十、被捕食線蟲與未被捕線蟲間傳訊行為測試

本實驗分為三個組別進行，包含未誘發陷阱的線蟲捕捉菌(*A.o.*)、已誘發陷阱之線蟲捕捉菌(*A.o.+trap*)、受陷阱捕捉之線蟲(*A.o.+trap+N2*)。三組別之真菌於同一天接種至 LNM，等待三天生長後，以 N2 adult 誘發 *A.o.+trap*、*A.o.+trap+N2* 二組別之捕蟲陷阱。等待 16 至 18 小時陷阱生長、加入之線蟲消化分解，*A.o.+trap+N2* 組別再加入約 400 隻 N2 adult 作為被捕線蟲。

(一) 單邊測試

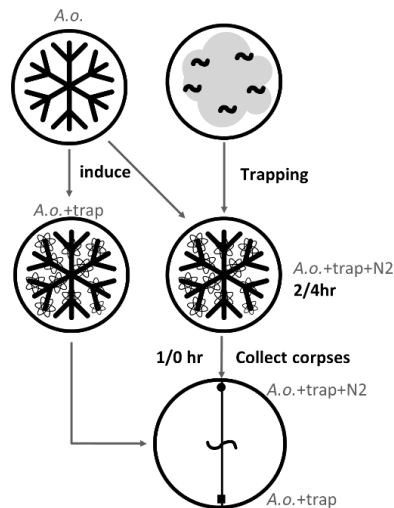
以盤為單位，蒐集三組別每盤 6 cm LNM 培養基上之內容物(包含真菌菌絲與線蟲)，置於 Chemotaxis plate 的其中一端並滴加 NaN_3 ，另一端只滴加 NaN_3 。測試的時間條件包含四種組合，*A.o.*+trap+N₂ 之組別再加入線蟲後等待其被捕捉 2 小時或 4 小時，轉移至 Chemotaxis plate 後等待 0 或 1 小時，進行趨化性測試。(圖八)



圖八 被捕線蟲間傳訊行為之單邊測試實驗示意圖。

(二) 雙邊測試

以盤為單位，蒐集 *A.o.*+trap、*A.o.*+trap+N₂ 兩組別每盤 6 cm LNM 培養基上之內容物，分別置於 Chemotaxis plate 的兩端並滴加 NaN_3 。測試的時間條件包含四種組合，*A.o.*+trap+N₂ 之組別再加入線蟲後等待其被捕捉 2 小時或 4 小時，轉移至 Chemotaxis plate 後等待 0 或 1 小時，進行趨化性測試。(圖九)



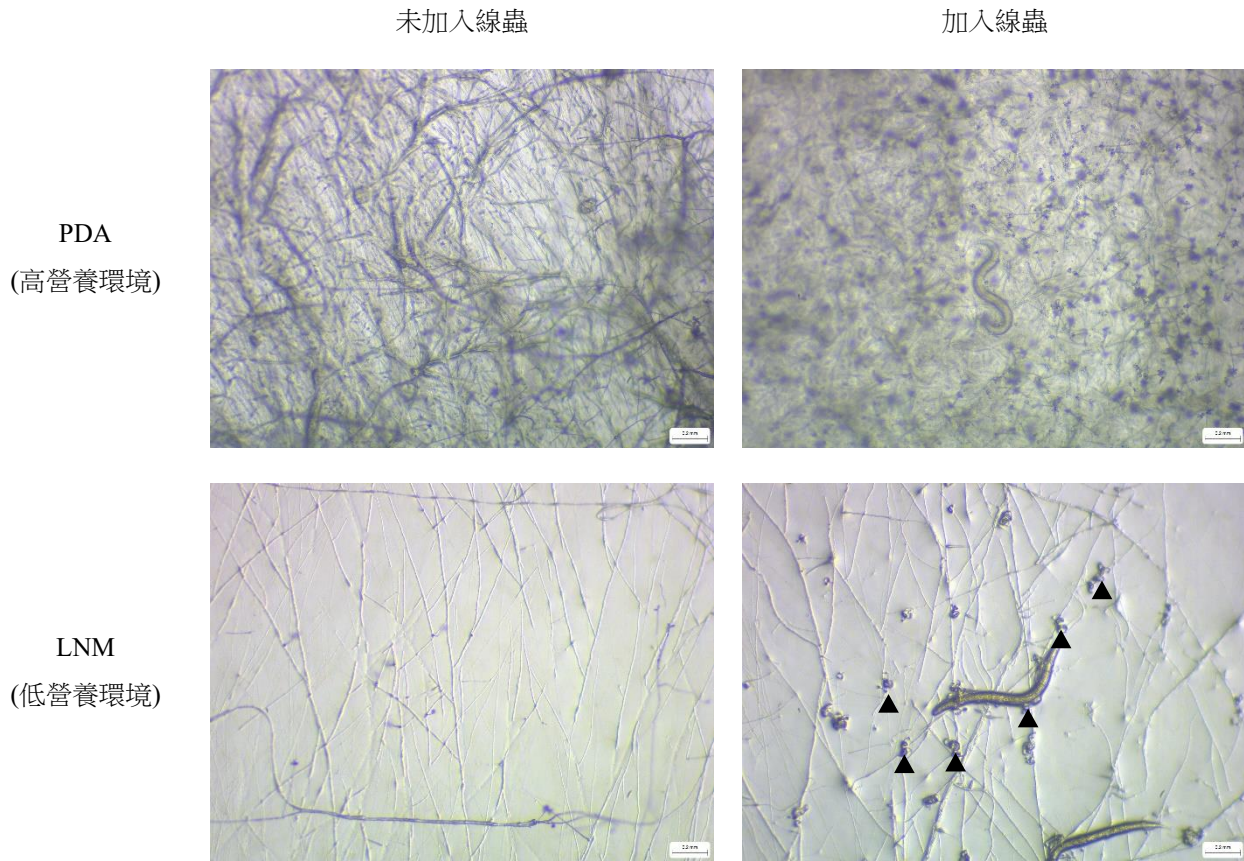
圖九 被捕線蟲間傳訊行為之雙邊測試實驗示意圖。

參、研究結果

一、不同環境下 *A. oligospora* 的陷阱生長情形

為了解 *A. oligospora* 在何種環境條件下會生成捕蟲陷阱，本實驗觀察不同營養情形、線蟲出現與否的條件下，*A. oligospora* 的陷阱生長情形。此實驗分別以 PDA、LNM 培養基作為高營養環境與低營養環境之代表，觀察加入線蟲前後陷阱生長情形。

從圖十可以發現，*A. oligospora* 在低營養環境、線蟲出現的情況下生成陷阱(黑色箭頭)；在低營養環境但未加入線蟲的條件下，並不會生成陷阱；而在高營養環境下，無論線蟲出現與否，都不會生成陷阱。配合文獻與本實驗結果可推論：線蟲捕捉菌只會在低營養環境與線蟲的出現兩條件皆符合的情況下，才生成捕蟲陷阱(Niu et al., 2011)。



圖十 不同環境下 *A. oligospora* 的捕蟲陷阱生長情形。*A. oligospora* 僅在低營養環境、線蟲出現的情況下生成陷阱(黑色箭頭)。

在野外，*A. oligospora* 常生長於腐爛的木頭，亦可生長於土壤中，時常處於低營養環境，若是感受到線蟲存在的訊號，線蟲捕捉菌便會發展出捉蟲陷阱，以捕食線蟲作為氮源 (Gray 1987; Jaffee 2004)。

由此推測，線蟲與線蟲捕捉菌在自然中時常存在獵食者-獵物的生存壓力。為了生存，線蟲會透過何種機制應對強力的線蟲捕捉菌獵食？我們設計以下實驗來探討線蟲面對線蟲捕捉菌產生的適應性差異：包含生長速率、繁殖能力與趨化性等行為變化。

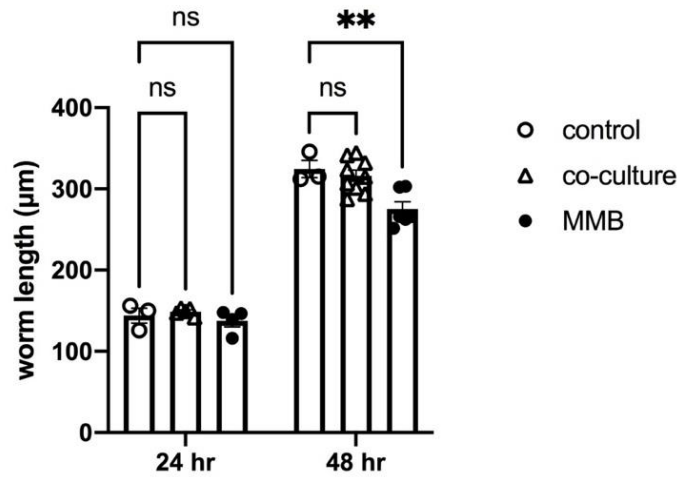
二、線蟲與線蟲捕捉菌共同培養下的生長速率變化

我們好奇如果線蟲生長於充滿獵食者線蟲捕捉菌的環境中，是否會影響線蟲的行為表現。有文獻指出，獵物水蚤與獵食者魚類共同存在時會加速水蚤的生活週期並增加其子代數量 (Walsh et al., 2015)；另外在共生關係中，螞蟻釋放費洛蒙促進蚜蟲的生育能力 (Xu T. et al., 2021)；若將線蟲暴露於具吸引性的氣味分子苯甲醛(BA)會使線蟲生育能力增加 (Remy J. and Hobert O., 2005)。因此我們假設：獵食者氣味可能會造成獵物的生長速率差異。

C. elegans 作為模式物種，目前對其細胞譜系與生長週期已具有深入了解，因此我們利用固定時間下線蟲蟲體長度作為生長速率的指標。在線蟲與線蟲捕捉菌共同培養的環境下，線蟲長期暴露於真菌分泌的化學物質中，其中又以 methyl 3-methyl-2-butenate (MMB) 為 *A. oligospora* 專一分泌的吸引性氣味分子，MMB 類似線蟲的性費洛蒙氣味，可以吸引線蟲接近線蟲捕捉菌的獵食範圍 (Hsueh et al., 2017)。

因此我們設計實驗，分別將線蟲暴露於 MMB 或與 *A.o.* 共同培養，在 24 與 48 小時後量測蟲體長度，作為生長速率的指標。發現經過 48 小時後，暴露於 MMB 的線蟲其生長速率較對照組慢。(圖十一)

已知 L1 幼蟲對於線蟲捕捉菌趨化性較低 (Hsueh et al., 2017)，由此推測，線蟲可能透過降低生長速率延長停留在幼蟲階段的時間，減少被捕捉的機會，以利族群的延續。

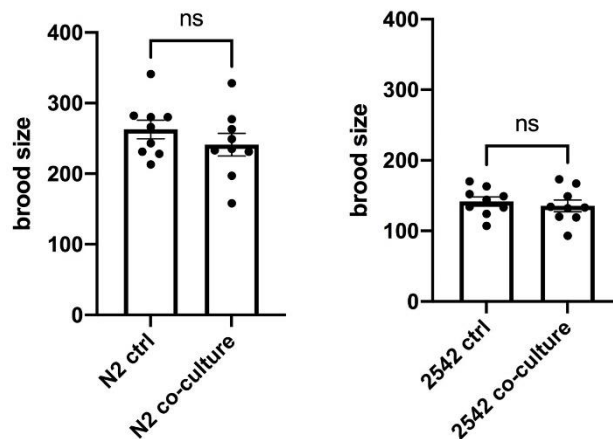


圖十一 線蟲與線蟲捕捉菌共同培養或暴露於 MMB 24 小時、48 小時下的生長速率。(n=3~9; **p<0.01)

三、線蟲與線蟲捕捉菌共同培養的育雛數變化

除了生長速率，我們亦好奇與線蟲捕捉菌共同培養是否會影響線蟲的生育能力？因此我們將線蟲與線蟲捕捉菌共同培養，觀察幼蟲時期與線蟲捕捉菌共同生長的線蟲其子代數量變化。如圖十二，與真菌共同培養下的線蟲其育雛數變化並不顯著。

此外，除了實驗室 N2 模式線蟲株，其他野生株線蟲在相同實驗處理下的變化是否會較 N2 顯著？因此我們以 TWN2542 野生株線蟲重複同樣的實驗。台灣山區野外採集時，TWN2542 為與線蟲捕捉菌同時分離的線蟲株，推測 TWN2542 可能已演化出對線蟲捕捉菌更完整的適應力。然而圖十二顯示與線蟲捕捉菌共同培養下的 TWN2542 線蟲其子代數量並沒有明顯增加。同時，TWN2542 整體的育雛數顯著低於 N2。



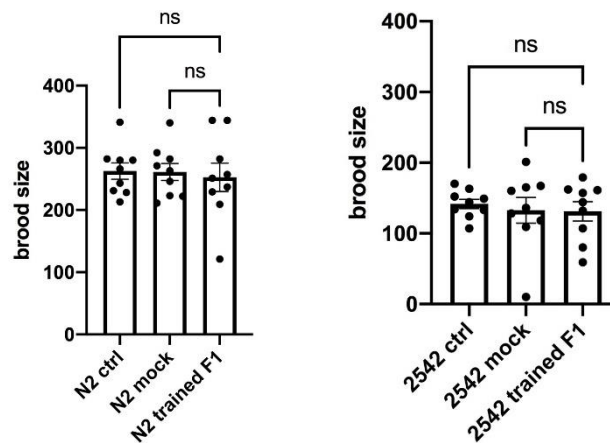
圖十二 線蟲與線蟲捕捉菌共同培養的育雛數。(n=9)

四、被捕食的線蟲其子代育雛數變化

天擇是透過生存與繁殖來完成，線蟲在自然界中長期面臨來自線蟲捕捉菌的生存壓力，為探討這種生存壓力對線蟲是否具有跨世代的(transgenerational)影響，我們設計了適性測驗以觀察被捕線蟲子代的各項特徵變化，包含繁殖面的育雛數與生存面的趨化性測試。

當線蟲遇到線蟲捕捉菌的陷阱後，便會被陷阱的黏著網路困住。此時可觀察到線蟲被固定在捕捉陷阱上來回扭動掙扎。約 1 小時後，隨著線蟲捕捉菌侵入線蟲與線蟲能量耗損，線蟲活動力逐漸下降。此時線蟲會將儲存於 uterus 的蛋排出體外，且由於線蟲尚未完全死亡，仍會生成新的蛋再次儲存於 uterus。此段時間生成之線蟲子代即為本實驗的實驗對象，用以探討線蟲捕捉菌對被捕線蟲造成之生存壓力是否具有跨世代的(transgenerational)影響。

如圖十三，無論 N2 或 TWN2542，被捕食的線蟲其 F1 子代育雛數並未與對照組或模擬訓練組有明顯差異。但可以發現 TWN2542 的育雛數顯著少於 N2，與圖十二的結果一致。

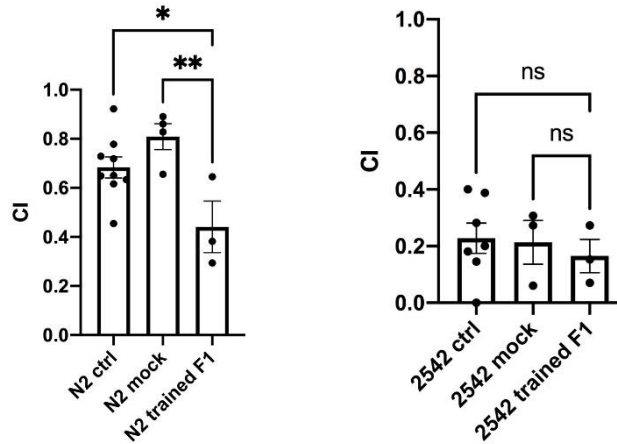


圖十三 被捕食的線蟲其 F1 子代育雛數。(n=9)

五、被捕食的線蟲其子代趨化性變化

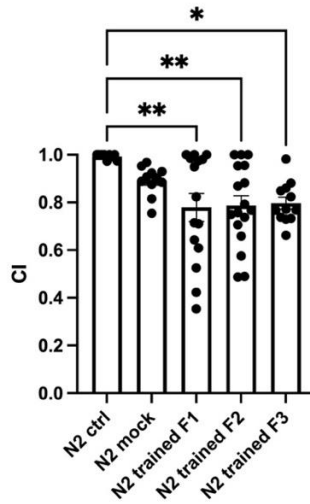
前面的實驗以繁殖的角度探討線蟲的適應力，本實驗則欲從生存的角度，藉由趨化性測試，探討被捕線蟲之子代是否能藉由降低對線蟲捕捉菌吸引力而提升適應力。

如圖十四，實驗室模式株 N2 線蟲對 *A.o.* 具有相當高的趨化性，N2 模擬組的趨化性與對照組相比則無明顯差異，表示當線蟲與真菌共處且未被捕捉時不會影響其子代行為；然而 N2 被捕線蟲 F1 子代對 *A.o.* 的趨化性明顯低於模擬組與對照組，推測藉由降低對 *A.o.* 的趨化性可使子代線蟲較不易被吸引而增加存活機會。另外，與 *A.o.* 共域的野生株線蟲 TWN2542 趨化性明顯低於 N2，推測是長期受獵食者壓力之演化結果，然而其被捕線蟲 F1 子代的趨化性與對照組或模擬組並無明顯差異，我們推測是造成趨化性降低的機制在已適應的野生株已不具作用。



圖十四 被捕食的線蟲(N2 及野生株 TWN2542)其 F1 子代對 *A.o.* 的趨化性。(n=3~9; *p<0.05, **p<0.01)

而 *A.o.* 會分泌特定的氣味分子 MMB 以吸引線蟲靠近線蟲捕捉菌的掠食範圍(Hsueh et al., 2017)，我們參考實驗室先前的研究，嘗試使用 10^{-5} MMB 進行被捕線蟲子代趨化性測試實驗。發現對照組 N2 線蟲對於 10^{-5} MMB 的趨化性近乎為完全吸引，然而在被捕食後，其子代對於 MMB 的趨化性顯著降低，與圖十四對於 *A.o.* 的趨化性的結果相符，且此趨化性行為改變可以持續影響至 F3 子代(圖十五)。因此以下實驗使用 MMB 代替真菌，進行趨化性測試實驗。綜上所述，當親代 N2 線蟲被捕捉過後會透過某些機制影響其子代行為，降低子代對線蟲捕捉菌的趨化性，減少被吸引而被捕食的機會。

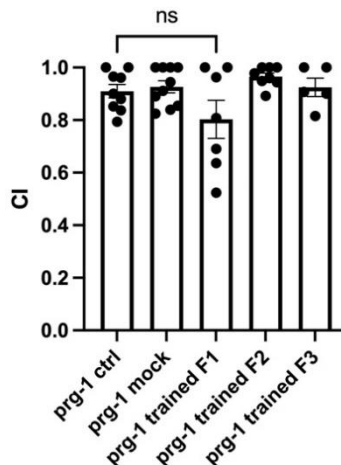


圖十五 被捕食的線蟲(N2)其子代對 10^{-5} MMB 之趨化性。(n=9~17; *p<0.05, **p<0.01)

六、*prg-1* 突變株被捕食線蟲其子代趨化性變化

從圖十五可知，跨世代趨化性改變可以影響三個世代，然而 F1~F3 子代線蟲並未事先接觸過線蟲捕捉菌，因此我們好奇此行為改變是透過何種機制達成？查詢相關文獻發現，當線蟲在攝取致病菌綠膿桿菌的小 RNA 後，小 RNA 會影響線蟲的 piRNA 路徑，進行基因靜默並影響表觀遺傳，使 P₀ 母蟲與 F1~F4 子代對致病菌的趨化性下降。我們推測，被捕線蟲與其子代可能藉由相似的 piRNA 路徑遺傳趨化性行為變化。

為驗證此猜想，我們使用 piRNA 路徑有缺陷的 *prg-1* 突變株進行被捕線蟲子代趨化性實驗，雖從圖表上來看，其 F1 子代趨化性下降，然而數據分佈差異大，在統計上並沒有顯著差異。而 F2、F3 子代趨化性與對照組相比，並沒有降低，顯示 piRNA 路徑參與在降低趨化性的機制之中。(圖十六)



圖十六 *prg-1* 突變株被捕食的線蟲其子代對 10^{-5} MMB 趨化性。(n=3~8; **p<0.01)

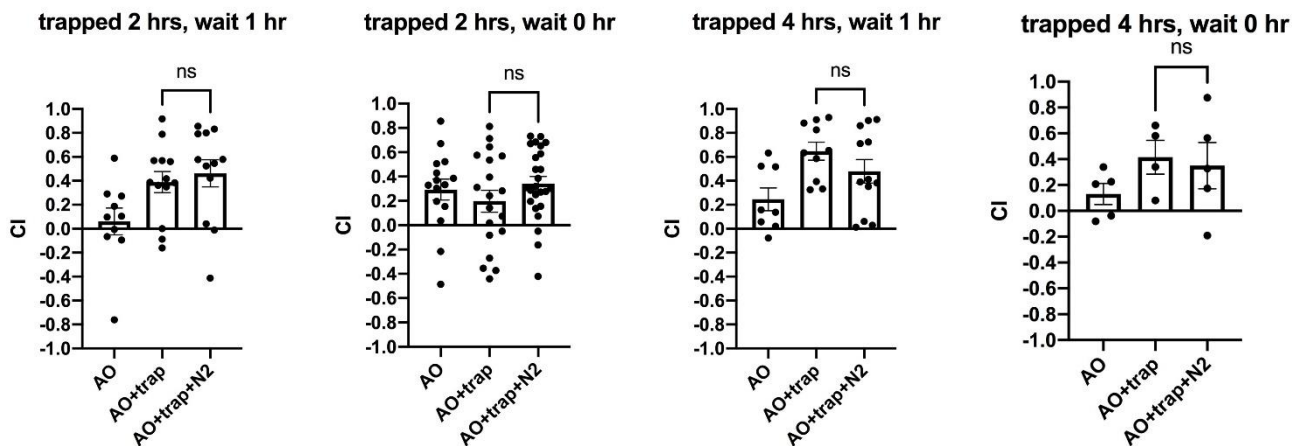
七、被捕食與未被捕線蟲間傳訊行為

被捕線蟲除了以跨世代影響子代的適應力，我們猜測線蟲是否亦存在物種間的警告信號 (alarm signal)。先前關於線蟲警告費洛蒙的研究並不多，詳細機制也尚未明瞭(Zhou et al., 2017)，我們好奇線蟲被線蟲捕捉菌捕捉後，是否會傳訊警告同伴，使其他鄰近個體遠離真菌獵食範圍，以增加族群的存活率？

實驗包含四種時間條件，分別為線蟲被捕捉 2 小時/4 小時，轉移至 Chemotaxis plate 後，未等待/等待 1 小時後進行趨化性測試，並分為單邊測試與雙邊測試兩種測試方法。

(一)單邊測試

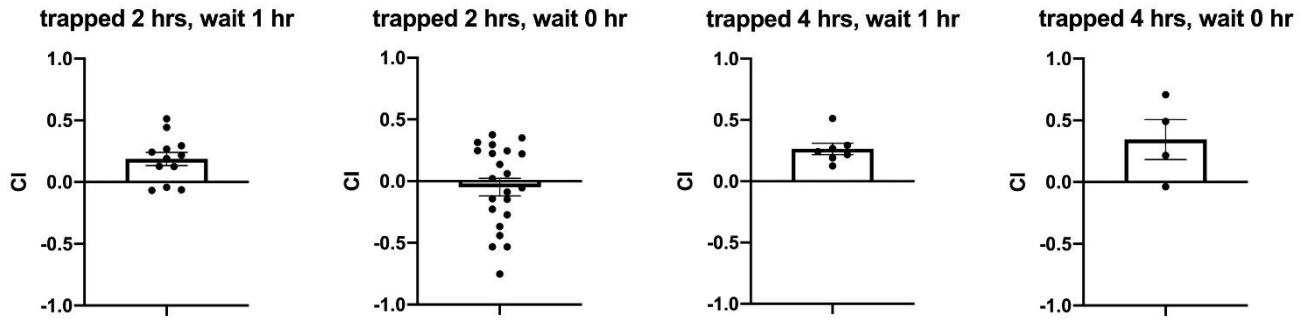
如圖十七，在四種時間條件下，*A.o.*+trap 組別和 *A.o.*+trap+N2 組別並無顯著趨化性差異，顯示被捕線蟲的存在並不影響其他自由移動線蟲的趨化性，被捕線蟲與自由移動線蟲間可能不存在強烈警告信號。



圖十七 被捕線蟲間傳訊行為之單邊測試。(n=4~25)

(二)雙邊測試

雙邊測試實驗更直接地比較自由移動線蟲對於被捕食的線蟲是否有趨化性偏好。如圖十八，在四種時間條件下，CI 值皆接近 0，表示自由移動線蟲對於 *A.o.*+trap 和 *A.o.*+trap+N2 兩組並無明顯偏好差異，此結果不支持被捕線蟲與未被捕線蟲間存在警告信號之假說，與單邊測試所得的結論一致。



圖十八 被捕線蟲間傳訊行為之雙邊測試。(n=4~22)

肆、討論

一、*A. oligospora* 與線蟲的交互作用

A. oligospora 與線蟲分別屬於真菌界與動物界，親緣關係遙遠。然而 *A. oligospora* 具有線蟲費洛蒙氣味的受器，而線蟲亦具有感受真菌所分泌的氣味分子(如 MMB)的神經元，分屬不同界的兩物種竟互相具有彼此化學分泌物的受器，顯示線蟲與線蟲捕捉菌之間可能存在共同演化關係，長期演化出多樣的機制以適應彼此施加的生存壓力。

二、線蟲捕捉菌捕捉發展捉蟲陷阱之條件

在實驗中的觀察我們發現，線蟲捕捉菌僅會在低營養環境與線蟲出現兩條件皆符合的情況下才會生成捕蟲陷阱，配合文獻可以發現，線蟲捕捉菌捕食線蟲是為了補充氮源碳源等養分，因此線蟲捕捉菌演化出此機制，減低不必要的能量消耗，以獲得最大的效益。(Niu et al., 2011)

在野外，*A. oligospora* 時常生長在低營養的環境下，因此演化出獵食線蟲的能力，以增加營養來源。因此我們好奇在線蟲與線蟲捕捉菌彼此所建立的獵食者-獵物關係下，線蟲會發展什麼適應性策略，以面對來自獵食者真菌的獵食壓力。

三、線蟲與線蟲捕捉菌共同培養下生長速率變化

根據先前的文獻，掠食者的存在可能會改變獵物的生理狀態，例如加速獵物的生長週期等(Walsh et al., 2015)。在生長速率實驗中，我們發現僅有暴露於 MMB 的線蟲其生長速率較對照組慢，而與線蟲捕捉菌共同培養的線蟲則否。推測在共同培養環境下，MMB 濃度較低，因此

未能造成線蟲生長速率改變。另一方面，目前已有研究發現，L1 幼蟲對線蟲捕捉菌趨化性較低 (Hsueh et al., 2017)，由此推測，線蟲可能透過降低生長速率延長停留在幼蟲階段的時間，減少被捕捉的機會，以利族群的延續。

四、共同培養與被捕食子代之育雛數變化

本研究發現線蟲在經過與線蟲捕捉菌共同培養後，並沒有顯著改變其個體的子代繁殖數量；被線蟲捕捉菌捕捉後其子代繁殖數量亦無顯著改變。因此初步推測，線蟲並非透過增加育雛數的方式來提高族群的適應性。

五、被捕食的線蟲子代之趨化性變化

我們猜想，直接讓線蟲被線蟲捕捉菌的陷阱捕捉，是否更能訓練線蟲使其提高適應力？由於被捕捉的線蟲會死亡，我們無法測得 P_0 母蟲的適應力，但 P_0 或許能將線蟲捕捉菌的生存壓力信號，透過某些機制影響子代的行為，提升子代的適應力。因此我們設計實驗，讓線蟲被陷阱捕捉以訓練 P_0 線蟲，並以適性測驗觀察被捕線蟲子代的各項特徵變化。

在趨化性測試中，可以看到 N2 被捕線蟲的 F1 子代對真菌及其所分泌的吸引性氣味分子 MMB 的趨化性皆明顯降低，且此跨世代趨化性行為改變可以影響三個世代。透過降低子代的趨化性，可以減少被真菌吸引而落入捕蟲陷阱的機會，藉此逃離線蟲捕捉菌的獵食範圍，得以延續族群，有效地提升適應性。

六、以 *prg-1* 突變株探討被捕食線蟲跨世代趨化性改變之機制

由前面的實驗可知，跨世代趨化性改變可以影響三個世代，然而 F1~F3 子代線蟲並未事先接觸過線蟲捕捉菌，我們好奇此行為改變是透過何種機制達成？

由於線蟲被捕捉 4 小時後，線蟲捕捉菌的菌絲會刺穿線蟲體壁，生長進入線蟲體內，並分泌多樣的物質包含小分子有機物、蛋白質、多肽、小 RNA 等，引發線蟲的免疫反應，線蟲亦分泌多樣的化學物質作為刺激的回應，當線蟲捕捉菌的陷阱捕捉到線蟲，化學物質頻繁的交流，此過程很可能進一步影響線蟲子代的適應性。

有研究發現，線蟲在攝取致病菌綠膿桿菌的小 RNA 後，致病菌對線蟲的吸引力會下降，且此效應會透過表觀遺傳的方式影響四個世代。其機制為利用 piRNA 路徑影響表觀遺傳，調控子代的基因表現(Kaletsky et al., 2020)。故我們猜測，在線蟲捕捉菌捕捉線蟲後，線蟲可透過類

似的機制，藉由菌絲分泌的小 RNA 並以 piRNA 路徑改變其子代的基因表現，降低趨化性。

因此我們使用 piRNA 路徑有缺陷的 *prg-1* 突變株進行被捕線蟲子代趨化性測試實驗，從圖表發現 F1 子代趨化性下降，然而此變化無法延續至 F2 子代。由於線蟲在製造卵子時會直接將生殖腺附近的物質包入卵中，當線蟲捕捉菌菌絲分泌的小 RNA 直接注入 P₀ 線蟲生殖腺時，P₀ 線蟲可能將這些小 RNA 也包入卵中，小 RNA 直接對 F1 子代進行基因靜默，並影響其趨化性，因此 *prg-1* 訓練後的 F1 子代趨化性仍然降低。然而 F1 子代並未直接與線蟲捕捉菌接觸，因此真菌的小 RNA 無法對 F2 子代進行基因靜默。F2 子代的趨化性改變，可能是透過 F1 子代生殖腺 piRNA 路徑進行表觀遺傳，而缺乏 piRNA 路徑的 *prg-1* 突變株，其 F2、F3 便無法遺傳 F1 的行為改變，因此趨化性與對照組相比並未下降。

然而 *prg-1* F1 子代趨化性分佈範圍並不一致，數據點分布範圍廣，且數據並不多，因此與對照組的趨化性相比，並未在統計上呈現顯著差異。未來我們會再重複此實驗，以確認被捕 *prg-1* 的 F1 子代其趨化性是否會下降。

七、野生株與 N2 線蟲株的比較

從生態棲位可以發現多數線蟲與線蟲捕捉菌同域存在，我們好奇其他 *C. elegans* 野生株線蟲比起實驗室 N2 模式線蟲株，是否會對線蟲捕捉菌有更好的適應力？

TWN2542 為野外採集時和 *A. oligospora* 共同分離之線蟲株。無論在與線蟲捕捉菌共同培養或是受捕線蟲其子代適性測驗的育雛數實驗中，其育雛數皆顯著少於 N2，趨化性顯著低於 N2，推測這可能是 TWN2542 在演化上權衡(trade-off)的結果。

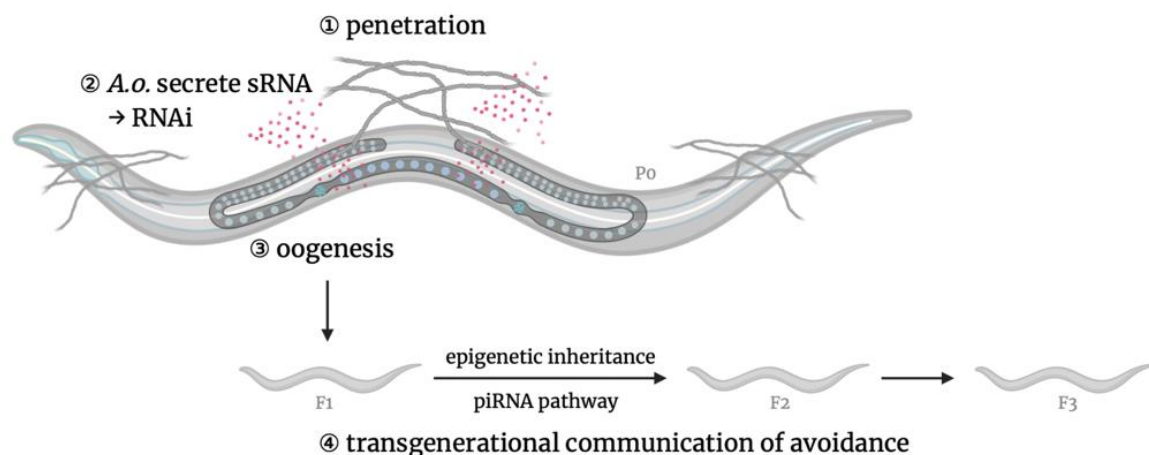
而在 TWN2542 的趨化性測試中，訓練後的子代趨化性與對照組相比並未有顯著差異，推測某些調控趨化性的基因在野生株線蟲中，可能已突變或不表現，因此造成對真菌氣味分子有較低的趨化性，同時也使得訓練後基因靜默效應不如 N2 線蟲明顯，因此訓練後子代與對照組或模擬組相比均未有明顯降低的趨化性。

伍、結論與應用

本研究以線蟲與線蟲捕捉菌之系統探討獵食者-獵物共演化(predator-prey coevolution)，欲了解獵食者對獵物行為表現之影響及其分子路徑。研究中利用模式生物 *C. elegans*，作為探討獵食關係分子機制之簡化模型，屬新穎之研究方式。透過探討育雛數、生長速率與趨化性等適應力指標，試圖了解線蟲應對線蟲捕捉菌獵食壓力所發展出之適應策略。

從實驗結果初步判斷，當線蟲接觸真菌所分泌的吸引力氣味分子 MMB，會降低生長速率，藉此提高適應力。此外，當線蟲受到線蟲捕捉菌的陷阱捕捉後，會降低持續三個世代的子代線蟲對真菌的趨化性，並透過 piRNA 路徑參與此行為改變。

目前已發現此系統中，獵食者真菌 *A. oligospora* 可造成其獵物線蟲的行為改變。未來將試圖從分子生物學角度探討其路徑，增進獵食者-獵物共演化與線蟲-線蟲捕捉菌系統之認識。



圖十九 被捕線蟲跨世代趨化性行為改變機制。①當線蟲被線蟲捕捉菌陷阱捕捉後，真菌菌絲會刺穿線蟲體壁(cuticle)並生長進入線蟲體內。②線蟲捕捉菌菌絲分泌小 RNA，可以對線蟲基因進行 RNAi。③ P_0 線蟲在卵子生成時將真菌所分泌的小 RNA 包入卵中，小 RNA 直接對 F_1 子代線蟲進行基因靜默，改變 F_1 子代的行為表現。④ F_1 子代生殖腺以 piRNA 路徑進行表觀遺傳，造成 F_2 與 F_3 子代的趨化性改變。

陸、參考文獻

1. Batista, P. J., Ruby, J. G., Claycomb, J. M., Chiang, R., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Chaves, D. A., Gu, W., Vasale, J. J., Duan, S., Conte, D., Jr, Luo, S., Schroth, G. P., Carrington, J. C., Bartel, D. P., & Mello, C. C. (2008). PRG-1 and 21U-RNAs interact to form the piRNA complex required for fertility in *C. elegans*. *Molecular cell*, *31*(1), 67–78.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.002>
2. Chris, M. & Dietmar, S. (2010). Histone tales: Echoes from the past, prospects for the future. *Genome biology* 11:105. DOI:10.1186/gb-2010-11-2-105
3. Gray, NF. (1987) Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. *Biol Rev Cambridge Philosophic Soc* **62**:245-304.
4. Hsueh, Y. P., Gronquist, M. R., Schwarz, E. M., Nath, R. D., Lee, C. H., Gharib, S., Schroeder, F. C., & Sternberg, P. W. (2017). Nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* mimics olfactory cues of sex and food to lure its nematode prey. *eLife* 6:e20023. DOI:10.7554/eLife.20023
5. Jaffee, BA. (2004) Wood, nematodes, and the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Soil Biology and Biochemistry* **36**(7):1171-1178.
6. Kaletsky, R., Moore, R. S., Vrla, G. D., Parsons, L.R., Gitai, Z. & Murphy C. T. (2020). *C. elegans* interprets bacterial non-coding RNAs to learn pathogenic avoidance. *Nature* 586:445–451. DOI:10.1038/s41586-020-2699-5
7. Kuo, T. H., Yang, C. T., Chang, H. Y., Hsueh, Y. P., & Hsu, C. C. (2020). Nematode-trapping fungi produce diverse metabolites during predator–prey interaction. *Metabolites* 10:117. DOI:10.3390/metabo10030117
8. Niu, X. M. & Zhang, K. Q. (2011). *Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. *Mycology* 2:59-78. DOI: 10.1080/21501203.2011.562559
9. Remy, J. J., & Hobert, O. (2005). An interneuronal chemoreceptor required for olfactory imprinting in *C. elegans*. *Science* 309:787–790. DOI:10.1126/science.1114209
10. Ulzurrun, GVD., and Hsueh, YP. (2018) Predator-prey interactions of nematode-trapping fungi and nematodes: both sides of the coin. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**:3939–3949.
11. Van Den Hoogen, J., Geisen, S., Routh, D. *et al.* Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* **572**, 194–198 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1418-6>

12. Walsh, M. R., Cooley, F., Biles, K., & Munch, S. B. (2015). Predator-induced phenotypic plasticity within- and across-generations: a challenge for theory?. *Proceedings Biological sciences* 282:20142205. DOI:10.1098/rspb.2014.2205
13. Xu, T., Xu, M., Lu, Y., Zhang, W., Sun, J., Zeng, R., Turlings, T., & Chen, L. (2021). A trail pheromone mediates the mutualism between ants and aphids. *Current biology* 31:4738–4747. DOI:10.1016/j.cub.2021.08.032
14. Yang, C. T., Vidal-Diez de Ulzurrun, G., Gonçalves, P., Lin, H. C., Chang, C. W., Huang, T. Y., Chen, S. A., Lai, C. K., Tsai, I., Schroeder, F., Stajich, J., & Hsueh, Y. P. (2020). Natural diversity in the predatory behavior facilitates the establishment of a new robust model strain for nematode-trapping fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117:6762-6770. DOI:10.1073/pnas.1919726117
15. Zhou, Y., Loeza-Cabrera, M., Liu, Z., Aleman-Meza, B., Nguyen, J. K., Jung, S. K., Choi, Y., Shou, Q., Butcher, R. A., & Zhong, W. (2017). Potential nematode alarm pheromone induces acute avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 206:1469–1478.

【評語】 050001

1. 此研究為以模式生物線蟲為材料，在線蟲捕捉菌 *Arthrobotrys oligospora* 獵食壓力下之適應性，研究架構設計完整。邏輯清楚聚焦，具原創性方法可行，了解線蟲與線蟲捕捉菌獵食關係可做為未來提高植病生物防治效率。
2. 報告中分別使用共演化和共同演化二名詞，請統一，並請說明共演化的定義。
3. 在樣本重複數部分，圖 11、14、16、17、18 樣本數偏差大，且在樣本數小的分組中，資料分散度大，例如圖 18 之 trapped 4hrs, wait 0 hr, 其 CI 值 4 數值偏差過大，此部分需要說明，未來須重新進行實驗以達可統計顯著性數據資料。
4. 在前言中對於 *Arthrobotrys oligospora* 專一分泌吸引性氣味分子 methyl 3-methyl-2-butenate (MMB) 未有說明，實驗中出現此部分在連結上不清楚，宜加以說明。
5. 討論第一部分的 *A. oligospora* 與線蟲的交互作用提及：「*A. oligospora* 具有線蟲費洛蒙氣味的受器，而線蟲亦具有感受真菌所分泌的氣味分子(如 MMB)的神經元，…」，此部分在

此實驗中需要說明由何種證據證明。或若是由文獻資訊得知，請引用文獻資料。

6. 應增加線蟲陷阱的實驗數值資料，例如線蟲經過陷阱後速度改變情形，將清楚顯示真菌線蟲陷阱的效果。
7. piPNA 部分現階段屬於推測，宜有未來設計規畫部分。