

# 利用 rDNA-RFLP 技術鑑識台灣常見 劍線蟲屬植物病原線蟲

倪蕙芳<sup>1</sup> 程永雄<sup>1</sup> 陳瑞祥<sup>2</sup> 蔡東纂<sup>3</sup> 陳殿義<sup>4,5</sup>

1 行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所

2 國立嘉義大學生物科技研究所

3 國立中興大學植物病理學系

4 行政院農業委員會農業試驗所

5 聯絡作者：電子郵件 dychen@wufeng.tari.gov.tw，傳真：+886-4-23338162

接受日期：中華民國92年9月23日

## 摘要

倪蕙芳、程永雄、陳瑞祥、蔡東纂、陳殿義, 2003. 利用 rDNA-RFLP 技術鑑識台灣常見劍線蟲屬植物病原線蟲. 植病會刊12:235-241.

本研究分別利用 *Xiphinema* spp. 及 *Belonolaimus* spp. 核糖體 DNA 18S 和 5.8S 基因序列，設計用以增幅核糖體 DNA 非轉錄區間 ITS1 之 PCR 通用性引子對，分析台灣地區常見之劍線蟲屬 (*Xiphinema* spp.) 植物病原線蟲核糖體 DNA 之差異，結果發現本省常見劍線蟲中形態特徵屬於 *X. americanum* 群中之四個種 [*X. diffusum* (Xdi)、*X. oxycaudatum* (Xoxy)、*X. brevicollum* (Xbre)、*X. incognitum* (Xin)] 增幅所得之 ITS1 大小約在 850-900 bp 之間；而 *X. brasiliense*、*X. insigne* 與 *X. elongatum* 之 ITS1 片段長度則皆大於 1 kb。進一步利用限制酵素片段長度多型性 (RFLP) 技術分析 *X. americanum* 群核糖體 DNA 之 ITS1 片段，顯示經 *Msp*I、*Cfo*I、*Dde*I 或是 *Hin*fI 四種限制酵素酵解後，不僅 Xdi、Xoxy 之限制酵素切割片段差異明顯外，其與 Xbre 和 Xin 之限制酵素圖譜亦有相當大的差異性，而 Xbre 與 Xin 則利用上述酵素作用後其圖譜均完全一致，無法鑑別，利用 *Acc*I 限制酵素作用後，則可將 Xin 酵解為 160 bp 及 770 bp 兩片段，而 Xbre 則未具有 *Acc*I 酵素切位；因此利用 *Acc*I 可以進一步區別 Xbre 及 Xin 兩個種之劍線蟲。由本研究結果發現，利用 *Cfo*I、*Msp*I、*Dde*I 或 *Hin*fI 配合 *Acc*I 等限制酵素之作用，可以成功鑑別本省常見而不易以形態鑑識的 *X. diffusum*、*X. incognitum*、*X. brevicollum* 及 *X. oxycaudatum* 等四種劍線蟲，而未來更可進一步將此 rDNA-RFLP 技術應用在植物病原線蟲之鑑別與檢測。

關鍵詞：聚合酵素連鎖反應 限制酵素片段長度多型性、劍線蟲、核糖體 DNA、非轉錄區間、分類

## 緒言

劍線蟲屬 (*Xiphinema* spp.) 植物病原線蟲屬於植物外部寄生性線蟲，已知其寄主包含草莓<sup>(20)</sup>、木莓<sup>(15)</sup>、核果類<sup>(26)</sup>、葡萄<sup>(19)</sup> 以及多種草本植物與雜草<sup>(22)</sup> 等。本屬線蟲之齒針延伸部 (odontophore) 特別發達，其基部鏢 (basal flanges) 膨大明顯，而導環 (guide ring) 則位於功能性齒針 (functional odontostyle) 之底部<sup>(1)</sup>。劍線蟲取食之部位多在幼嫩組織及生長旺盛的組織頂端，除了造成根系生長不良亦會造成地上部整株出現生長緩慢，葉片變小或變色黃化，表現出營養缺乏或水份不足等徵狀，但是由於病徵之出現多較為溫和緩慢，故常被輕忽<sup>(1)</sup>。有關本屬線蟲之研

究過去不論國內外大多著重於調查線蟲之分佈情形，極少探討其對植物的危害程度及對農業生產所造成之損失，然而已知本屬線蟲具有傳播植物病毒之能力，如其所傳播之 nepovirus 可以在果樹及葡萄上造成重大之危害，如葡萄扇葉病毒 (Grapevine fan leaf virus; GFLV) 便可經由劍線蟲之傳播而導致全球葡萄產業重大經濟損失<sup>(3,7,22)</sup>，因此建立本屬線蟲在台灣之存在種類、分佈及寄主範圍等相關資料，應可作為未來擬定防治策略之基本依據。

陳氏<sup>(1)</sup> 過去已經調查台灣地區之主要果樹園受線蟲之感染情形，發現外部寄生性線蟲種類以劍線蟲 (*Xiphinema* spp.) 及鞘線蟲 (*Hemiconemoides* spp.) 為最重要，其中劍線蟲種類經形態特徵初步分類後認為有 *X. diffusum*、*X.*

*incognitum*、*X. oxycaudatum*、*X. brevicollum*、*X. insigne*、*X. elongatum* 以及 *Xiphinema brasiliense* 等七種，其中前四種以目前線蟲之分類標準均屬於 *Xiphinema americanum* group。有關 *Xiphinema americanum* group 線蟲種間之鑑定方式大多仍是依照如體長、陰門及口針長度等來做為分類之依據<sup>(13)</sup>，然而在鑑定之過程中仍常因其形態特徵過於接近而導致此些型態測量值範圍出現明顯重疊之情形，因此其有關之分類地位仍爭議不斷<sup>(10)</sup>。Luc 等人認為 *X. diffusum*、*X. incognitum* 及 *X. brevicollum* 這三個種是同種異名 (synonym)<sup>(14)</sup>，然而 Lamberti 等人則認為按照其形態可以歸類成不同的三個有效種<sup>(11)</sup>。由於本屬線蟲對環境狀態極為敏感，因此若欲利用其生理或生態的數據來進行種間之區分勢必有其限制性，因此開發新的鑑定技術輔助形態鑑定之結果確有其必要性。

應用生物技術解決植物病原線蟲診斷鑑定之問題近年來已廣受重視<sup>(4,8,16,17,18,24,25)</sup>，其中以利用核糖體 DNA-RFLP 的技術做為分子診斷鑑定及遺傳變異分析工具為時下常用且值得信賴之方式。核糖體 RNA (rRNA) 可轉錄之密碼序列中，包含 18S、5.8S 及 26S rRNA 等三基因，其中 5.8S rRNA 基因分別與 18S 及 26SrRNA 基因間各有一個內轉錄間區 (internal transcribed spacer, ITS)，在 rDNA 序列結構中，在 18S、5.8S 及 26S rRNA 基因序列，於不同物種間，亦保持相當一致；但在 ITS 的區域中，其長度及序列則常有很大的變異，因此可應用於不同種間分類上之探討。而核酸限制酵素片段長度多型性 (RFLP) 技術則是將測試核酸以特定認知 4-6 個核苷酸序列之酵素酵解後，分析所獲得之限制酵素圖譜多型性，藉以做生物種間或種內之判別及類緣關係之探討。有關利用 rDNA 分子鑑定方式應用在劍線蟲屬線蟲之研究有 De Giorgi 等人<sup>(6)</sup> 曾利用

PCR 方式增幅 *Xiphinema* spp. 之 26S 核糖體 DNA 的 5' 端核酸片段；另外 Varin 等人<sup>(23)</sup> 將 *Xiphinema bricolensis* 之 18S 及 26S 核糖體 DNA 基因與 *C. elegans* 之核糖體 DNA 基因比較後，設計可以增幅變異性區域 ITS 之共通性引子，並分析由美國及加拿大所分離而得之 16 個劍線蟲族群之 RFLP 圖譜，此外 Knoetze 等人<sup>(9)</sup> 也應用類似之方式分析南非所發現的劍線蟲族群的核糖體 DNA 之 RFLP 圖譜，並藉以探討此種的鑑定方式。本研究利用 PCR 增幅 7 種劍線蟲的核糖體 DNA 之非轉錄區 ITS1 區域，除比較其長度大小外並輔以 RFLP 技術做為鑑別台灣劍線蟲 *Xiphinema americanum* group 之工具。

## 材料與方法

### 一、供試線蟲之族群來源

主要針對台灣地區之多年生果樹園區採集根圈土樣，以改良式柏門氏漏斗分離法<sup>(2)</sup> 分離線蟲。經 24 小時的靜置分離後，以玻璃吸管吸取懸浮液中的成蟲和幼蟲至 3% 的福馬林溶液中殺死、固定及保存，以供後續形態鑑定所需。此一研究之劍線蟲種類包括 *X. brevicollum* Lordello & Da Costa, 1961; *X. incognitum* Lamberti & Bleve-Zacheo, 1979; *X. diffusum* Lamberti & Bleve-Zacheo, 1979; *X. oxycaudatum* Lamberti & Bleve-Zacheo, 1979; *X. insigne* Loos, 1949; *X. elongatum* Schuurmans Stekhoven & Teunissen, 1938 及 *X. brasiliense* Lordello, 1951 等共計 7 種。關於各供試線蟲群之來源地區和寄主植物種類的資料詳如表一所列。

表一、本研究劍線蟲族群的簡稱、來源地區及寄主

Table 1. *Xiphinema* populations investigated in this study

Population	Species	Origin	Host
1	<i>X. diffusum</i>	Shinshe Shiang, Taichung	Pear ( <i>Pyrus pyrifolia</i> var. <i>yokoyama</i> )
2	<i>X. diffusum</i>	Shinshe Shiang, Taichung	Loquat ( <i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.)
3	<i>X. diffusum</i>	Shinshe Shiang, Taichung	Loquat ( <i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.)
4	<i>X. incognitum</i>	Dashu Shiang, Kaohsiung	Litchi ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn.)
5	<i>X. incognitum</i>	Danei Shiang, Tainan	Avocado ( <i>Persea americana</i> Mill.)
6	<i>X. incognitum</i>	Nantou City, Nantou	Sugar apple ( <i>Annona squamosa</i> L.)
7	<i>X. brevicollum</i>	Tsautuen Jen, Nantou	Sweet orange ( <i>Citrus sinensis</i> Osb.)
8	<i>X. brevicollum</i>	Shinshe Shiang, Taichung	Longan ( <i>Euphoria. longana</i> Lamarck)
9	<i>X. oxycaudatum</i>	Tianwei Shiang, Changhua	Pagoda tree ( <i>Plumeria rubra</i> L. forma <i>acutifolia</i> Wood)
10	<i>X. oxycaudatum</i>	Shanhua Jen, Tainan	Avocado ( <i>Persea americana</i> Mill.)
11	<i>X. oxycaudatum</i>	Shanshang Shiang, Tainan	Avocado ( <i>Persea americana</i> Mill.)
12	<i>X. elongatum</i>	Daya Shiang, Taichung	Bermuda-grass ( <i>Cynodon dactylon</i> Pers.)
13	<i>X. insigne</i>	Taichung City	Litchi ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn.)
14	<i>X. brasiliense</i>	Shinshe Shiang, Taichung	Loquat ( <i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.)

## 二、線蟲全量 DNA 之萃取

每一群供試線蟲主要挑取雌蟲大約 50 到 200 隻之間至微量離心管中繼而進行冷凍乾燥以抽乾所含之水份。而後加入 DNA 萃取緩衝液 (200 mM Tris-HCl, pH 8.5 ; 250 mM NaCl ; 25 mM EDTA ; 10% w/v sodium dodecylsulphate plus 0.5  $\mu$ g/ul proteinase K (Roche, Mannheim, Germany), 並靜置於 37°C 下, 作用 12-14 小時後, 再經振盪混合均勻, 於室溫下以 12,000 x g 離心 10 分鐘。將離心後之上層液取出以 DNA 純化套組 (Wizard™ DNA Clean-Up, Promega Cooperation, Madison, WI, U. S. A.) 進一步純化全量 DNA, 首先將上層液與套組中所提供之 Resin 900  $\mu$ l 混合, 而後在室溫下 (22-24°C) 作用 1 分鐘後, 以注射針筒將此混合液注入套組中所附之管柱內用以附著 DNA, 繼而以針筒將 2 ml 的 80% isopropanol 溶劑注入上述管柱中藉以去除不純物, 再以 12,000 x g 離心 2 分鐘, 去除殘存在管柱中之 isopropanol, 最後加入預熱 65°C 的蒸餾水約 25-50  $\mu$ l 於管柱中並在室溫下靜置 1 分鐘, 再以 12,000 x g 離心 20 秒, 藉以將吸附在 spin column 薄膜上的 DNA 洗出至新的微量離心管中, 最終將純化之 DNA 保存在 -20°C 下備用。

## 三、聚合酵素連鎖反應及產物回收

於 50  $\mu$ l 增幅反應液中含引子對 18S (5'TTGATTACGTCCTGCCCTTT 3')<sup>(23)</sup> 及 5.8S (5'ACGAGCCGAGTGATCCACCGATAAG3')<sup>(5)</sup> 各 1  $\mu$ M, A、T、C、G 四種 deoxyribonucleotide (dNTP) 各 0.2 mM, 一單位 (unit) *Taq* DNA polymerase (Yeastern Biotech Co. Taipei, Taiwan), 1 X *Taq* reaction buffer 及 10 ng 供試模板 DNA, 並於溫度循環控制反應器 (BioRad iCycler, Hercules, CA, U. S. A.) 中進行聚合酵素連鎖反應。反應器所設定之反應程式為: 先以 94°C 4 分鐘使雙股 DNA 分開成單股後, 再以 94°C 30 秒變性 (denaturing)、56°C 30 秒黏合 (annealing)、72°C 1 分鐘延長 (extension) 進行 30 個循環 (cycles), 最後再以 72°C 反應 7 分鐘進行 PCR 產物最後延長。反應後, 吸取 10  $\mu$ l PCR 增幅產物, 以 0.5 X TBE 緩衝液 (45 mM Tris-borate ; 1 mM EDTA, pH 8.0) 配製之 1.5% (w/v) 瓊脂凝膠 (agarose) 並以 5 V/cm 之電壓進行水平式電泳分析, 經溴化乙錠 (Ethidium bromide) 染色後, 以影像分析系統 (Gel Doc 2000, BioRad, Hercules, CA, U. S. A.), 觀察聚合酵素連鎖反應的結果。PCR 產物以 Wizard PCR preps DNA purification System (Promega Cooperation, Madison, WI, U. S. A.) 進行純化回收, 並以分光光度計 (SmartSpec™ 3000, BioRad, Hercules, CA, U. S. A.) 在 260 nm 波長下測定其吸收值並定量。

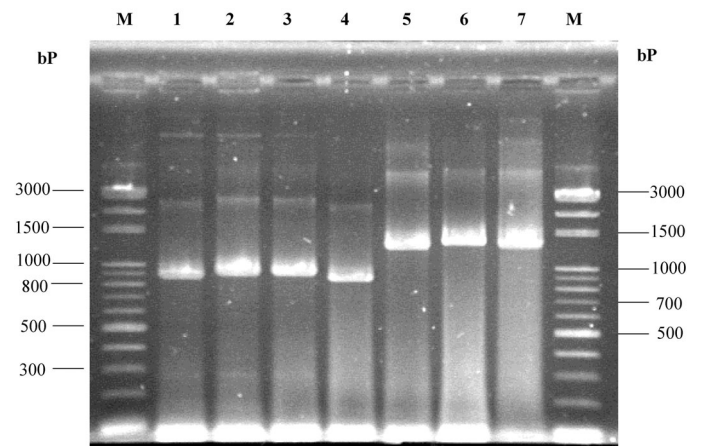
## 四、限制酵素片段長度多型性圖譜分析

經由 PCR 技術所增幅之 ITS1 片段的 PCR 回收產物, 取 1  $\mu$ g DNA 以 5 units *Hinf*I、*Alu*I、*Dra*I、*Dde*I、*Cfo*I、*Msp*I、*Taq*I 以及 *Acc*I (Promega Cooperation, Madison, WI, U. S. A.) 等限制酵素於 37°C 中作用 3 小時, 完成後置於 65°C 10 min 終止反應, 再以 0.5 X TBE 緩衝液 (45 mM Tris-borate ; 1 mM EDTA, pH 8.0) 配製之 2.5% (w/v) 瓊脂凝膠進行水平式電泳分析, 經溴化乙錠染色後, 觀察並照相記錄限制酵素片段長度多型性圖譜的結果。

## 結果

本研究利用 Cherry 及 Vrain 等人<sup>(5,23)</sup> 所述之引子對本省所分離到之劍線蟲進行核糖體 DNA ITS1 增幅之測試, 結果顯示所發現的七個種均可以增幅出 ITS1 的片段, 其大小分別為 *X. diffusum* 880 bp、*X. incognitum* 及 *X. brevicollum* 900 bp、*X. oxycaudatum* 850 bp、*X. brasiliense* 1300 bp、*X. insigne* 1400bp、*X. elongatum* 1300 bp (圖一)。其中屬於 *X. americanum* 之一群 (*Xdi*, *Xin*, *Xbre*, *Xoxy*), 其 ITS1 之長度較為相近, 約在 850-900 bp 之間。

為進一步鑑識台灣所發現的 *X. americanum* 群中形態極為相似的四個種 11 個族群 (*Xdi*, *Xin*, *Xbre*, *Xoxy*), 利用 PCR 所增幅之核糖體 ITS1 產物經 *Alu*I、*Hinf*I、*Taq*I、*Dde*I、*Msp*I、*Dra*I、*Cfo*I、*Acc*I 等 8 種限制酵素酵解後, 並以電泳分析其結果後, 發現除 *Acc*I 以外, 其餘七種限制酵素皆可酵解 *X. americanum* 群之劍線蟲 ITS1, 但是其中 *Taq*I 因酵解片段過多, DNA 電泳易成拖曳狀不易辨別



圖一、不同種劍線蟲之核糖體 DNA ITS1 片段之 PCR 增幅結果。

**Fig. 1.** PCR amplification of internal transcribed spacers 1 of *Xiphinema* spp. M: Bio-100™ DNA Ladder (PROtech); 1: *X. diffusum*; 2: *X. incognitum*; 3: *X. brevicollum*; 4: *X. oxycaudatum*; 5: *X. elongatum*; 6: *X. insigne*; 7: *X. brasiliense*.

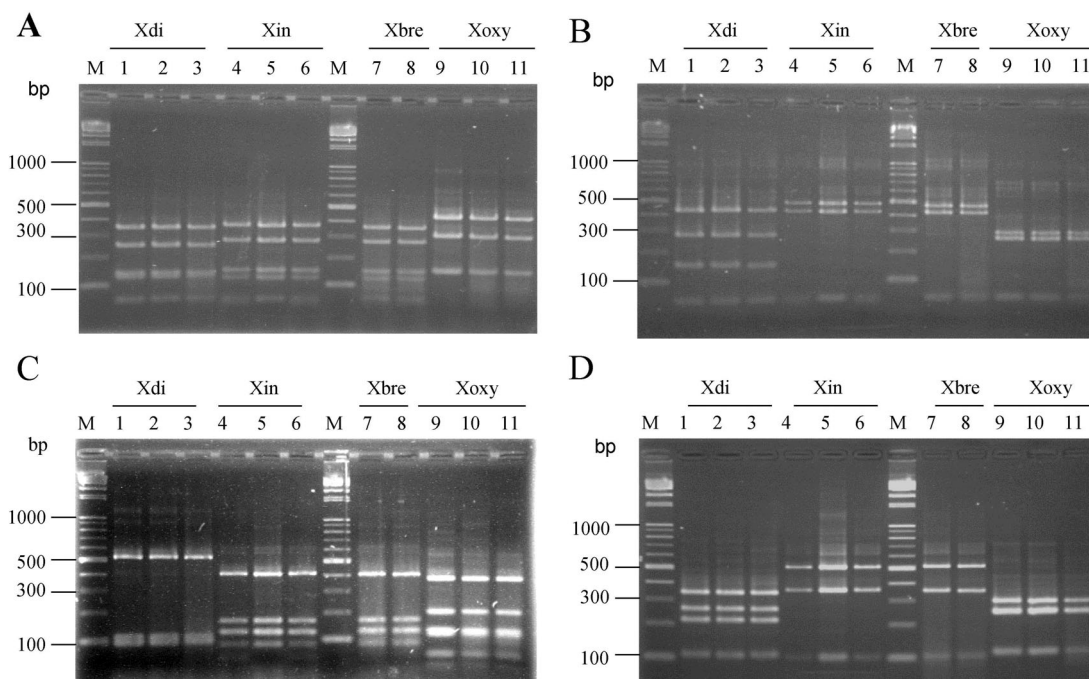
片段大小，而 *AluI* 及 *DraI* 因在各種中之酵解圖譜無多型性(結果未示出)，因此本研究以 *HinfI*、*CfoI*、*DdeI*、*MspI*、*AccI* 為主要使用之限制酵素。圖二 A、B、C、D 分別為利用 *CfoI*、*DdeI*、*HinfI*、*MspI* 將劍線蟲 rDNA ITS1 酵解後所得之電泳圖譜。*X. diffusum* 於 *CfoI* 酵素作用後可以酵解成 330、250、120、70 bp；*DdeI* 酵素作用後可以酵解成 420、260、140、50 bp；*HinfI* 酵素作用後可以酵解成 520、110、100 bp；*MspI* 酵素作用後可以酵解成 320、250、205、105 bp；*X. incognitum* 於 *CfoI* 酵素作用後可以酵解成 350、270、130、110、70 bp；*DdeI* 酵素作用後可以酵解成 460、410、50 bp；*HinfI* 酵素作用後可以酵解成 400、170、120、90 bp；*MspI* 酵素作用後可以酵解成 500、330、100 bp；*X. brevicollum* 於 *CfoI* 酵素作用後可以酵解成 350、270、130、110、70 bp；*DdeI* 酵素作用後可以酵解成 460、410、50 bp；*HinfI* 酵素作用後可以酵解成 400、170、120、90 bp；*MspI* 酵素作用後可以酵解成 500、330、100 bp；*X. oxycaudatum* 於 *CfoI* 酵素作用後可以酵解成 420、300、130 bp；*DdeI* 酵素作用後可以酵解成 280、260、50 bp；*HinfI* 370、200、120、60 bp；*MspI* 酵素作用後可以酵解成 280、250、110 bp (表二)。由試驗結果另外發現同一種之劍線蟲雖然來自不同來源其 ITS1 經同一限制酵素作用後其多型性圖譜並無差異。以上結果顯示，Xdi 與 Xoxy 及 Xin 或 Xbre 之限制酵素多型性與圖

具有相當大之差異性，而 Xbre 與 Xin 在利用上述四種限制酵素作用後其圖譜完全沒有差異。經進一步利用 *AccI* 限制酵素酵解後，發現 *X. incognitum* 具有酵素切位，可以將 ITS1 酵解為兩部份(770 bp 及 160 bp)，而 *X. brevicollum* 並不具有 *AccI* 之酵素切位(圖三)。

## 討 論

有關本研究中劍線蟲屬 rDNA ITS1 之增幅分析，為 *X. brasiliense*、*X. insigne*、*X. oxycadatum* 及 *X. brevicollum* 等種之首次報告。而經由 PCR 增幅反應所得結果發現，台灣常見的 *X. americanum* 群中之四個種 Xdi、Xoxy、Xbre、Xin 所增幅之 ITS1 大小大約為 850-900 bp 左右，與 Knoetze 等人<sup>(9)</sup> 所述 *X. americanum* 之 ITS1 大小為 900 bp 的結果相似，顯示應用初步的 ITS1 增幅大小即可將台灣結果所發現的劍線蟲屬線蟲以 ITS1 長度片段 1 kb 為基準點區分為兩群，其中 ITS1 長度 1 kb 以下者，在台灣常見的 *X. americanum* 群種(Xdi, Xoxy, Xin, Xbre) 均屬之。此外，不屬於 *X. americanum* 群的 *X. insigne*、*X. elongatum* 及 *X. brasiliense* 的 ITS1 片段均大於 1 kb。

*X. americanum* Cobb 1913 是 *Xiphinema* 屬線蟲之模式種 (type species)，由於許多和此種劍線蟲形態特徵極為類似的種類在全世界陸續發表，但是其形態測量值

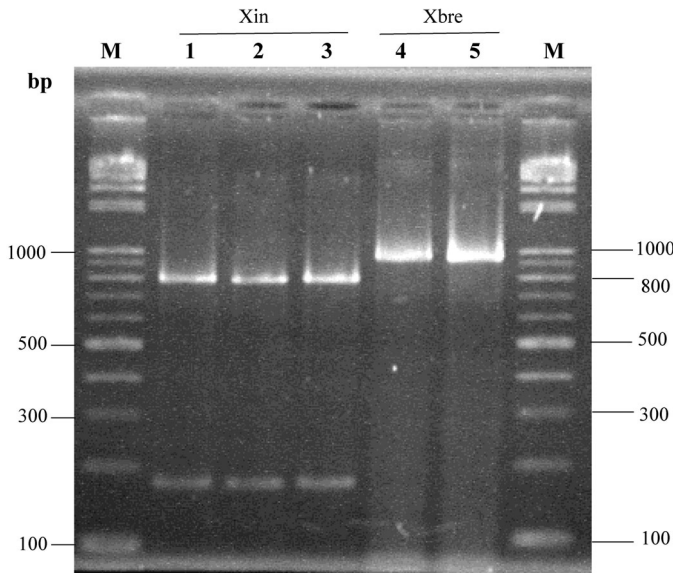


圖二、劍線蟲 *Xiphinema americanum* group 核糖體 ITS1 片段經限制酵素酵解之多型性圖譜。

**Fig. 2.** Restriction fragment length polymorphisms of the PCR-amplified rDNA ITS1 region of *Xiphinema americanum* group. A: *CfoI*; B: *DdeI*; C: *HinfI*; D: *MspI*. Xdi: *X. diffusum* (Lanes 1-3); Xi: *X. incognitum* (Lanes 4-6); Xbre: *X. brevicollum* (Lanes 7-8); Xoxy: *X. oxycadatum* (Lanes 9-11). Numbers Correspond to Isolate Numbers in Table 1. M: Bio-100™ DNA Ladder (PROtech).

表二、*Xiphinema americanum* 群劍線蟲之核糖體 DNA ITS1 經限制酵素酵解後之 DNA 片段大小Table 2. DNA fragment size (bp) obtained after endonuclease digestion of the ITS1 regions of rDNA from four *Xiphinema* spp. belongs to *X. americanum* group

Enzymes	Nematode species			
	<i>X. diffusum</i>	<i>X. oxycaudatum</i>	<i>X. brevicollum</i>	<i>X. incognitum</i>
<i>CfoI</i>	330, 250, 120, 70	420, 300, 130	350, 270, 130, 110, 70	350, 270, 130, 110, 70
<i>DdeI</i>	420, 260, 140, 50	280, 260, 50	460, 410, 50	460, 410, 50
<i>HinfI</i>	520, 110, 100	370, 200, 120, 60	400, 170, 120, 90	400, 170, 120, 90
<i>MspI</i>	320, 250, 205, 105	280, 250, 110	500, 330, 100	500, 330, 100
<i>AccI</i>	---	---	----	770, 160

圖三、劍線蟲 *Xiphinema incognitum* 及 *Xiphinema brevicollum* 之核糖體 DNA ITS1 片段經 *AccI* 限制酵素酵解後之圖譜。

**Fig. 3.** Restriction fragments of amplified internal transcribed spacers 1 of *Xiphinema incognitum* (Xin, Lanes 1-3) and *X. brevicollum* (Xbre, Lanes 4-5). M: Bio-100TMDNA Ladder (PROtech).

(morphometrics) 範圍大多有不同程度之重疊情形，如何辨別各別不同種間之差異性實有其困難度，因此 Tarjan 特別提出 *X. americanum* group 此一集合性名詞，藉以表明屬於這群之劍線蟲在許多分類問題上的複雜性<sup>(21)</sup>。而在台灣所發現之 *X. americanum* 群中的四個種也因形態特徵極為相近，不易區分，如 *X. incognitum* 與 *X. brevicollum* 其主要差異在於雌蟲體長、陰門位置及口針長度等，但兩種間之測量值仍同樣有部份重疊之情形。Luc 等人<sup>(13,14)</sup> 甚至認為這些種的劍線蟲形態彼此過於接近，因而將其都歸類為 *X. brevicollum* 之同種異名。本研究為了解決此群劍線蟲鑑定上之困擾，同時佐證此四種劍線蟲形態鑑定之正確性及確立種內變化之範圍，因而進一步利用 RFLP 技術嘗試加以區分鑑識。本研究中測試八種常用的核酸限制酵素，結果發現利用 *MspI*、*CfoI*、*DdeI* 或是 *HinfI* 等四種限

制酵素酵解 ITS1 片段後，Xdi、Xoxy 間之限制酵素圖譜多型性有極大之差異，同時與 Xbre 或 Xin 之限制酵素圖譜亦有相當大的差異性，但是 Xbre 與 Xin 可能核酸序列上比較相近，因此利用上述酵素作用後其圖譜均完全一致，無法分開。而另一限制酵素 *AccI*，則可將 Xin 的 ITS1 酵解為 160 bp 及 770 bp 兩片段，顯示其 ITS1 具有一個 *AccI* 酵素切位，而 Xbre 之 *AccI* 限制酵素圖譜則仍顯示 ITS1 之全長大小(約 900 bp)，顯示其未具有 *AccI* 酵素切位，因此利用 *AccI* 可以進一步鑑別 Xbre 及 Xin 兩個種之劍線蟲。藉由本試驗之結果所發現酵素酵解後之 ITS1 限制酵素多型性圖譜後，Xdi 與 Xoxy 及 Xbre 或 Xin 間差異極大，顯示其在核酸序列上應有相當大之差異性；至於 Xbre 與 Xin 間之關係雖然在形態上可以比較出些微之差異，然而在 RFLP 之結果上，至目前為止僅得 *AccI* 限制酵素切位之差異，其兩者是否應歸屬同一種或不同種則有待全長 rDNA 序列解序後，再配合形態特徵加以進一步闡明。由本研所得的結果明確顯示，利用 *CfoI*、*MspI*、*DdeI* 或 *HinfI* 配合 *AccI* 之限制酵素共同分析應該可以鑑別台灣常見的 *X. diffusum*、*X. incognitum*、*X. brevicollum* 及 *X. oxycaudatum* 四種劍線蟲，此四種線蟲雖然形態極為相似，但是其在 ITS1 仍有其歧異性，本結果更可以與形態鑑定結果互相配合，以達鑑定之準確性，未來除更進一步了解全長 rDNA 之序列以進行本省劍線蟲間的親源關係探討外，並擬針對單一隻線蟲之檢測進行發展，更期待進一步將此技術應用在其它植物病原線蟲之檢定方法上，以做為本省監控特定疫病線蟲之參考資訊。

## 謝辭

本研究承行政院農業委員會 92 農科-1.8.2-農-C1 經費補助，王美華小姐協助試驗工作，謹此致謝。

## 引用文獻

1. 陳殿義. 1998. 外部寄生性線蟲病原之鑑定與病害診斷. 125-131 頁. 種苗技術檢查技術訓練講義(線蟲之鑑定).

- 蔡東纂編 185 頁。
2. 黃炤雄、蔡雲鵬、林奕耀、杜金池、黃修斌 1972. 臺灣植物寄生線蟲 中研院植研所專刊第一號 61 頁。
  3. Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology, 4th edition. Academic Press, San Diego. 803pp.
  4. Burrows, P. R. 1990. The use of DNA to identify plant parasitic nematodes. Helminth. Abstr. 59:1-8.
  5. Cherry, T., Szalanski, A. L., Todd, T. C., and Powers, T. O. 1997. The internal transcribed spacer of *Belonolaimus* (Nematoda: Belonolaimidae). J. Nematol. 29:23-29.
  6. De Giorgi, C., Finetti, S. M., Di Vito, M., and Lamberti, F. 1992. A fragment of the large subunit of the rRNA gene amplified by polymerase chain reaction in individual nematodes. Nematol. Medit. 20:149-152.
  7. Hewitt, W. B., Raski, D. J., and Goheen, A. C. 1958. Nematode vector of soil-borne fan leaf virus of grapevines. Phytopathology 48:586-595.
  8. Hyman, B., and Powers, T. 1991. Integration of classical and molecular approaches in nematode taxonomy. Ann. Rev. Phytopath. 29:89-107.
  9. Knoetze, R., burger, J. T., and Meyer, A. J. 2000. Discrimination of some *Xiphinema* species from South Africa by rDNA-RFLP analysis. African Plant Protection 6:25-30.
  10. Lamberti, F., and Bleve-Zacheo, T. 1979. Studies on *Xiphinema americanum sensu lato* with description of 15 new species (Nematoda, Longidoridae). Nematol. Medit. 7:51-106.
  11. Lamberti, F., Ciancio, A., Agostinelli, A., and Coiro, M. I. 1991. Relationship between *Xiphinema brevicollum* and *X. diffusum* with a redescription of *X. brevicollum* and descriptions of three new species of *Xiphinema* (Nematoda: Dorylamida). Nematol. Medit. 19:311-326.
  12. Lamberti, F., Molinari, S., Moens, M., and Brown, D. J. F. 2000. The *Xiphinema americanum* group. I. Putative species, their geographic occurrence and distribution, and regional polytomous identification keys for the group. Russian J. Nematol. 8:65-84.
  13. Luc, M., and Baujard, P. 2001. On specific determination within the *Xiphinema americanum* group (Nematoda: Longidoridae). Nematology 3:727-728.
  14. Luc, M., Coomans, A., Loof, P. A. A., and Baujard, P. 1998. The *Xiphinema americanum*-group (Nematoda: Longidoridae). 2. Observations on *Xiphinema brevicollum* Lordello & da Costa, 1961 and comments on the group. Fundam. Appl. Nematol. 21:475-490.
  15. McElroy, F. D. 1972. Studies on the host range of *Xiphinema bakeri* and its pathogenicity to raspberry. J. Nematol. 4:16-22.
  16. Molinari, S., Luca, F. D., Lamberti, F., and Giorgi, C. D. 1997. Molecular methods for the identification of Longidorid nematodes. Nematol. Medit. 25:55-61.
  17. Orui, Y. 1996. Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. Appl. Entomol. Zool. 31:505-514.
  18. Powers, T. O., and Harris, T. S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. J. Nematol. 25:1-6.
  19. Raski, D. J., and Krusberg, L. R. 1984. Nematode parasites of grapes and other small fruits. In: Plant and Insect Nematodes. p. 457-506. (W. R. Nickle, ed.) Marcel Dekker, New York.
  20. Schindler, A. F., and Braun, A. J. 1957. Pathogenicity of an ectoparasitic nematode *Xiphinema diversicaudatum* in strawberries. Nematologica. 2:91-93.
  21. Tarjan, A. C. 1969. Variation within the *Xiphinema americanum* group (Nematoda: Longidoridae). Nematologica 15:241-252.
  22. Thomas, P. R. 1970. Host status of some plants for *Xiphinema diversicaudatum* (Micol.) and their susceptibility to viruses transmitted by this species. Ann. Appl. Biol. 65:169-178.
  23. Vrain, T. C., Wakarchuk, D. A., Levesque, A. C., and Hamilton, R. I. 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. Fundam. Appl. Nematol. 15:563-573.
  24. Wang, X., Bosselut, N., Castagnone, C., Voisin, R., Abad, P., and Esmenjaud, D. 2003. Multiplex polymerase chain reaction identification of single individuals of the Longidorid nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi*, and *X. italiae* using specific primers from ribosomal genes. Phytopathology 93:160-166.
  25. Waeyenberge, L., Ryss, A., Moens, M., Pinochet, J., and Vrain, T. C. 2000. Molecular characterization of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. Nematology 2:135-142.
  26. Wehunt, E. J. 1984. Nematode parasites of peach and other tree crops. In: Plant and Insect Nematodes. p. 435-455. (W. R. Nickle, ed.) Marcel Dekker, New York.

## ABSTRACT

Ni, H. F.<sup>1</sup>, Cheng, Y. H.<sup>1</sup>, Chen, R. S.<sup>2</sup>, Tsay, T. T.<sup>3</sup>, Chen, D. Y.<sup>4,5</sup> 2003. Discrimination of *Xiphinema* species from Taiwan by rDNA-RFLP analysis. *Plant Pathol. Bull.* 12:235-241. (<sup>1</sup> Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experimental Station, Chiayi 600, Taiwan, R. O. C., <sup>2</sup> Graduate Institute of Biotechnology, National Chiayi University, Chiayi 600, Taiwan, R. O. C., <sup>3</sup> Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 400, Taiwan, R. O. C., <sup>4</sup> Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C., <sup>5</sup> Corresponding author, E-mail: dychen@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: +886-4-23338162

PCR analysis of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region was performed to distinguish among *Xiphinema americanum* group (*X. diffusum*, *X. incognitum*, *X. oxycaudatum*, *X. brevicollum*), *X. insigne*, *X. elnogatum* and *X. brasiliense* found in Taiwan. The size of amplified internal transcribed spacers 1 (ITS1) fragments of *X. americanum* group were ranged from 850 bp to 900 bp, and larger than 1 kb for other *Xiphinema* species. In this study, *X. americanum* group were further differentiated by restriction fragment length differences of ITS1. *CfoI*, *DdeI*, *HinfI*, and *MspI* could distinguish *X. diffusum* and *X. oxycaudatum* from *X. incognitum* or *X. brevicollum*. The digestion of *AccI* was able to further differentiate *X. incognitum* from *X. brevicollum*.

Key word : PCR-RFLP, *Xiphinema* spp, ribosomal DNA, internal transcribed spacer 1 (ITS1), taxonomy