

台灣地區釘線蟲新記錄種 *Paratylenchus minutus* (Nematoda: Criconematoidea, Tylenchulidae) 之鑑定

陳殿義^{1,5} 倪蕙芳² 顏志恒³ 蔡東纂⁴

¹ 臺中縣 行政院農業委員會農業試驗所 植物病理組

² 嘉義市 行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所 植物保護系

³ 臺中市 國立中興大學農業推廣中心

⁴ 臺中市 國立中興大學植物病理學系

⁵ 聯絡作者，電子郵件：dychen@tari.gov.tw；傳真：+886-4-2330-2803

接受日期：中華民國 98 年 7 月 24 日

摘要

陳殿義、倪蕙芳、顏志恒、蔡東纂. 2009. 台灣地區釘線蟲新記錄種 *Paratylenchus minutus* (Nematoda: Criconematoidea, Tylenchulidae) 之鑑定. 植病會刊 18: 167-174.

自 2005 至 2008 年止，從台灣 4 個地區所採集番荔枝、柳橙及文旦之根圈土壤，以改良式柏門氏漏斗分離法，共計分離鑑定 4 個 *Paratylenchus minutus* Linford in Linford, Oliveira & Ishii, 1949 種群，而此一釘線蟲為台灣地區的新記錄種。各釘線蟲種群之鑑定方法包括光學顯微鏡和 SEM 的形態特徵觀察、形態測量值 (morphometrics) 的統計分析，並以包括完整 5.8S 基因和二個內轉錄區間 ITS-1 和 ITS-2，以及部分 18S 和 28S 基因序列的核糖體 DNA (ribosomal DNA, rDNA) 片段序列之相同度比對分析，藉以輔證形態鑑定之結果。在 GenBank 資料庫中，本研究首次登錄 *P. minutus* 的 rDNA 片段代表性序列，長度為 1052 bp，其中 ITS-1、ITS-2 和 5.8S 的序列大小，依序分別為 395 bp、204 bp 及 152 bp。

關鍵詞：釘線蟲、番荔枝、鑑定、核糖體 DNA、*Paratylenchus minutus*

在西元 1972 年之前，台灣地區所記錄之釘線蟲 (Pin nematode) 種類包括 *Paratylenchus Micoletzky*, 1922 和 *Gracilacus Raski*, 1962 等二屬之線蟲，其中前者於甘藷、水稻、玉米、落花生及番石榴等⁽⁹⁾，以及製糖甘蔗⁽⁸⁾ 和茶樹⁽²⁰⁾ 等共 43 種作物上發現，而後者僅出現於梨和綠竹上⁽⁹⁾，但此一時期皆未進行釘線蟲種類之鑑定。

近年來，Lee 等 (1998)⁽¹⁰⁾ 之調查報告顯示，全台主要番石榴栽培園中，以根瘤線蟲 (*Meloidogyne* spp.) 和釘線蟲 (*Paratylenchus* spp.) 最為普遍，且蟲口密度最高，但該釘線蟲之種類為何仍未知。及至西元 2007 年，Chen 等⁽⁴⁾ 首次報導台灣地區茶園的釘線蟲種類鑑定報告，作者針對該國主要產茶專業區所分離到的 *Paratylenchus* spp.，以光學顯微鏡和掃描式電子顯微鏡

(Scanning electron microscope, SEM) 進行形態特徵觀察、形態測量值 (morphometrics) 比對及核糖體 DNA (ribosomal DNA, rDNA) 片段的序列相同度比較分析後，鑑定出所供試的 6 個釘線蟲種群 (populations) 皆為 *P. lepidus* Raski, 1975。西元 2008 年，Chen 等⁽⁷⁾ 復依前述鑑定方法，將自竹園所分離的 9 個釘線蟲 *Gracilacus* spp. 供試群，鑑定其中 5 個種群為 *G. bilineata* Brzeski 1995，其餘為 *G. aculenta* (Brown, 1959) Raski, 1962。

西元 2005 年 5 月，筆者首先於台東縣卑南鄉太平地區的番荔枝 (Sugar apple, *Annona squamosa* L.) 園中分離到 *Paratylenchus minutus* Linford in Linford, Oliveira & Ishii, 1949，其形態特徵與上述 Chen 等⁽⁴⁾ 於茶園所發現的釘線蟲 *P. lepidus* 頗為相近，但 *P. minutus*

雌蟲蟲體和口針的長度皆較為短小，且雄蟲普遍存在。其後筆者又先後於台南縣山上鄉溪州地區、台東市知本地區和台南縣麻豆鎮龍泉里地區，分別於柳橙 (Sweet orange, *Citrus sinensis* Osb.)、番荔枝及文旦 (Buntan, *Citrus grandis* f. *buntan* Hay.) 等果園中分離到 *P. minutus*。*P. minutus* 的模式產地 (type locality) 為美國夏威夷州 (Hawaii) 歐胡島 (Oahu)，模式寄主 (type host) 為鳳梨 [pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr.]⁽⁴⁾，而在台灣地區為新記錄種 (new record species)，茲將鑑定方法和結果詳述於後：

4 個供試釘線蟲種群的來源 (表一、種群代碼分別為 Pmin1-4)，首先選擇雜草管理良好之作物園，以小鐵鏟於園中挖取鄰近 2-3 株植物之根圈土壤，放入塑膠封口袋中，每包重量大約 1-2 公斤。每包根圈土壤樣本先經攪拌均勻後，秤取 4 個 100 公克土壤樣本，以改良式柏門氏漏斗分離法 (modified Baermann's funnel method)⁽⁹⁾ 分離，於室溫下靜置 24 小時後，將指形管中的線蟲懸浮液倒入小玻璃皿中，先於解剖顯微鏡 (Stemi SV6, ZEISS) 下檢視有無釘線蟲，及計算蟲口數量多寡後，選取線蟲數量最多之土樣，再將剩餘之土樣進行分離，以取得足供後續線蟲形態測量鑑定、總量基因體 (total genomic DNA) 萃取及樣本保存所需。

釘線蟲種類鑑定所需樣本的製備方法，是以細玻璃吸管吸取線蟲雌雄蟲至 2 % 福馬林溶液 (2 % formaldehyde solution) 中直接殺死並固定之。線蟲樣本置於室溫下保存，需至少 3 天後再進行光學顯微鏡和掃描電子顯微鏡 (SEM) 觀察。有關線蟲內外部器官和構造的測量方法，首先是以挑針挑取 4-5 隻線蟲樣本，移置於載玻片上之原保存液滴液中，蓋上蓋玻片後，旋即以顯微鏡附設照相機 (MC80, ZEISS) 拍攝和製成幻燈片，其詳細步驟和測量方法見 Chen 等⁽¹⁾ 之報告內容。至於線蟲體表構造之 SEM 觀察，需先將線蟲樣本體表之福馬林溶液以清水漂洗清除後，再置入液態氮中固定，立即以低溫場放射掃描式電子顯微鏡 (cryo-field emission scanning electron microscope, JSM-6330F, Jeol, Tokyo, Japan) 進行觀察⁽⁵⁾。另外，線蟲總量基因體的萃取、rDNA 片段序列 (包含完整 5.8S 基因和內轉錄區間 ITS-1 和 ITS-2，以及部分 18S 和 28S 基因) 的聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅、選殖 (cloning) 及解序等均依據 Chen 等⁽³⁾ 之方法，至於種內各種群間及與已知釘線蟲種間的 rDNA 片段序列相同度比較分析方法則如同 Chen 等⁽¹⁾ 之研究方法。

關於 *P. minutus* 的 rDNA 片段代表性序列 (一致性序列, consensus sequence) 的產生方式是從 Pmin1 供試

群中選取 3 個選殖體進行解序，再由此 3 條原始序列以 Pretty program (GCG, SeqWeb 3.1.2 版) 進行同時多條序列排列 (multiple sequences alignment)，由此方法產生的一致性序列再經人為檢視修正後為 *P. minutus* 之代表性序列 (1052 bp, GenBank, Accession No. EF126180)。至於 *P. minutus* 代表性序列中，推測 5.8S 基因、ITS-1 及 ITS-2 等之序列區間範圍，其方法是與 GenBank (NCBI, National center for biotechnology information, U.S.) 資料庫中，已登錄之 *P. lepidus* (1026 bp, Accession No. EF126178)⁽⁴⁾ 和鞘線蟲 *Hemicriconemoides kanayaensis* (1043 bp, Accession No. EF126179)⁽⁶⁾ 的 rDNA 片段序列，以 BestFit program (GCG, SeqWeb 3.2.1 版) 進行成對比對後推估所得。另供試群間之雌雄蟲各項形態測量值差異，是以 SAS 統計分析軟體 GLM 程序 (1999, V8.2) 進行變方分析。

截至目前為止，從台灣 4 個地區的 3 種果樹根圈土中所鑑定之釘線蟲 *P. minutus*，其雌蟲的主要形態測量平均值，其中 Pmin3 的 c 項和 EP 項的平均值，依序分別和其他 2 及 3 個供試群有顯著差異 ($P < 0.01$) (表一)。另外，Pmin1 和 Pmin3 的 VL 和 VL/VW 等二項之平均值皆較小，與其餘二個供試群間有顯著差異 ($P < 0.01$)。至於雄蟲的主要形態測量平均值，除 Pmin1 的 a 項和其餘二個供試群有顯著差異 ($P < 0.01$) 外，其餘測量項目的平均值差異皆不明顯，其中 c'、Spicule、EP、P 及 ABW 等共 5 項的平均值在各供試群間皆無顯著差異 ($P < 0.01$) (表二)。

在 rDNA 片段序列的比對上，除了原先由 Pmin1 的 3 個選殖體進行解序，經排列後而獲得 *P. minutus* 的代表性序列外，後來再由 Pmin2、Pmin3 及 Pmin4 等 3 個種群，依序分別選取 3、2 及 1 個選殖體進行解序，總共 6 條原始序列，其長度大小介於 1050 至 1053 bp，其與 *P. minutus* 的代表性序列 (1052 bp) 間的相同度 (similarity) 為 97.6-100.0 %，而其平均值為 99.4 %。另外 *P. minutus* 和 *P. lepidus* 的代表性序列間的相同度則為 86.5 %，而與另二種釘線蟲 *Gracilacus bilineata* 和 *G. aculeata* 比較，依序分別為 76.2 % 和 78.1 %；至於 *P. minutus* 代表性序列中的 ITS-1、ITS-2 及 5.8S 的序列大小，依序分別為 395 bp、204 bp 及 152 bp。

靜止或殺死 *P. minutus* 並固定後，雌蟲蟲體大多呈現 'C' 字型，體型分成細長型和肥胖型，蟲體最大寬度約 10.0 μm (8-12 μm)，陰門位置明顯 (圖一、A 和 B)。唇部前端平整，具體環 (annules)，和蟲體銜接處不明顯 (圖一、C；圖二、A)。口針結球 (stylet knob) 明顯，呈現寬扁形，橫寬度約 2.8 μm (2.3-3.3 μm)；食道前方體 (procorpus) 和中部食道球 (median bulb) 結

合，狹細部 (isthmus) 細長，基部食道球 (post-esophageal bulb) 為卵圓型，明顯地正面貼近於腸 (intestine) 前端；半月體 (hemizonid) 位置緊接在排泄孔 (excretory pore) 前方 (圖一、C)。尾部末端圓鈍，肛門 (anus) 的開口位置明顯，長度約 20 μm (16-24 μm)；陰門開口邊上有一對大型陰門蓋 (vulval flaps) (圖一、

D；圖二、B)。側帶 (lateral field) 上具有 4 條側帶溝，不具側帶橫條溝 (areolation)，其寬度約 1.7 μm (圖二、B 和 C)。雌蟲生殖系統屬單卵巢型 (monodelphic)，貯精囊 (spermatheca) 為圓形，具有精子。

雄蟲之體長和雌蟲相差不大，但體型較為細長，最大體寬約為 8.0 μm (7-9 μm) (圖三、A)。唇部前端

表一、台灣地區 *Paratylenchus minutus* 雌蟲之形態測量值及其與三個已發表種群之比較

Table 1. Comparisons of the morphometrics of *Paratylenchus minutus* female populations isolated from Taiwan and three known populations

Character ¹	Location and host (Code)						
	Beinan Sugar apple (Pmin1)	Shanshang Sweet orange (Pmin2)	Taitung City Sugar apple (Pmin3)	Madou Buntan (Pmin4)	Hawaii ⁴ Pineapple (paratypes)	Topotypes ⁵	Martinique ⁶ <i>Anthurium</i> sp.
n	15	15	16	16	-	17	10
L (mm)	0.23 ± 0.01 ² bc ³ (0.20-0.24)	0.25 ± 0.02a (0.22-0.28)	0.22 ± 0.01c (0.19-0.24)	0.24 ± 0.02b (0.19-0.27)	0.267 (0.24-0.31)	0.26 (0.20-0.29)	0.23 (0.196-0.244)
a	23.6 ± 1.9ab (20.0-26.7)	24.8 ± 2.0a (21.7-27.8)	22.8 ± 1.6b (20.0-25.6)	24.6 ± 1.8a (20.0-27.5)	19.1 (16-24)	20 (18-23)	19.9 ± 1.8 (17.2-22.6)
b	3.4 ± 0.2ab (3.1-3.8)	3.5 ± 0.2a (3.2-4.0)	3.2 ± 0.2b (2.8-3.6)	3.5 ± 0.2a (3.0-3.9)	3.68 (3.4-4.1)	4.0 (3.4-4.3)	3.6 ± 0.2 (3.3-4.0)
b'	6.5 ± 0.4a (5.7-7.1)	6.4 ± 0.4ab (5.6-7.0)	5.9 ± 0.4b (5.4-6.9)	6.5 ± 0.7a (4.9-7.6)	-	-	-
c	-	12.8 ± 1.0a (11.6-15.0)	11.3 ± 0.4b (10.5-11.6)	13.1 ± 0.9a (11.9-14.1)	(12-18)	16	16.1 ± 1.8 (13.7-19.6)
V	83.1 ± 0.8a (82.0-85.0)	82.0 ± 1.0b (79.4-83.4)	82.3 ± 0.7ab (81.0-83.4)	81.9 ± 1.5b (77.8-83.6)	(80-84)	82 (81-84)	82.0 ± 0.6 (81-83)
Stylet (μm)	17.1 ± 0.7ab (15.7-18.0)	17.8 ± 0.7a (16.7-19.0)	16.6 ± 0.6b (15.0-17.6)	17.5 ± 0.9a (16.0-19.2)	(16-21)	17 (16-19)	18 ± 1 (16.6-19.9)
EP (μm)	58 ± 3b (52-63)	61 ± 4a (56-68)	54 ± 3c (48-59)	59 ± 3ab (51-63)	-	56 (47-61)	55 ± 3.2 (50-60)
P	25.4 ± 1.3a (22.6-27.6)	24.2 ± 1.2a (21.9-26.4)	24.3 ± 1.1a (22.5-26.0)	24.9 ± 1.4a (23.3-28.2)	-	-	-
VL/VW	4.6 ± 0.4b (3.8-5.4)	5.2 ± 0.5a (4.5-6.0)	4.9 ± 0.3b (4.3-5.4)	5.3 ± 0.4a (4.6-5.9)	-	-	-
VL (μm)	39 ± 3b (34-43)	46 ± 4a (39-53)	39 ± 3b (34-43)	43 ± 5a (33-50)	-	-	-
VW (μm)	8 ± 1a (7-9)	9 ± 1a (8-11)	8 ± 1a (7-9)	8 ± 1a (7-9)	-	-	-

¹ n = no. of nematodes; L = body length; a=body length divided by the maximum width; b = body length divided by distance from head end to posterior end of esophageal gland; b' = body length divided by the length from anterior end of body to the median bulb; c = body length divided by length of tail; V = ratio between distance from vulva to anterior end of body and total body length in %; EP = the distance from excretory pore to the anterior end of body; p = ratio between the length of EP and body length in %; VL = distance from vulva to tail end; VW = body width at vulval position.

² Measurements in the form: mean ± standard deviation (population range), "-" = no data.

³ Data in each row with the same letter were not significantly different at 1% level by LSMEANS/TDIFF.

⁴ Linford, M. B., et al., 1949⁽¹¹⁾

⁵ Raski, D. J., 1975⁽¹⁵⁾

⁶ van den Berg, E., & Cadet, P. 1991⁽¹⁹⁾

表二、台灣地區 *Paratylenchus minutus* 雄蟲之形態測量值及其與三個已發表種群之比較Table 2. Comparisons of the morphometrics of *Paratylenchus minutus* male populations isolated from Taiwan and three known populations

Character ¹	Location and host (Code)					
	Shanshang Sweet orange (Pmin2)	Taitung City Sugar apple (Pmin3)	Madou Buntan (Pmin4)	Hawaii ⁴ Pineapple	Topotypes ⁵	Martinique ⁶ <i>Anthurium</i> sp.
n	10	12	12		3	3
L (mm)	0.23 ± 0.01 ² a ³ (0.22-0.24)	0.21 ± 0.01b (0.19-0.22)	0.22 ± 0.01ab (0.19-0.24)	0.258 (0.22-0.27)	0.25 (0.22-0.28)	0.215 (0.209-0.221)
a	29.7 ± 2.5a (25.6-32.9)	26.3 ± 1.2b (23.8-27.5)	27.0 ± 2.3b (23.8-31.4)	24.4 (22-27)	25 (23-27)	23.9 (n=1)
c	11.2 ± 1.0ab (10.0-12.8)	10.9 ± 0.8b (9.1-12.2)	12.1 ± 1.2a (10.0-14.7)	14.4 (12-19)	17 (15-19)	15.9 (15.7-16.3)
c'	3.3 ± 0.5a (2.5-4.2)	3.3 ± 0.4a (2.9-3.8)	3.0 ± 0.3a (2.5-3.3)	-	-	1.8
Spicule (μm)	14.7 ± 0.6a (14.0-15.9)	14.3 ± 0.3a (13.7-14.7)	14.6 ± 0.7a (13.5-16.0)	(16-19)	17 (15-18)	15.5 (15.1-16.2)
EP (μm)	52 ± 4a (46-57)	51 ± 3a (46-56)	51 ± 5a (40-56)	-	54 (49-59)	48.7 (48.5-49.2)
P	22.9 ± 1.7a (20.9-25.5)	24.1 ± 1.2a (21.9-26.5)	23.7 ± 1.8a (19.0-25.5)	-	-	-
Tail (μm)	21 ± 2a (18-24)	19 ± 2ab (18-23)	18 ± 2b (15-20)	(14-19)	-	13.4 (12.9-14)
ABW (μm)	6 ± 1a (5-8)	6 ± 1a (5-7)	6 ± 0a (6-7)	-	-	-

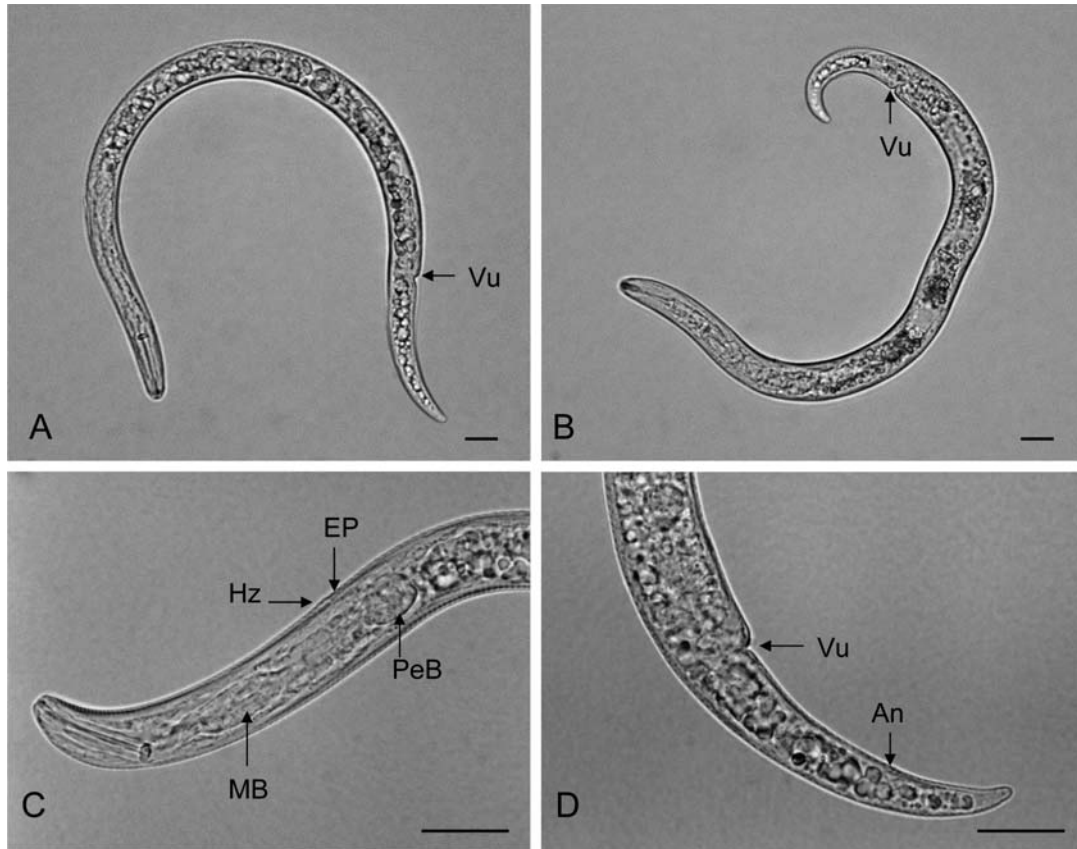
¹ c' = tail length divided by anal diameter of body; ABW = anal body width, the others see table 1.

^{2,3,4,5,6} See table 1.

平整，刺吸器官和消化系統退化，無口針，食道構造不明顯，但排泄孔位置清楚可見(圖三、B)。雄蟲尾端圓鈍，交接刺(spicule)明顯，具有副刺(gubernaculum)，長度約 2.7 μm (2.4-3.0 μm)，但無交接囊(bursa)(圖三、C)。

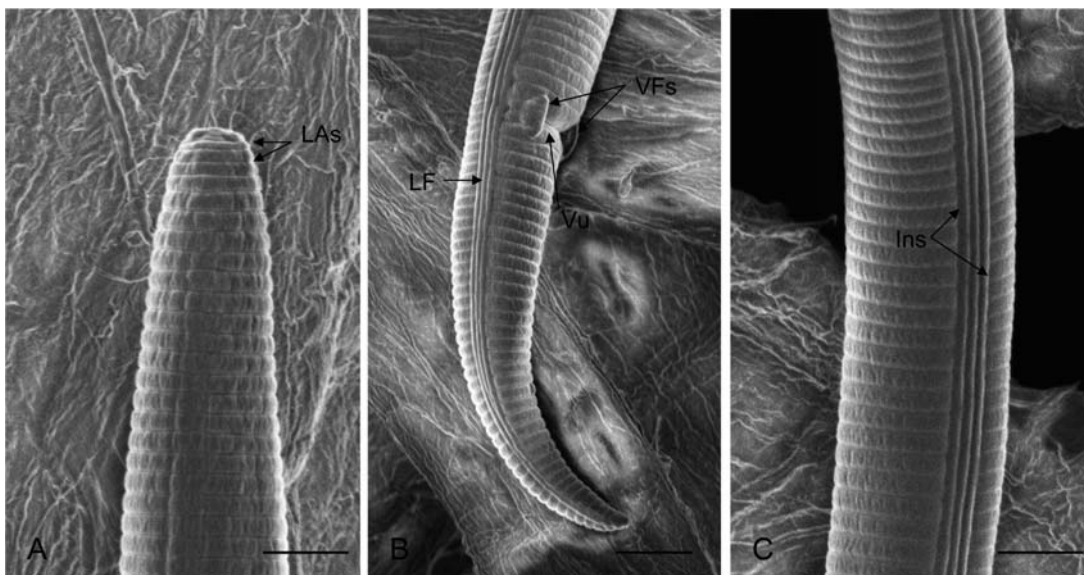
在本研究中，雖然 *P. minutus* 雌蟲的 Pmin3 之 c 項和 EP 項的測量平均值與其他供試群間有顯著差異，但該二項測量值的範圍和其餘供試群間有部份重疊情形，而且 Pmin3 的其餘測量項目之平均值與其他供試群間並無明顯的差異；另外，Pmin3 的 2 個 rDNA 片段原始序列 (1050 bp, 1052 bp) 與 *P. minutus* 的代表性序列間之相同度則分別達到 99.6 % 和 100 %。至於在雄蟲方面，只有 Pmin2 的 a 項之平均值與其他供試群間有顯著差異，而其餘各項的平均值在各供試群間皆相當一致。由上述雌蟲和雄蟲的形態測量值、rDNA 片段相同度分析，以及外觀形態特徵的比對，因此確認本研究之 4 個供試群皆應屬於同一種釘線蟲，亦即 *P. minutus*。

從台灣地區所分離鑑定的 4 個 *Paratylenchus minutus* 雌蟲供試群與最早在夏威夷所分離鑑定的副模標本(paratype)⁽¹¹⁾ 和原產地模式標本(topotype)⁽¹⁵⁾ 等二個比較群比對，在可供比對的測量項目中，供試群的陰門位置(v 項)和口針的長度(stylet 項)與比較群最為吻合，其平均值相當接近且範圍明顯重疊。除上述二個測量項目外，其它項目有些微差異，其中供試群的蟲體長度(L 項)與 paratype 及 topotype 的平均值依序為 0.22-0.25 mm 與 0.267 mm, 0.26 mm，而呈現較為短小，但是 a 項的平均值則較大，即依序為 22.8-24.8 與 19.1, 20，而此二項的測量值範圍在供試群和比較群間皆有部分重疊的情形。另外供試群的 b 項平均值和副模標本相近(3.2-3.5 與 3.68)，但是與原產地模式標本間有較明顯差異(3.2-3.5 與 4.0)，但同樣地其測量值的範圍仍有部分重疊現象。另外比對雄蟲，3 個供試群的蟲體長度的平均值(0.21-0.23 mm)亦較 paratype 的 0.258 mm，及 topotype 的 0.25 mm 短小，至於 a 項、c 項及交接刺長度(spicule 項)等 3 項的平均值亦出現少



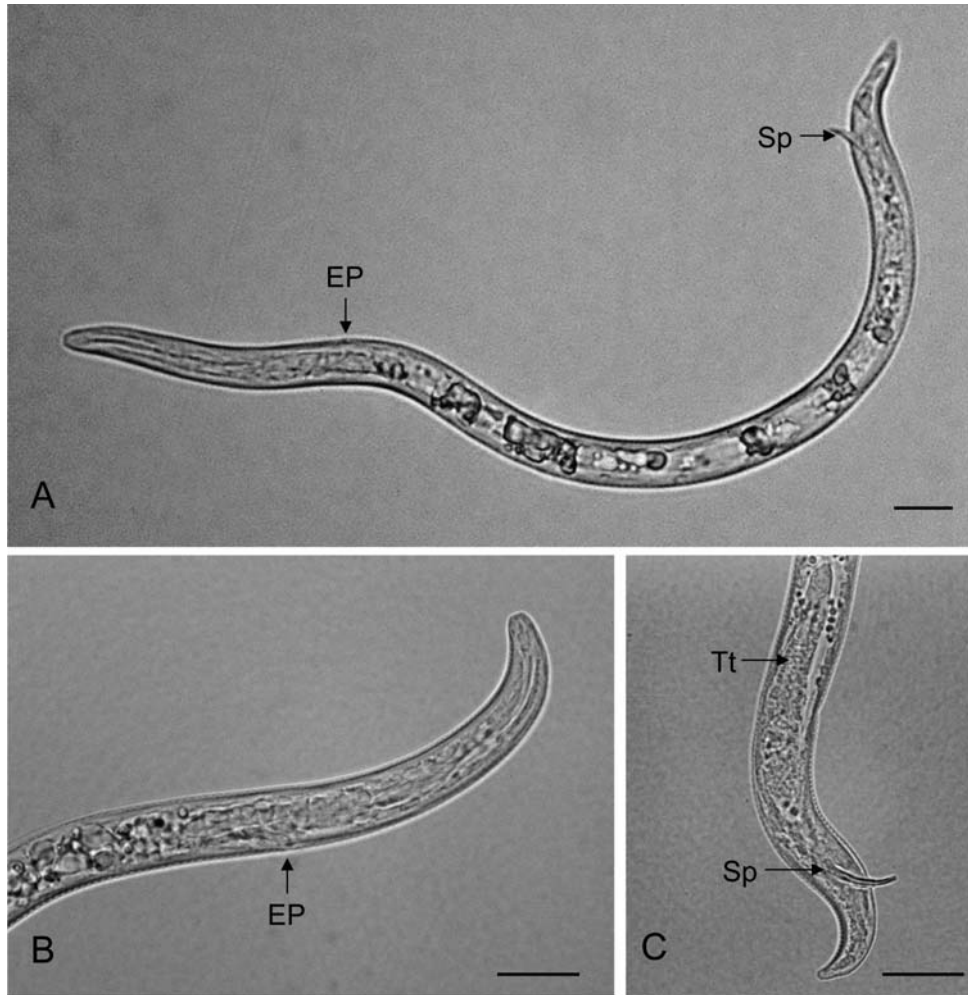
圖一、*Paratylenchus minutus* 雌蟲之光學影像圖。A 和 B, 完整蟲體形態 (Vu, 陰門) ; C, 頭端部分 (EP, 排泄口 ; Hz, 半月體 ; MB, 中部食道球 ; PeB, 後部基部食道球) ; D, 尾端部分 (An, 肛門 ; Vu, 陰門)。比例尺長度 : A-D = 10 微米。

Fig. 1. Photomicrographs of *Paratylenchus minutus* female. A & B, Full body (Vu, vulva); C, Anterior region (EP, excretory pore; Hz, hemizonid; MB, median bulb; PeB, post-esophageal bulb); D, Posterior region (An, anus; Vu, vulva). Scale bars in A-D = 10 μ m.



圖二、*Paratylenchus minutus* 雌蟲之 SEM 影像圖。A, 蟲體頭端部分 (LAs, 唇區體環) ; B, 蟲體尾端部分 (LF, 側帶 ; VFs, 陰門蓋 ; Vu, 陰門) ; C, 中段部分 (Ins, 側帶溝)。比例尺長度 : A-C = 5 微米。

Fig. 2. SEM photomicrographs of *Paratylenchus minutus* female. A, Anterior region (LAs, lip annules); B, Tail region (LF, later field; VFs, vulval flaps; Vu, vulva); C, Middle region (Ins, incisures). Scale bars in A-C = 5 μ m.



圖三、*Paratylenchus minutus* 雄蟲之光學影像圖。A, 全蟲體形態 (EP, 排泄孔; Sp, 交接刺); B, 頭端部分 (EP, 排泄孔); C, 尾端部分 (Sp, 交接刺; Tt, 精巢)。比例尺長度: A-C = 10 微米。

Fig. 3. Photomicrographs of *Paratylenchus minutus* male. A, Full body (EP, excretory pore; Sp, spicule); B, Anterior region (EP, excretory pore); C, Posterior region (Sp, spicule; Tt, testis). Scale bars in A-C = 10 μ m.

許差異情形，但其測量值的範圍仍皆有部分重疊。經由上述與副模標本和原產地模式標本的形態測量值比較，以及蟲體整體外觀特徵的比對，因此確認本研究發現的釘線蟲種類為 *P. minutus*，且為首次記錄。另外與在西印度群島 (West Indies) 的馬提尼克島 (Martinique) 所分離到的 *P. minutus* 相比⁽¹⁹⁾，二者雌蟲蟲體的長度平均值則是更為吻合 (0.22-0.25 mm 與 0.23 mm)。釘線蟲 *P. minutus* 的陰門位置，相較於肛門更為明顯，而排泄孔的位置亦清晰可見，因此本研究提出更多關於 EP、p、VL/VW、VL 及 VW 等 5 項的測量數據資料，可補充 *P. minutus* 在形態鑑定上的不足。

釘線蟲 *P. minutus* 的主要外觀形態特徵和先前筆者於台灣地區主要茶園所分離鑑定的 *P. lepidus* 相當近似，而此二種釘線蟲的主要形態差異為 *P. minutus* 雌蟲的體長較小 (0.22-0.25 mm 與 0.30-0.33 mm)，口針長度

亦較短 (16.6-17.8 μ m 與 23.5-24.0 μ m)；在生殖方式上，*P. lepidus* 為行孤雌生殖，在所分離的釘線蟲樣本中無雄蟲個體存在。另筆者近年亦於彰化縣社頭鄉和二水鎮，以及高雄縣燕巢鄉等三個主要番石榴栽培地區的果園中分離到另一種釘線蟲 *Paratylenchus* sp.，其形態特徵和 *P. minutus* 更為相近，其雌蟲間的主要差異只在於尾端些微的形態差異，但是 rDNA 片段序列的相同度比對上有明顯差別 (筆者未發表資料)。由於釘線蟲 *Paratylenchus* spp. 雌蟲的體型相對於其他植物寄生性線蟲種類更為細小 (長度小於 0.5 mm)，且不同種間之主要形態特徵亦極為類似，在光學顯微鏡下不易立即辨識，而且形態測量值間時有不同程度重疊情形，造成對於此一變異情形是屬於種內 (intraspecies) 或種間 (interspecies) 的疑慮，因此以傳統形態鑑定方法進行釘線蟲種類調查鑑定相當困難且曠日費時。

近十年來，隨著分子生物技術的日益成熟，比較 rDNA 序列中變異程度較大的非轉錄區域 (non-transcribed region) 序列的相似度^(2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 14, 16)，或進而針對內轉錄區間 (internal transcribed spacer, ITS) 序列的差異性，設計具有種專一性的引子對 (species-specific primers)^(13, 17, 18)，藉以輔助鑑別線蟲形態相似種或檢測線蟲種類之研究趨勢已愈受重視。在 GenBank 資料庫中，本研究為首次登錄 *P. minutus* 的 rDNA 片段序列，而該序列資料可供全世界線蟲分類學者在釘線蟲的形態鑑定上具有另一項較為客觀的輔助比對依據。另外針對少量線蟲樣本，開發單獨一隻線蟲基因體的萃取方法，如此才能更正確、快速及簡便地進行全國性的釘線蟲種類調查鑑定研究。

釘線蟲 *P. minutus* 的寄主植物範圍很廣，包括鳳梨、甘藍 (cabbage)、秋葵 (okra)、綠豆 (mung bean)、蘿蔔 (radish) 及火鶴花 (花燭屬 *Anthurium* sp.) 等共 27 種植物^(11, 19)。台灣地區最早於 2005 年 5 月於台東縣卑南地區的番荔枝園中發現到該種釘線蟲，時隔近二年再陸續從柳橙和文旦園中分離到此一線蟲，然依據 Huang 等 (1972)⁽⁹⁾ 針對台灣地區作物線蟲相之調查報告，發現 *Paratylenchus* sp. 存在於特用作物、蔬菜、果樹及花卉類等共 41 種作物上，因此有關台灣地區釘線蟲的種類及數量，以及 *P. minutus* 在本省的寄主範圍和分佈區域仍有待進一步研究。

謝 辭

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局部分計畫經費補助；農委會農業藥物毒物試驗所蘇秋竹博士和李祈益先生提供掃描式電子顯微鏡之相關儀器和技術支援；本所作物組試驗統計研究室呂椿棠博士協助數據統計分析，特致謝忱。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Chen, D. Y., Ni, H. F., Yen, J. H., Cheng, Y. H., and Tsay, T. T. 2004. Variability within *Xiphinema elongatum* populations in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 13: 45-60. (in Chinese with English abstract)
2. Chen, D. Y., Ni, H. F., Yen, J. H., Cheng, Y. H., and Tsay, T. T. 2005. Differentiation of the *Xiphinema americanum*-group nematodes *X. brevicollum*, *X. incognitum*, *X. diffusum* and *X. oxycaudatum* in Taiwan by morphometrics and nuclear ribosomal DNA sequences. *Nematology* 7: 713-725.
3. Chen, D. Y., Chen, R. S., Yen, J. H., Tsay, T. T., and Ni, H. F. 2006. Species of spiral nematode and lance nematode (Nematoda: Hoplolaiminae) identified in Taiwan and Kinmen. *Plant Pathol. Bull.* 15: 25-38. (in Chinese with English abstract)
4. Chen, D. Y., Ni, H. F., Yen, J. H., and Tsay, T. T. 2007. Identification of a new recorded pin nematode, *Paratylenchus lepidus*, (Nematoda: Criconematoidea, Tylenchulidae) among tea plantations in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 16: 41-46. (in Chinese with English abstract)
5. Chen, D. Y., Ni, H. F., and Tsay, T. T. 2007. Identification of a new recorded stunt nematode *Tylenchorhynchus zaeae* (Nematoda: Belonolaimidae) in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 16: 79-86. (in Chinese with English abstract)
6. Chen, D. Y., Ni, H. F., Yen, J. H., and Tsay, T. T. 2007. Identification of *Hemicriconemoides kanayaensis* and *H. californianus* (Nematoda: Criconematoidea, Criconematidae) among tea plantations in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 16: 181-192. (in Chinese with English abstract)
7. Chen, D. Y., Ni, H. F., Tsay, T. T., and Yen, J. H. 2008. Identification of *Gracilacus bilineata* and *G. aculeata* (Nematoda: Criconematoidea, Tylenchulidae) among bamboo plantations in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 17: (in press, in Chinese with English abstract)
8. Hu, C. H., and Chu, H. T. 1964. The nematode investigation in sugarcane field of Taiwan (II). *Taiwan Sugar Res. Inst.* 33: 63-82. (in Chinese with English abstract)
9. Huang, C. S., Tsai, Y. P., Tu, C. C., Lin, Y. Y., and Huang, S. P. 1972. Plant parasitic nematodes in Taiwan, monograph series No. 1. Institute of Botany, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, ROC, 61 pp. (in Chinese with English abstract)
10. Lee, M. D., Chen, C. H., Tsay, T. T., and Lin, Y. Y. 1998. Survey and control of guava nematode diseases. *Plant Prot. Bull.* 40: 265-276.
11. Linford, M. B., Oliveira, J. M., and Ishii, M. 1949. *Paratylenchus minutus*, n. sp., a nematode parasitic on roots. *Pac. Sci.* 3: 111-119.
12. Nguyen, C. N., Subbotin, S. A., Madani, M., Trinh, P. Q., and Moens, M. 2003. *Radopholus duriophilus* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae) from Western Highland of Vietnam. *Nematology* 5: 549-558.
13. Oliveira, C. M. G., Fenton, B., Malloch, G., Brown, D. J. F., and Neilson, R. 2005. Development of species-specific primers for the ectoparasitic nematode species *Xiphinema brevicolle*, *X. diffusum*, *X. elongatum*, *X. ifacolum* and *X. longicaudatum* (Nematoda: Longidoridae) based on ribosomal DNA sequences. *Ann. Appl. Biol.* 146: 281-288.
14. Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A. M., Murray, P.

- C. B., Fleming, C. C., Szalanski, A. L., Adams, B. A., and Harris, T. S. 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *J. Nematol.* 29: 441-450.
15. Raski, D. J. 1975. Revision of the Genus *Paratylenchus* Micoletzky, 1922 and descriptions of new species. Part I of 3 parts. *J. Nematol.* 7: 15-34.
16. Trinh, P. Q., Nguyen, C. N., Waeyenberge, L. Subbotin, A. A., Karssen, G., and Moens, M. 2004. *Radopholus arabocoffeae* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae), a nematode pathogenic to *Coffea arabica* in Vietnam, and additional data on *R. duriophilus*. *Nematology* 6: 681-693.
17. Uehara, T., Mizukubo, T., and Momota, Y. 1998. Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA. *Nematologica* 44: 357-368.
18. Uehara, T., Mizukubo, T., Kushida, A., and Momota, Y. 1998. Identification of *Pratylenchus penetrans* (Cobb) by PCR Using ITS-based species-specific primers. *Japanese J. Nematol.* 28: 1-7.
19. van den Berg, E., and Cadet, P. 1991. One new and some known plant parasitic nematode species from the French Caribbean (Nematoda: Tylenchina). *Revue Nématol.* 14: 389-405.
20. Wang, L. C. 1970. A study on soil nematodes of tea plantation in Taiwan. *Taiwan Agriculture* 6: 126-151. (in Chinese with English abstract)

ABSTRACT

Chen, D. Y.^{1,5}, Ni, H. F.², Yen, J. H.³, and Tsay, T. T.⁴ 2009. Identification of a new recorded pin nematode *Paratylenchus minutus* (Nematoda: Criconelema, Tylenchulidae) in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 18: 167-174. (¹Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan; ²Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Station, TARI, Taiwan; ³Agricultural Extension Center, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ⁴Department of Plant Pathology, NCHU, Taichung, Taiwan; ⁵Corresponding author, E-mail: Dychen@tari.gov.tw, Fax: +886-4-2330-2803)

Four geographical populations of *Paratylenchus* sp., were isolated from the rhizosphere of sugar apple, sweet orange, and buntan using modified Baermann's funnel technique in Taiwan from 2005 to 2008. Based on the data of external morphology, morphometrics, and the sequences of ribosomal DNA (including complete 5.8S gene, internal transcribed spacer ITS-1, ITS-2, and partial 18S and 28S gene), the four populations of pin nematode were identified as *P. minutus* Linford in Linford, Oliveira & Ishii, 1949, a new-recorded species in Taiwan. In this study, morphometric data and SEM photos for this pin nematode were also measured and taken. The representative sequence of rDNA fragment of *P. minutus*, a total length of 1052 bp with ITS-1 (395 bp), ITS-2 (204 bp) and 5.8S gene (152 bp), was firstly submitted to GenBank database.

Keywords: pin nematode, sugar apple, identification, ribosomal DNA, *Paratylenchus minutus*