

台灣地區竹園釘線蟲 *Gracilacus bilineata* 和新記錄種 *G. aculenta* (Nematoda: Criconematoidea, Tylenchulidae) 之鑑定

陳殿義¹ 倪蕙芳² 蔡東纂³ 顏志恒^{4,5}

¹ 台中縣 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 台中市 國立中興大學植物病理學系

⁴ 台中市 國立中興大學農業推廣中心

⁵ 聯絡作者，電子郵件：jhyen@nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2286-0267

接受日期：中華民國 97 年 4 月 4 日

摘 要

陳殿義、倪蕙芳、蔡東纂、顏志恒. 2008. 台灣地區竹園釘線蟲 *Gracilacus bilineata* 和新記錄種 *G. aculenta* (Nematoda: Criconematoidea, Tylenchulidae) 之鑑定. 植病會刊 17: 209-219.

自 2005 年 9 月起，從台灣地區 7 處竹園 (*Bambusa* spp.) 的根圈土壤中，以改良式柏門氏漏斗分離法，總計分離到 9 群釘線蟲 (*Gracilacus* spp.)。依據外觀形態特徵、形態測量值 (morphometrics) 及包括完整 5.8S 基因、內轉錄區間 ITS-1 和 ITS-2 及部分 18S 和 28S 基因的核糖體 DNA (ribosomal DNA, rDNA) 片段序列相似度比對分析後，其中 5 群鑑定為 *G. bilineata* Brzeski, 1995，另 4 群鑑定為 *G. aculenta* (Brown, 1959) Raski, 1962，為台灣地區的新記錄種。本研究以 SEM 可清楚地觀察到 *G. bilineata* 和 *G. aculenta* 的側帶上具有 3 條側線和小型的陰門蓋構造，並首次在 GenBank 中登錄此二種釘線蟲的 rDNA 片段代表性序列，其序列大小依序分別為 1036 bp 和 1021 bp，而二者間的序列相似度為 86.0%。

關鍵詞：釘線蟲、竹、鑑定、陰門蓋、核糖體 DNA、*Gracilacus bilineata*、*Gracilacus aculenta*

緒 言

西元 1962 年，Raski 氏提出新的釘線蟲 (pin nematode) 屬 *Gracilacus* 以包含由 *Paratylenchus* 和 *Cacopaurus* 二屬所移出的 10 個種⁽⁹⁾，其中 9 種來自 *Paratylenchus*。釘線蟲 *Gracilacus* Raski, 1962 一屬的主要形態特徵為體長小於 0.5 mm，雌蟲體型細長或中段部分略微肥胖；口針 (stylet) 細長，長度 49-119 μm ；蟲體在陰門 (vulva) 位置的後端部分為向後明顯伸長；表皮體環細緻，表面無小點狀突起物；排泄孔 (excretory pore) 的位置大多接近於中部食道球的瓣膜附近，但少數靠近於神經環 (nerve ring) 處^(9, 10, 11)。*Gracilacus* 和 *Paratylenchus* 的形態差異主要在於後者的口針明顯較短，長度少於 36 μm ，而且排泄孔大多

接近於神經環附近或更後面；至於和 *Cacopaurus* 的形態差異主要在於其雌蟲表皮上面有小點狀突起物，雌蟲體型更為肥胖，蟲體在陰門後端的部分極為短小⁽¹¹⁾。

依據 Raski 和 Luc 二氏的報告，*Gracilacus* 的分類地位屬於 Criconematoidea Taylor, 1936 總科 (superfamily) 之下的 Tylenchulidae Skarbilovich, 1947 科 (family)；*Paratylenchinae* Thorne, 1949 亞科 (subfamily) 中，而當時該屬已記錄的種類為 38 種⁽¹¹⁾。

依據黃氏等 (1972) 的調查報告⁽⁸⁾，台灣地區的釘線蟲有 *Paratylenchus* 和 *Gracilacus* 二屬線蟲，前者所記錄的寄主作物種類繁多，包括甘藷、水稻、玉米、落花生、茶及綠竹等共 43 種作物，而 *Gracilacus* 僅於梨和綠竹上發現，但皆未進行種類鑑定，其中茶園的

釘線蟲經陳氏等(2007)重新採集鑑定者為 *P. lepidus*⁽⁵⁾。Brzeski 氏 (1995) 發表 *Gracilacus bilineata* 新種 (new species)，而該種線蟲的模式產地 (type locality) 為 Taiwan，採集地點為 “village Shuang Hai”，由 Szczech 氏於靠近 “bamboo” 根系附近的壤土 (loamy soil) 中所分離得到⁽²⁾。自 2005 年 9 月起，筆者陸續於 6 個鄉鎮地區，從其中的 7 個竹園 (*Bambusa* sp.) 中，總共分離到 9 群 (populations) *Gracilacus* spp.，經以形態測量值 (morphometrics) 比對、光學和掃描電子顯微鏡 (SEM) 的形態特徵觀察及核糖體 DNA (ribosomal DNA, rDNA) 片段的鹼基序列相似度比較分析後，其中 5 群鑑定為 *G. bilineata* Brzeski 1995，另 4 群為 *G. aculeata* (Brown, 1959) Raski, 1962，其中後者為台灣地區的新記錄種，茲將鑑定方法和結果報告如後。

材料和方法

供試線蟲來源與製備

採集線蟲地點包括台東縣關山鎮、南投縣名間鄉和草屯鎮、嘉義市、雲林縣古坑鄉及台南縣白河鎮等共 6 個地區。從上述地區，各選取數個管理良好的竹園，以小鐵鏟挖取各竹園中 1-3 個竹叢植株的根圈土壤 1-2 公斤，分別放入已編號的塑膠封口袋中。每包土壤樣本先經攪拌混合均勻後，秤取 4 個各約 100 公克土樣，以改良式柏門式漏斗分離法進行線蟲分離，經隔夜靜置後，取懸浮液倒入鏡檢皿中，以放大 20-80 倍率的解剖顯微鏡檢視有無釘線蟲及其數量後，在每一採樣地區選定釘線蟲數量最多之一包土樣，將該剩餘土樣再進行分離後，以拉細之玻璃吸管吸取釘線蟲至乾淨水中，以獲得足夠線蟲族群 (population)，同時供後續形態測量、SEM 觀察、基因體 (genomic DNA) 萃取及標本保存所需。二種釘線蟲族群的編號分別如表一及表三內所示。

線蟲形態測量與電子顯微鏡觀察

釘線蟲形態鑑定的方法，首先於解剖顯微鏡下，以拉細之玻璃吸管吸取經清水漂洗後之線蟲雌雄蟲至 2% 福馬林溶液中殺死及固定，靜置於室溫下，至少 3 天後再進行線蟲形態特徵測量和表皮構造的 SEM 觀察。線蟲形態測量方法，先以滴管將保存線蟲的福馬林溶液適量地滴至載玻片上，再以挑針將固定後之線蟲 3-5 隻移置到滴液中，蓋上蓋玻片後立即進行各項線蟲形態之幻燈片拍攝。首先在 400 倍放大倍率下進行，拍攝項目包括體長 (L)、最大體寬、陰門、陰門至

尾端的距離 (以 VL 表示) 及陰門位置的體寬 (以 VW 表示)，另排泄孔至頭部前端的距離 (以 EP 表示)、中部食道球 (median bulb) 及後部食道腺體 (post esophageal gland) 底部至頭部前端的距離，至於口針及交接刺 (spicule) 的長度是在油鏡頭下，以放大 1000 倍進行拍攝。關於前述幻燈片上線蟲各項構造影像的測量方法如陳氏等⁽³⁾之報告中所述。至於線蟲體表構造的 SEM 觀察，首先將保存在 2% 福馬林溶液中的線蟲吸取至清水中漂洗 2-3 次，將線蟲體表附著的福馬林洗淨後，再根據陳氏等⁽⁶⁾之低溫場放射掃描電子顯微鏡 (cryo-field emission scanning electron microscope, JSM-6330F, Jeol, Tokyo, Japan) 處理之方法進行。

線蟲 rDNA 片段序列及形態測量值統計分析

各群釘線蟲 rDNA 片段序列分析方面，以 Vrain 氏等 (1992)⁽¹²⁾ 所設計的通用性引子對 (universal primers) 進行 PCR 增幅 rDNA 片段，另有關萃取線蟲總量 DNA、PCR 增幅 rDNA 片段 (包括完整 5.8S 基因、內轉錄區間 ITS-1 和 ITS-2 及部分 18S 和 28S 基因序列)、標的片段選殖及核酸解序等的方法皆依據陳氏等⁽⁴⁾之報告。至於二種釘線蟲間和其種內各群間的 rDNA 片段序列相同度分析，所採用的分析軟體 (SeqWeb 3.1.2, GCG) 和參數設定值 (gap weight 50, length weight 3) 皆和陳氏等⁽³⁾之報告相同。關於此二種釘線蟲的 rDNA 代表性序列中的 5.8S 基因、ITS-1 及 ITS-2 各別的序列區間位置的推測範圍，其方法是經由和 GenBank 序列資料庫中所登錄之釘線蟲 *Paratylenchus lepidus* (1026 bp, Accession No. EF126178)⁽⁵⁾、*P. minutus* (1052 bp, EF126180) (未發表資料) 及鞘線蟲 *Hemicriconemoides kanayaensis* (1043 bp, Accession No. EF126179) 和 *H. californianus* (1051 bp, Accession No. EU180057)⁽⁷⁾ 等 4 種線蟲的 rDNA 片段序列，以 BestFit program (SeqWeb 3.1.2, GCG) 進行成雙比對後所推估得之，至於本報告中之二種釘線蟲的代表性序列產生方法則詳述於後。另各群釘線蟲間之各項形態測量值差異分析是以 SAS 統計分析軟體 GLM 程序 (1999, V8.2) 進行變方分析。

釘線蟲 rDNA 片段序列之代表性序列

本研究的二種釘線蟲，其各別代表性序列 (一致性序列, consensus sequence) 的產生方式如下：在 5 群 *Gracilacus bilineata* 中 (表一)，從 Gbil2 挑取 3 個選殖體，由 Gbil3 和 Gbil4 2 群各挑取一個選殖體，共計 5 個選殖體進行定序，再由此 5 個 rDNA 片段原始序列以 Pretty program (SeqWeb 3.1.2, GCG) 進行同時多條序

列比對而得到其一致性序列，此序列再經人工檢視修正後為該種釘線蟲之代表性序列 (1036 bp, Accession No. EU247525)。另 4 群的 *G. aculenta* (表三)，從 Gacu1 和 Gacu2 各挑取 3 個選殖體，另從 Gacu3 挑取 1 個選殖體，共計 7 個選殖體進行定序，再由此 7 個 rDNA 片段原始序列以前述相同方法產生其代表性序列 (1021 bp, Accession No. EU247526)。

結 果

Gracilacus bilineata 之鑑定

由台灣地區 5 個竹園所分離的釘線蟲 *Gracilacus bilineata*，其雌蟲的主要形態測量值 (morphometrics) (表一)，除 Gbil3 的 b' 項平均值和其他 4 群有顯著差異 ($P < 0.01$)，其餘各項測量平均值在 5 群間的差異不明顯，其中 b (Gbil3 和 Gbil4 無資料)、VL/VW、V、

表一、台灣地區 *Gracilacus bilineata* 雌蟲族群之形態測量值及其與副模標本之比較

Table 1. Comparison of the morphometrics of *Gracilacus bilineata* female populations collected in Taiwan and the paratypes

Character ¹	Location (Code)					
	Guanshan (Gbil1)	Mingchien (Gbil2)	Chiayi City (Gbil3)	Tsautuen (Gbil4)	Gukeng (Gbil5)	Taiwan ⁴ (paratypes)
n	13	18	11	15	16	7
L (mm)	0.23 ± 0.01 ² b ³ (0.22-0.24)	0.25 ± 0.01a (0.22-0.26)	0.23 ± 0.01b (0.22-0.24)	0.24 ± 0.01a (0.22-0.26)	0.25 ± 0.01a (0.23-0.26)	0.248 ± 0.016 (0.217-0.264)
a	25.2 ± 3.3ab (18.5-30.0)	26.1 ± 1.6a (23.6-28.9)	23.3 ± 0.9b (21.8-24.4)	25.0 ± 1.5ab (22.0-27.8)	26.3 ± 2.1a (23.0-30.0)	24.5 ± 2.2 (21-27)
b	3.9 ± 0.2a (3.6-4.2)	4.0 ± 0.2a (3.9-4.3)	-	-	4.0 ± 0.1a (3.8-4.2)	-
b'	2.5 ± 0.1c (2.3-2.6)	2.5 ± 0.1bc (2.2-2.7)	2.4 ± 0.1d (2.1-2.6)	2.6 ± 0.1a (2.3-2.8)	2.6 ± 0.1ab (2.4-2.7)	2.5 ± 0.1 (2.4-2.7)
VL/VW	7.7 ± 0.4a (7.1-8.4)	7.7 ± 0.5a (7.1-8.8)	7.1 ± 0.5a (6.3-7.9)	7.2 ± 0.8a (5.5-8.5)	7.2 ± 0.8a (6.2-8.9)	-
V	75.1 ± 1.3a (72.6-76.7)	75.5 ± 0.9a (73.8-77.1)	76.1 ± 1.2a (74.6-78.3)	75.0 ± 1.3a (72.7-77.6)	75.6 ± 0.9a (73.8-76.8)	75.5 ± 1.6 (73-78)
Stylet (μm)	45.6 ± 1.9ab (43.0-49.3)	44.9 ± 1.0b (43.0-46.7)	47.1 ± 1.5a (44.7-49.3)	44.9 ± 1.2b (43.0-47.5)	45.2 ± 1.8b (42.7-48.0)	46.2 ± 2.3 (43-50)
EP (μm)	62 ± 5a (58-70)	61 ± 3a (56-67)	59 ± 1a (57-61)	62 ± 3a (59-68)	61 ± 4a (54-65)	57.5 ± 2.7 (53-59)
P	26.2 ± 1.7a (25.0-29.2)	24.3 ± 1.2a (21.9-26.7)	25.2 ± 1.0a (23.8-26.8)	25.5 ± 2.0a (23.6-30.9)	25.0 ± 1.4a (22.5-26.7)	23.1 ± 1.0 (21.8-24.4)
VL (μm)	60 ± 3b (57-65)	64 ± 3a (58-70)	59 ± 3b (54-64)	62 ± 5ab (55-71)	60 ± 4b (56-68)	-
VW (μm)	8 ± 0a (7-8)	8 ± 1a (8-9)	8 ± 1a (8-9)	9 ± 1a (8-11)	8 ± 1a (7-9)	-

¹ n = no. of nematodes; L = body length; a = body length divided by the maximum body 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 centre of median bulb; 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 Brzeski, M. W. 1995⁽²⁾

EP、P 及 VW 等共 6 項的測量平均值在各群間皆無顯著差異。另 2 群雄蟲的測量平均值 (表二) 相當吻合，皆無顯著差異。

在 rDNA 片段序列的比對上，5 個選殖體進行定序後之原始序列大小為 1035-1036 bp，和其代表性序列 (1036 bp) 的相似度為 99.2-99.8%，平均值為 99.5%。另 *G. bilineata* 的代表性序列中，ITS-1、ITS-2 及 5.8S 的序列大小，依序分別為 371 bp、209 bp 及 154 bp。

G. bilineata 雌蟲的外觀短小細長，最大體寬約 $9.6 \mu\text{m}$ ($8-13 \mu\text{m}$)，以活體觀察時，中部食道球瓣、陰門及細長口針相當明顯 (圖一、A)，經福馬林固定後，蟲體則大多呈現向腹面彎曲的魚鈎狀，中部食道球、狹細部 (isthmus)、長梨形的後部食道腺體及長條狀的受精囊 (spermatheca) 則相對清楚，(圖一、B)。唇部無明顯特化且頭部骨架 (cephalic framework) 的構造不發達 (圖一、C)，但在 SEM 下可看到唇部有二個體環，且前端略微凸出 (圖三、A 和 B)。口針結球細小扁平狀，排泄孔位於中部食道球瓣附近 (圖一、C)。尾部末端尖細，微向腹面彎曲。尾部上的肛門 (anus) 開口小，於光學顯微鏡下不易觀察 (圖一、D；圖三、C)。陰門蓋 (vulval flaps) 小型，略突起但不明顯；側帶 (lateral field) 上有三條側線 (incisures)，中間側線紋路較不顯著 (圖三、D)。 *G. bilineata* 雄蟲的體型和長度與雌蟲相近，尾部末端亦呈尖細狀 (圖二、A 和 C)；頭唇部的前端切平，不具口針，食道構造退化，排泄孔位置明顯 (圖二、B)。

Gracilacus aculenta 之鑑定

由台灣地區 4 個竹園所發現的釘線蟲 *Gracilacus aculenta*，其雌蟲的主要形態測量平均值 (表三)，除 Gacu2 的 L、VL/VW 及 VL 等三項，Gacu1 的 b 和 stylet 等二項和其餘 3 群有顯著差異 ($P<0.01$) 外，其餘各項測量平均值在 4 群間無明顯差異。另 2 群雄蟲的測量平均值 (表四)，除 L 和 ABW 二項的平均值無顯著差異外，其他 a、c、c'、spicule 及 Tail 項皆有顯著差異 ($P<0.01$)。

在 rDNA 片段序列的比對上，7 個選殖體進行定序後之原始序列大小為 1020-1025 bp，和其代表性序列 (1021 bp) 的相似度為 99.0-99.9%，平均值為 99.4%。另代表性序列中的 ITS-1、ITS-2 及 5.8S 的序列大小，依序分別為 352 bp、214 bp 及 155 bp。

G. aculenta 雌蟲的外觀短小細長，最大體寬約 $10.0 \mu\text{m}$ ($9-12 \mu\text{m}$)，以活體觀察時，中部食道球瓣、細長口針及排泄孔的位置相當明顯 (圖四、A)，口針結球小、略扁平狀，排泄孔位於中部食道球瓣附近。另線蟲以福馬林溶液固定後，蟲體則大多呈現向腹面彎曲的魚鈎狀，中部食道球、狹細部、後部食道腺體及長條狀的受精囊 (spermatheca) 則相對較清楚，(圖四、B)。唇部無明顯特化，前端平，頭部骨架的構造不發達 (圖四、A)，另在 SEM 下，由側面和正面方向可看到唇部上有體環和極明顯的雙器口 (amphid aperture) (圖六、A 和 B)。尾部末端呈圓鈍狀，微向腹面彎曲，肛門開口小，於光學顯微鏡下不易觀察 (圖四、C；圖

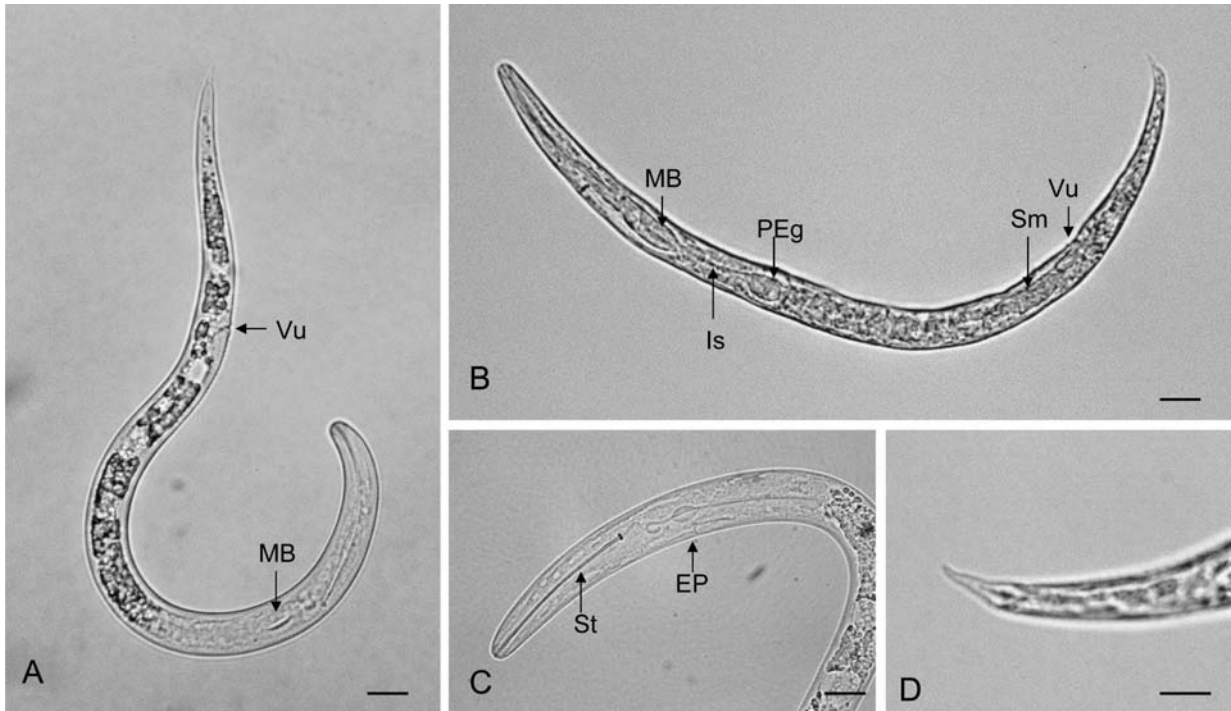
表二、台灣地區 *Gracilacus bilineata* 雄蟲之形態測量值及其與副模標本之比較

Table 2. Comparison of the morphometrics of *Gracilacus bilineata* male populations collected in Taiwan and the paratypes

Character ¹	Location (Code)		
	Tsautuen (Gbil4)	Gukeng (Gbil5)	Taiwan ⁴ (paratypes)
n	12	12	11
L (mm)	$0.27 \pm 0.01^2 a^3$ (0.25-0.29)	$0.26 \pm 0.01 a$ (0.24-0.28)	0.263 ± 0.0178 (0.229-0.284)
a	$30.5 \pm 2.3 a$ (27.0-33.8)	$29.8 \pm 2.4 a$ (26.0-32.5)	26.6 ± 2.0 (23-30)
c	$11.2 \pm 1.6 a$ (9.1-13.9)	$10.7 \pm 1.0 a$ (9.6-13.0)	10.7 ± 0.6 (9.5-11.3)
c'	$3.6 \pm 0.5 a$ (3.0-4.5)	$3.5 \pm 0.4 a$ (2.9-4.5)	3.3 ± 0.3 (2.9-3.9)
Spicule (μm)	$16.8 \pm 0.7 a$ (16.0-18.0)	$16.5 \pm 0.6 a$ (15.7-17.3)	15.6 ± 0.8 (14-17)
EP (μm)	$63 \pm 4 a$ (58-67)	$59 \pm 2 a$ (56-63)	57.3 ± 3.1 (50-62)
P	$23.7 \pm 1.0 a$ (22.3-24.8)	$22.5 \pm 0.8 a$ (21.5-24.0)	21.7 ± 0.9 (20.3-23.5)
Tail (μm)	$24 \pm 4 a$ (18-32)	$24 \pm 2 a$ (20-27)	-
ABW (μm)	$7 \pm 1 a$ (6-8)	$7 \pm 1 a$ (6-8)	-

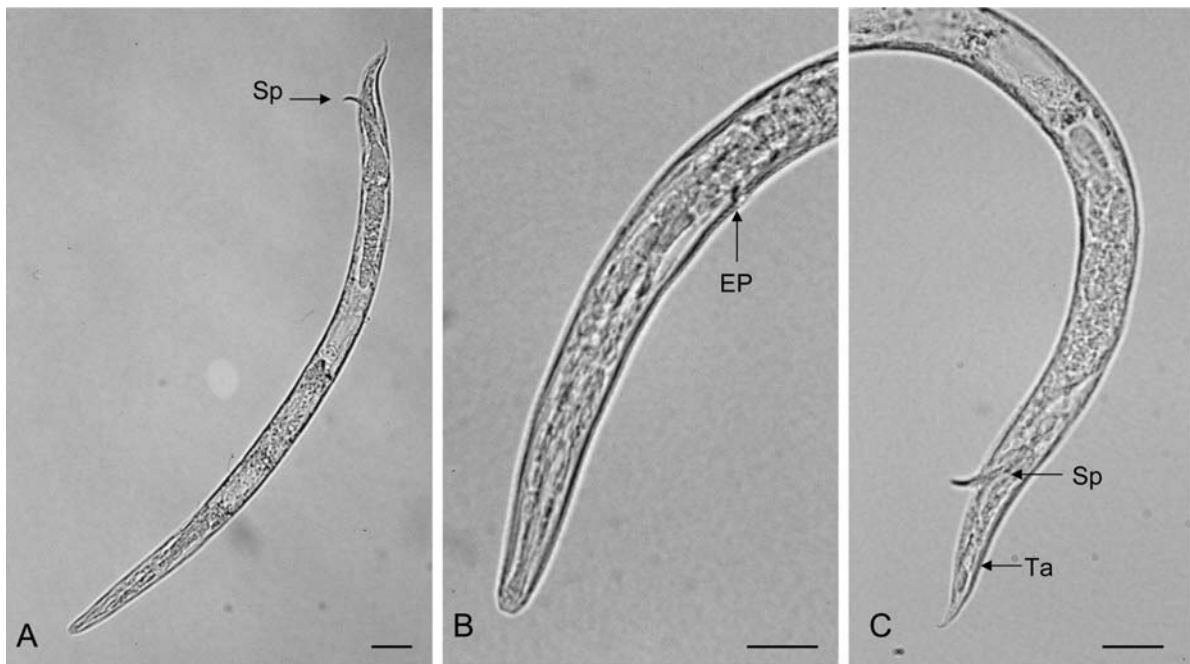
¹ c = body length divided by length of tail; c' = tail length divided by anal diameter of body; ABW = anal body width, the others see table 1.

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



圖一、*Gracilacus bilineata* 雌蟲之光學影像形態。A, 活體時形態 (MB, 中部食道球; Vu, 陰門); B, 固定後形態 (Is, 狹細部; MB, 中部食道球; PEG, 後部食道腺體; Sm, 受精囊; Vu, 陰門); C, 活體頭端部分 (EP, 排泄孔; St, 口針); D, 尾部末端部分。比例尺長度: A-D = 10 微米。

Fig. 1. Photomicrographs of *Gracilacus bilineata* female. A, Live specimen (MB, median bulb; Vu, vulva); B, Fixed specimen (Is, isthmus; MB, median bulb; PEG, post esophageal gland; Sm, spermatheca; Vu, vulva); C, Anterior region of live specimen (EP, excretory pore; St, stylet); D, Tail end. Scale bars in A-D = 10 μ m.



圖二、*Gracilacus bilineata* 雄蟲之光學影像形態。A, 固定後之形態 (Sp, 交接刺); B, 頭端部分 (EP, 排泄孔); C, 後端部分 (Sp, 交接刺; Ta, 尾部)。比例尺長度: A-C = 10 微米。

Fig. 2. Photomicrographs of *Gracilacus bilineata* male. A, Fixed specimen (Sp, spicule); B, Anterior region (EP, excretory pore); C, Posterior region (Sp, spicule; Ta, tail). Scale bars in A-C = 10 μ m.

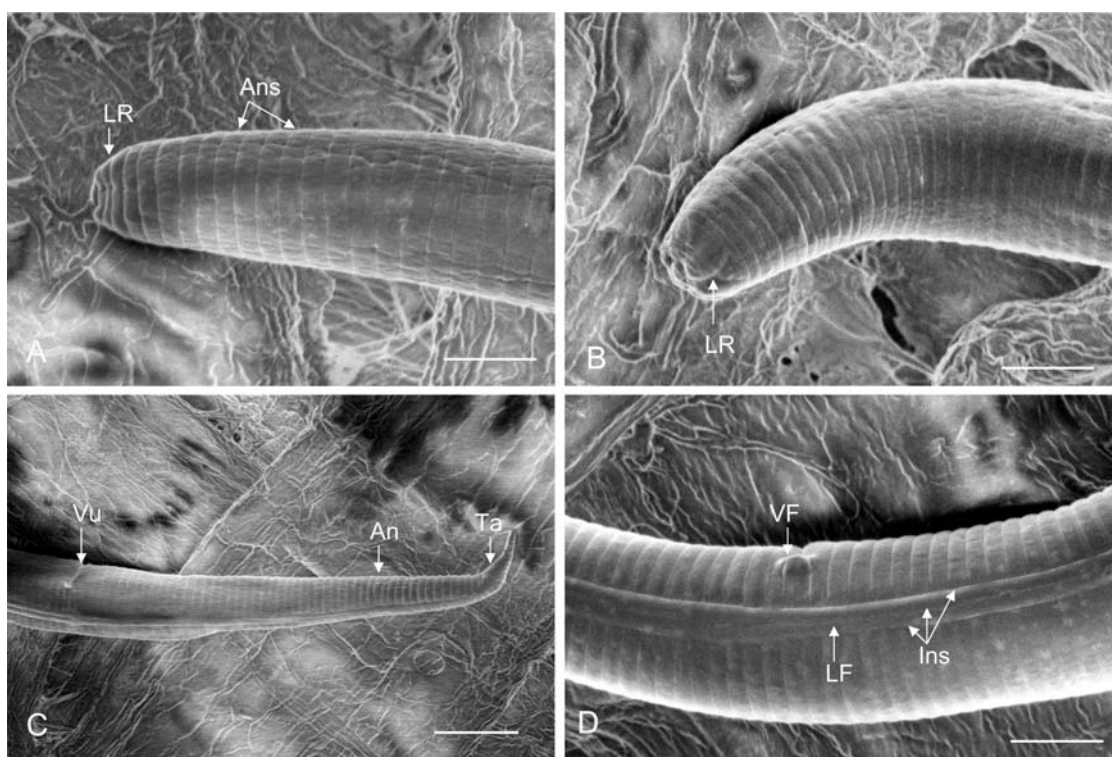
六、C)。陰門蓋小型，無鋸齒狀邊緣，同樣於光學顯微鏡下不易觀察(圖六、D；圖四、C)；側帶上有三條側線，中間側線顯著(圖六、D和E)，寬度約2.0-2.3 mm。*G. aculeata* 雄蟲的體型和長度與雌蟲相近，尾部末端亦呈圓鈍狀(圖五、A和C)；頭唇部的前端切平，不具口針，食道構造退化，但排泄孔的位置明顯(圖五、B)。

討 論

本研究中依據傳統形態測量值所鑑定的5群*Gracilacus bilineata*雌蟲，雖然其中Gb13的b'項的平均值和其他4群有顯著差異，但是該測量項目的範圍值在各群間皆有重疊情形，且5群間的其餘測量項目的平均值皆相當接近。另外在rDNA片段序列分析上，由Gb12,3,4等3群所獲得的5條原始序列，其大小相近(1035-1036 bp)，且與代表性序列(1036 bp)的相似度平均值高達99.5%以上。同樣地，4群的*G. aculeata*雌蟲中，雖然Gacu2的L、VL/VW及VL等三項，以及Gacu1的b和stylet等二項的平均值與其餘

3群間有顯著差異，但是上述測量項目的範圍值在大部分群間有重疊情形，且其餘各項平均值在4群間無明顯差異。另於rDNA片段序列的分析上，由Gacu1,2,3等3群所獲得的7條原始序列，其大小相近(1020-1025 bp)，且與代表性序列(1021 bp)的相似度平均值達99.4%以上。至於這二種釘線蟲之代表性序列間的相似度則只有86.0%。由上述結果分析，本研究確定依形態測量值所鑑定的其中5個線蟲族群皆應屬於同一種釘線蟲*G. bilineata*，另4群為*G. aculeata*。

本研究從台灣地區7處竹園中所分離鑑定的5群釘線蟲*G. bilineata*雌蟲，其形態測量值與副模標本(paratypes)相當一致，在可供比對的測量值項目中，只有EP和P等二項的平均值有較大差異，但是其範圍值有明顯重疊情形，同時在雄蟲方面亦顯示各項測量平均值的差異不大，且範圍值間皆有明顯重疊。*G. bilineata*的體型、頭部和尾部的外觀形態和Brzeski氏(1995)報告⁽²⁾中的形態描述和繪圖所顯現的特徵大部分雷同，唯在該報告中記錄側帶上的側線數目為二條，寬度約1-2 μm ，但在本研究中以光學顯微鏡觀察時，在放大1000倍的油鏡頭下仍無法清楚地辨識側帶



圖三、*Gracilacus bilineata* 雌蟲之SEM影像形態。A和B，蟲體前端部分(Ans，體環；LR，唇部)；C，後端部分(An，肛門；Ta，尾部；Vu，陰門)；D，蟲體中段部分(Ins，側線；LF，側帶；VF，陰門蓋)。比例尺長度：A，B和D=5微米，C=10微米。

Fig. 3. SEM photomicrographs of *Gracilacus bilineata* female. A & B, Anterior region (Ans, Annules; LR, lip region); C, Tail region (An, anus; Vu, vulva; Ta, tail); D, Middle region (Ins, incisures; LF, lateral field; VF, Vulval flap). Scale bars in A, B & D = 5 μm ; C=10 μm .

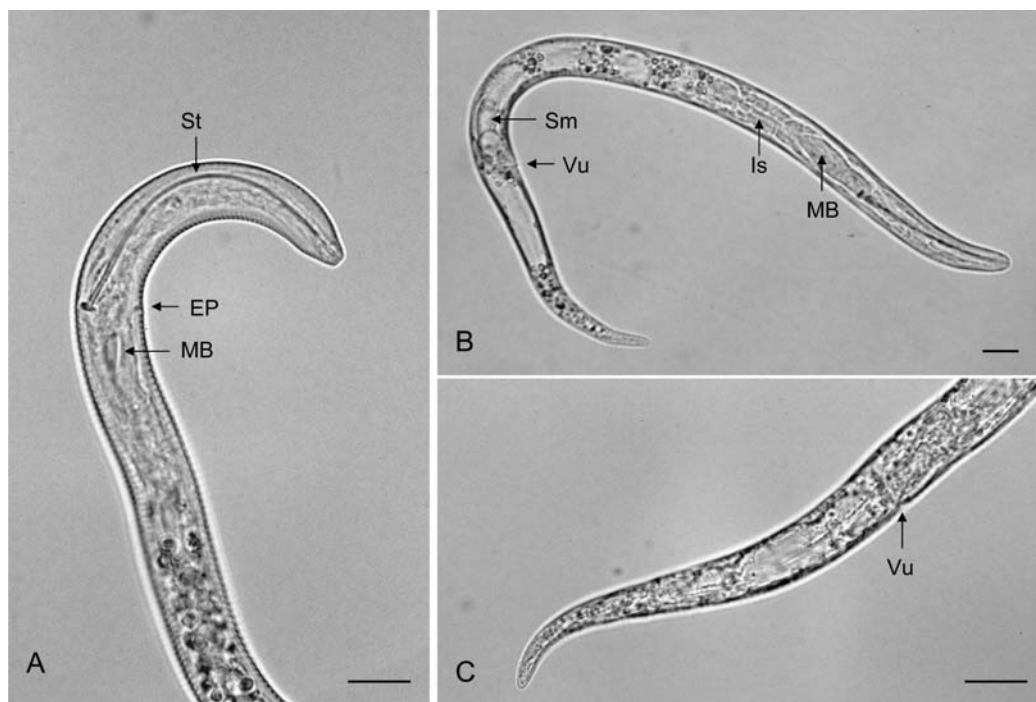
表三、台灣地區 *Gracilacus aculenta* 雌蟲之形態測量值及其與副模標本和一混合標本群之比較Table 3. Comparison of the morphometrics of *Gracilacus aculenta* female populations collected in Taiwan and populations recorded in Canada and USA

Character ¹	Location (Code)					
	Guanshan (Gacu1)	Tsautuen (Gacu2)	Chiayi City (Gacu3)	Baihe (Gacu4)	Canada ⁴ (paratypes)	USA ⁵ (composite dimensions)
n	11	12	15	15	10	
L (mm)	0.25 ± 0.00 ² c ³ (0.24-0.25)	0.28 ± 0.01a (0.26-0.29)	0.26 ± 0.01bc (0.24-0.28)	0.26 ± 0.01b (0.24-0.28)	0.275 ± 0.01 (0.264-0.290)	0.29 (0.24-0.34)
a	24.3 ± 1.9b (20.8-27.8)	27.0 ± 1.6a (24.6-29.0)	25.8 ± 1.5ab (23.6-28.0)	25.3 ± 1.4b (22.5-27.8)	20.9 (20-22)	23 (17-28)
b	3.3 ± 0.1c (3.2-3.5)	3.9 ± 0.2a (3.7-4.3)	3.6 ± 0.2b (3.3-3.8)	3.7 ± 0.1a (3.5-3.8)	-	-
b'	2.2 ± 0.1c (2.2-2.3)	2.4 ± 0.1a (2.3-2.5)	2.3 ± 0.1bc (2.1-2.4)	2.4 ± 0.1ab (2.2-2.5)	2.6 (2.6-2.7)	2.7 (2.3-3.0)
VL/VW	8.2 ± 0.7a (7.4-9.4)	9.4 ± 1.0b (8.0-11.0)	8.5 ± 0.8a (6.8-9.9)	8.6 ± 1.1a (6.4-10.4)	-	-
V	71.3 ± 0.8a (70.5-72.8)	70.3 ± 0.9bc (68.9-71.6)	71.2 ± 0.9ab (69.8-72.9)	70.2 ± 0.8c (68.9-71.9)	71.6 (70.7-73)	72 (69-76)
Styler (μm)	60.3 ± 1.1a (58.7-62.0)	56.5 ± 2.7b (50.7-59.0)	57.5 ± 1.5b (54.0-59.7)	55.6 ± 2.5b (50.3-59.0)	58.1 (54-62)	57 (48-68)
EP (μm)	58,61,64	61 ± 2a (57-63)	62 ± 4a (58-73)	60 ± 3a (55-64)	-	73 (59-89)
P	23.2,24.4,25.6	21.9 ± 0.9b (20.7-23.3)	24.3 ± 1.2a (22.3-26.7)	22.7 ± 1.1ab (21.1-24.6)	-	-
VL (μm)	74 ± 4b (70-82)	86 ± 4a (80-90)	74 ± 5b (68-84)	78 ± 4b (68-83)	-	-
VW (μm)	9 ± 1a (8-10)	9 ± 1a (8-10)	9 ± 1a (8-10)	9 ± 1a (8-12)	-	-

^{1,2,3} See table1.⁴ Brown, G. L. 1959⁽¹⁾⁵ Raski, D. J. 1976⁽¹⁰⁾表四、台灣地區 *Gracilacus aculenta* 雄蟲之形態測量值及其與副模標本和一混合標本之比較Table 4. Comparison of the morphometrics of *Gracilacus aculenta* male populations collected in Taiwan and populations recorded in Canada and USA

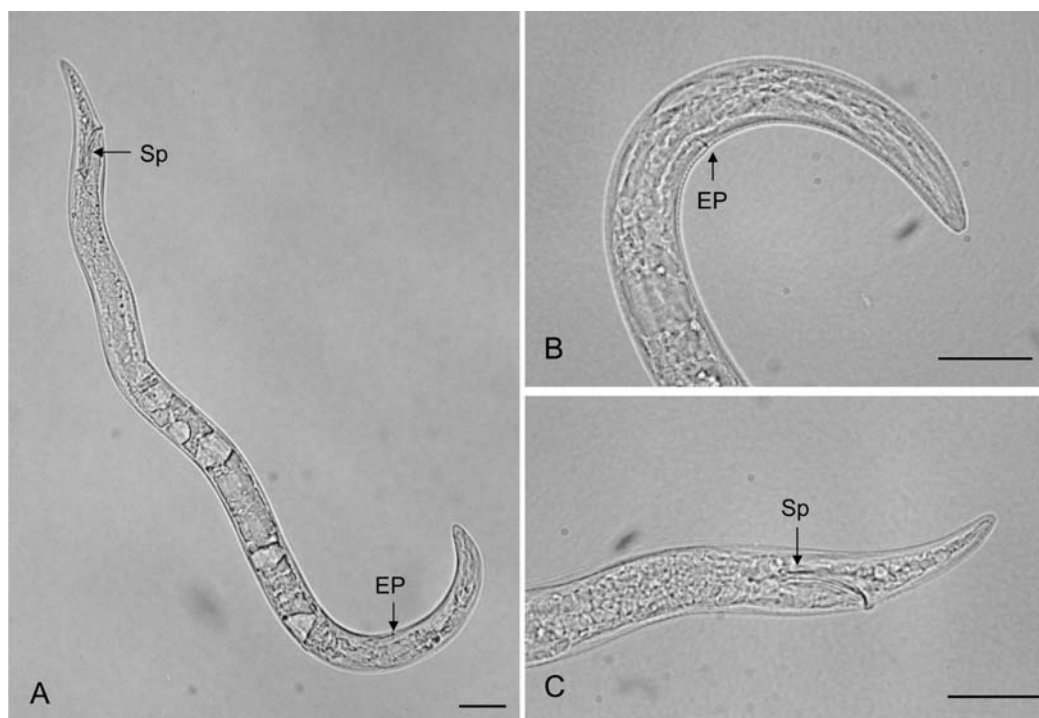
Character ¹	Location (Code)			
	Tsautuen (Gacu2)	Chiayi City (Gacu3)	Canada ⁴ (paratypes)	Composite dimensions USA ⁵
n	15	9	1	
L (mm)	0.29 ± 0.02 ² a ³ (0.25-0.32)	0.28 ± 0.01a (0.25-0.29)	0.308	0.31 (0.26-0.35)
a	28.1 ± 2.2a (23.1-31.3)	31.9 ± 3.3b (26.0-36.3)	23.6	27 (23-30)
c	11.1 ± 1.0a (9.7-13.2)	13.1 ± 1.5b (10.4-15.9)	-	-
c'	3.5 ± 0.3a (3.0-3.9)	2.9 ± 0.5b (1.9-3.4)	-	2.7 (2.3-3.0)
Spicule (μm)	17.0 ± 0.8a (15.8-19.0)	16.1 ± 0.5b (15.3-17.0)	15	18 (15-21)
EP (μm)	61 ± 4 (56-67)	63,58,68	-	66 (54-77)
P	21.0 ± 1.8 (18.7-23.9)	21.7,22.3,23.4	-	-
Tail (μm)	27 ± 3a (22-31)	21 ± 3b (17-27)	-	-
ABW (μm)	8 ± 0a (7-8)	7 ± 1a (6-9)	-	-

^{1,2,3} See table1.⁴ Brown, G. L. 1959⁽¹⁾⁵ Raski, D. J. 1976⁽¹⁰⁾



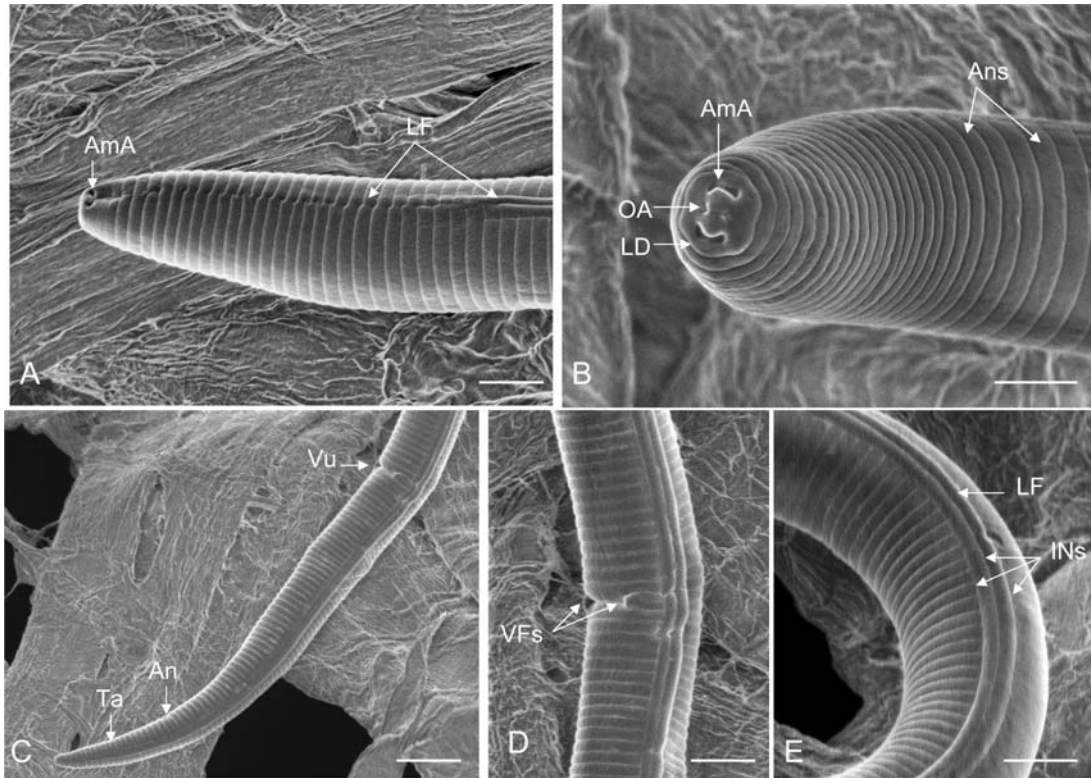
圖四、*Gracilacus aculenta* 雌蟲之光學影像形態。A, 活體時之頭部前端部分 (EP, 排泄孔；MB, 中部食道球；St, 口針)；B, 蟲體固定後形態 (Is, 狹細部；MB, 中部食道球；Sm, 受精囊；Vu, 陰門)；C, 後端部分 (Vu, 陰門)。比例尺長度：A-C = 10 微米。

Fig. 4. Photomicrographs of *Gracilacus aculenta* female. A, Anterior region of live specimen (EP, esophageal gland; MB, median bulb; St, stylet); B, Fixed specimen (Is, isthmus; MB, median bulb; Sm, spermatheca; Vu, vulva); C, posterior region (Vu, vulva). Scale bars in A-C = 10 μ m.



圖五、*Gracilacus aculenta* 雄蟲之光學影像形態。A, 蟲體固定後之形態 (EP, 排泄孔；Sp, 交接刺)；B, 頭端部分 (EP, 排泄孔)；C, 後端部分 (Sp, 交接刺)。比例尺長度：A-C = 10 微米。

Fig. 5. Photomicrographs of *Gracilacus aculenta* male. A, Fixed specimen (EP, excretory pore; Sp, spicule); B, Anterior region (EP, excretory pore); C, Posterior region (Sp, spicule); Scale bars in A-C = 10 μ m.



圖六、*Gracilacus aculenta* 雌蟲之SEM影像形態。A和B, 蟲體前端部分 (AmA, 雙器口; Ans, 體環; LD, 唇盤; LF, 側帶; OA, 口腔開口部); C, 後端部分 (An, 肛門; Ta, 尾部; Vu, 陰門); D和E, 中段部分 (VFs, 陰門蓋; Ins, 側線; LF, 側帶)。比例尺長度: A, B, D & E = 5 微米; C = 10 微米。

Fig. 6. SEM photomicrographs of *Gracilacus aculenta* female. A & B, Anterior region (AmA, amphid aperture; Ans, Annules; LD, labial disc; LF, lateral field; OA, oral aperture); C, Posterior region (An, anus; Ta, tail; Vu, vulva; D & E, Middle region (VFs, vulval flaps; Ins, incisures; LF, lateral field). Scale bars in A, B, D & E = 5 μ m; C = 10 μ m

上的側線數目，但是以 SEM 可觀察到側帶中間仍有一條側線，其紋路和側帶外緣二條側線相對不明顯。另外上述該報告記錄該釘線蟲無陰門膜，而本研究在放大 1000 倍率下亦無法觀察到該構造，但是以 SEM 卻可發現略微突起的陰門蓋。

在 *G. aculenta* 的鑑定上，從台灣地區所分離到的 4 群釘線蟲 *G. aculenta* 雌蟲，其形態測量值與在加拿大“Lake Lenore”地區，從牧草區 (grass sod) 的根系上所分離的副模標本 (paratypes)⁽¹⁾ 大部分相當一致，在可供比對的測量值項目中，只有 a 和 b' 等二項的平均值有較大差異，其中 b' 項的範圍值沒有重疊情形，至於和 Raski 氏 (1976) 報告中⁽¹⁰⁾，由 5 個地區的線蟲樣本的測量值所綜合的測量資料相比，大部分測量值亦相當一致，其中只有 b' 和 EP 等二項的平均值有較大差異，但是其範圍值皆有重疊情形。在雄蟲的比對上，僅有 1 隻副模標本的測量值可供比較，至於和上述 Raski 氏的報告相比，5 個測量項目的平均值皆相當接近，且範圍值間皆有明顯重疊。本研究所鑑定的 *G. aculenta*，無論其體型大小、頭唇部和尾部後端的外觀

形態等，大部分符合 Brown 氏 (1958) 報告中對該新種 (new species) 的形態描述和繪圖上所顯現的特徵，唯在該報告中記錄陰門側邊無陰門蓋構造⁽¹⁾，但是後來 Raski 氏 (1976) 的報告中則指出⁽¹⁰⁾，來自不同地區和寄主植物的少部分線蟲樣本有不明顯的陰門蓋存在。在本研究中以光學顯微鏡觀察時，在放大 1000 倍的油鏡頭下仍無法清楚地辨識陰門蓋是否存在，但是以 SEM 方法可觀察到小型的陰門蓋，其構造比 *G. bilineata* 者明顯。陳氏等 (2007)⁽⁵⁾ 鑑定茶園中的釘線蟲 *Paratylenchus lepidus*，其陰門蓋屬於大型，同本研究的方法步驟所處理的線蟲樣本，在放大 1000 倍的光學顯微鏡下，上下調整焦距，即可容易地清楚觀察到該種釘線蟲的陰門蓋構造。另 *G. aculenta* 的側帶上具有 3 條側線，本研究在光學顯微鏡下，以放大 1000 的倍率即可清楚看到 3 條側線存在，另以 SEM 方法觀察時，側帶中間的側線紋路，相對地比 *G. bilineata* 者為清楚且深。

釘線蟲 *G. bilineata* 和 *G. aculenta* 二者的體型大小、靜止或殺死固定後的整體外觀形態皆極為近似，

而其主要區別在於尾部末端的形態，然此一特徵在一般放大 20-80 倍的解剖顯微鏡下仍很難加以辨識，必需在放大 400 倍的光學顯微鏡下，方可依據尾部末端形態加以初步區分。本研究進行調查鑑定的 7 個竹園，其中於台東關山鎮和嘉義市各一處竹園的一包根圈土壤中，同時分離到該二種釘線蟲，由此推測 *G. bilineata* 和 *G. aculeata* 在竹園或其他寄主植物的根圈土壤中同時存在的可能性很高。另外本研究為首次將此二種釘線蟲的完整 5.8S 基因和內轉錄區 (ITS-1, ITS-2)，以及部分 18S 和 28S 基因的序列登入 GenBank (NCBI) 資料庫中，而此一序列資料除了可做為該二種釘線蟲的生命條碼 (barcode of life)，以提供釘線蟲鑑定上較為客觀的輔助鑑別依據外，亦可分析內轉錄區間序列的差異程度，設計開發具種專一性的引子對 (species-specific primers)。另外，結合單獨一隻線蟲基因體的萃取技術，在未來將能更正確、簡單及快速地進行全國性的釘線蟲調查鑑定工作。

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. Brown, G. L. 1959. Three new species of the genus *Paratylenchus* from Canada (Nematoda: Criconeematidae). *Proc. Helminth. Soc. Wash.* 26: 1-8.
2. Brzeski, M. W. 1995. Paratylenchinae: morphology of some known species and descriptions of *Gracilacus bilineata* sp. n. and *G. vera* sp. n. (Nematoda: Tylenchulidae). *Nematologica* 41: 535-565.
3. 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)
4. 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)
5. Chen, D. Y., Ni, H. F., Yen, J. H., and Tsay, T. T. 2007. Identification of a new recorded pin nematode, *Paratylenchus lepidus*, (Nematoda: Criconeematidae, Tylenchulidae) among tea plantations in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 16: 41-46. (in Chinese with English abstract)
6. Chen, D. Y., Ni, H. F., and Tsay, T. T. 2007. Identification of a new recorded stunt nematode *Tylenchorhynchus zae* (Nematoda: Belonolaimidae) in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 16: 79-86. (in Chinese with English abstract)
7. Chen, D. Y., Ni, H. F., Yen, J. H., and Tsay, T. T. 2007. Identification of *Hemicriconeematoides kanayaensis* and *H. californianus* (Nematoda: Criconeematidae, Criconeematidae) among tea plantations in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 16: 181-192. (in Chinese with English abstract)
8. 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)
9. Raski, D. J. 1962. Paratylenchidae n. fam. with description of five new species of *Gracilacus* n. g. and an emendation of *Cacopaurus* Thorne, 1943, *Paratylenchus* Micoletzky, 1922 and Criconeematidae Thorne, 1943. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* 29: 189-207.
10. Raski, D. J. 1976. Revision of the Genus *Paratylenchus* Micoletzky, 1922, and descriptions of new species. Part III of Three parts. - *Gracilacus*. *J. Nematol.* 8: 97-115.
11. Raski, D. J., and Luc, M. 1987. A reappraisal of Tylenchina (Nemata) 10. The superfamily Criconeematidae Taylor, 1936. *Revue Nematol.* 10: 409-444.
12. Vrain, T. C., Wakarchuk, D. A., Levesque, C. A., and Hamilton, R. I. 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundam. Appl. Nematol.* 15: 563-573.

ABSTRACT

Chen, D. Y.¹, Ni, H. F.², Tsay, T. T.³, and Yen, J. H.^{4,5}. 2008. Identification of *Gracilacus bilineata* and *G. aculeata* (Nematoda: Criconematoidea, Tylenchulidae) among bamboo plantations in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 17: 209-219. (¹ Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan; ² Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Station, ARI, Taiwan; ³ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ⁴ Agricultural Extension Center, NCHU, Taichung, Taiwan; ⁵ Corresponding author, E-mail: jhyen@nchu.edu.tw , Fax: +886-4-2286-0267)

Nine populations of *Gracilacus* spp. have been isolated by modified Baermann funnel method from the rhizosphere soil of bamboo plants among 7 plantations in Taiwan since September, 2005. Comparisons of the morphology, morphometrics and ribosomal DNA fragment sequences (include full 5.8S gene, ITS-1, ITS-2 and partial 18S and 28S gene) have yielded 5 populations as *G. bilineata* Brzeski, 1995 and 4 populations as *G. aculeata* (Brown, 1959) Raski, 1962. *G. aculeata* was the first report in Taiwan. In this study, additional SEM photographs clearly revealed 3 incisures on lateral field, and the existence of small vulval flaps for these two pin nematode species. The representative sequences of rDNA fragment of *G. bilineata* and *G. aculeata* had the size of 1036 bp and 1021 bp, respectively, and were firstly submitted to GenBank.

Key words: pin nematode, bamboo, identification, vulval flaps, ribosomal DNA, *Gracilacus bilineata*, *Gracilacus aculeata*