

# 台灣地區葉芽線蟲 *Aphelenchoides besseyi* 族群之種內變異

曾巧燕<sup>1</sup> 林奕耀<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 台中市 國立中興大學植物病理系

<sup>2</sup> 通訊作者，傳真：04-22876712

接受日期：中華民國 94 年 2 月 22 日

## 摘要

曾巧燕、林奕耀. 2005. 台灣地區葉芽線蟲 *Aphelenchoides besseyi* 族群之種內變異. 植病會刊 14:67-75.

分別測量由烏日、大湖、嘉義分離之水稻葉芽線蟲 (Ar)、草莓葉芽線蟲 (As)、山蘇花葉芽線蟲 (Af) 及中興大學植病系線蟲室保存之水稻葉芽線蟲 (Ab)，經形態鑑定皆為 *Aphelenchoides besseyi*。另以掃描式電子顯微鏡觀察線蟲體表細微構造顯示四者間無差異。對山蘇花、草莓、水稻及秋石斛等之病原性測試結果顯示，四者皆可感染草莓與水稻，僅 Af 對山蘇花具病原性，As 則無法感染秋石斛。交叉交配試驗的結果為各處理皆有子代產生，且子代仍然具有繁殖產生後代的能力。子代與親代之形態無差異，且各子代對草莓均有病原性，僅有 Afs、Afb 及 Afr (以 Af 為雄性父本雜交產生之子代) 對山蘇花有病原性。除 Afr 及 Arf 之外，其他子代中皆無雄蟲存在。本研究發現，將 Ab 和 As 培養在 *Alternaria citri* 後，兩者均產生孤雌生殖現象，與 Huang 氏等報告之 *A. besseyi* 只行兩性生殖迥異。由隨機增幅核酸多型性分析 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 的結果可看出，利用隨機引子 S4、S7 與 S8 增幅出之片段，Af 與 As、Ar、Ab 差異大，As 和 Ab 差異小。以共同引子對 18S/26S 增幅葉芽線蟲之核糖體核酸內轉錄區間 (internal transcribed spacer, ITS)，可得一大約 1,000 bps 的增幅產物，經酵素 *Rsa* I 剪切後，Af 可得一大約 1,000 bps 的片段，As 與 Ab 為約 700 bps 的片段，Ar 為約 800 bps 的片段。由本研究結果可知，台灣地區之葉芽線蟲 *A. besseyi* 族群於生理特性、病原性及分子序列上確實存在變異情形，但此變異與寄主或來源地區之相關性仍有待進一步探討。

關鍵詞：葉芽線蟲、*Aphelenchoides besseyi*、種內變異

## 緒言

*Aphelenchoides besseyi* Christie 廣泛分佈在世界上大部份的稻作區，寄主包含 35 屬以上的高等植物及多種腐生與植物病原真菌，可引起水稻白尖病和草莓縮芽病<sup>(11, 20)</sup>等。其以外寄生或內寄生方式取食寄主植物之莖、葉和芽苞內的分生組織或柔軟組織<sup>(31)</sup>。

*A. besseyi* 於台灣地區之危害程度，以草莓與水稻為最嚴重，於秋石斛<sup>(2)</sup>及山蘇花<sup>(3)</sup>栽培田也發生 *A. besseyi* 危害嚴重之災情。目前尚無 *A. besseyi* 具有生理小種 (biological race) 的文獻記載，但許多研究報告結果顯示，不同寄主分離得到之 *A. besseyi* 在病原性與致病力上的表現不盡相同<sup>(3, 6, 19, 22)</sup>。本研究針對台灣之水稻、草莓及山蘇花葉芽線蟲進行形態、生理與生態等相關研究，以瞭解台灣地區之葉芽線蟲 *A. besseyi* 是否產生種內變異 (variation)。

## 材料與方法

### 葉芽線蟲之分離與培養

供試之葉芽線蟲分別由烏日水稻田、大湖草莓園、嘉

義山蘇園的罹病株及中興大學植病系線蟲室取得 (以下別簡稱為 Ar、As、Af 與 Ab)。將線蟲培養在已長滿柞黑腐病病原真菌 (*Alternaria citri* Ell. & Pierce) 的馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (Potato dextrose agar, PDA) 斜面試管中。置於溫中 (25 °C) 進行大量繁殖，每兩週更新培養一次，以供接種源與形態鑑定之用。所有供試蟲源皆完成柯霍氏則。

### 葉芽線蟲形態比較

葉芽線蟲之形態觀察與測量：挑取自罹病組織中所得和培養於 *A. citri* 菌絲 PDA 斜面試管中之線蟲，經水熱殺處理後，在光學顯微鏡下進行鏡檢，拍照記錄其要鑑定依據的部位，並以接目測微器 (ocular micrometer)，依據 de Man's formula<sup>(8, 13)</sup> 測量線蟲各部的比例長度。取雌蟲及雄蟲各 50 隻，測量其範圍，求平均值。

葉芽線蟲之掃描式電子顯微鏡形態觀察：將培養於 *A. citri* 菌絲 PDA 斜面試管中的線蟲，以改良式柏門氏滲分離法收集後，用無菌水漂洗三次，吸取 200 隻線蟲，熱殺後置於標本瓶中備用。於載臺貼上雙面膠後，將絨以乳頭吸管吸取至拭鏡紙上，待水稍乾，將拭鏡紙貼至臺上，蓋上蓋子，以液態氮處理一分鐘，取出載臺置入

溫場掃描式電子顯微鏡 (JEOL JSM-6330F)，觀察線蟲體表之細微構造，並照相記錄。

### 溫度對病原線蟲繁殖之影響

以無菌水洗出試管中大量培養之葉芽線蟲 Ar、As、Af 與 Ab，以消毒過之玻璃吸管吸取 20 隻線蟲，分別注入長滿 *A. citri* 菌絲之 PDA 斜面上，置於 4、6、8、12、16、20、22、24、25、28、30、32、36 和 40 的恆溫箱中培養，一週後將試管中的線蟲以無菌水洗出，計算線蟲數量，每處理 5 重複。

### 葉芽線蟲之生活史

各挑取 10 隻成熟母蟲至長滿 *A. citri* 之 PDA 斜面試管，於 28℃ 定溫下培養，自第三天起，每天取 5 管以無菌水將線蟲洗出，並記錄蟲數，直到成蟲數多於 10 隻為止。

### 寄主範圍測試

供試植物種類為：山蘇花 (*Asplenium nidus* L.)、草莓 (*Fragaria ananassa* Duch.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、蘆薈 (*Aloe barbadensis* var. *chinensis* (Haw) Berger)、蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* Reichb.f.)、大岩桐 (*Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern)、菊花 (*Chrysanthemum morifolium* L.)、鐵砲百合 (*Lilium longiflorum* (Thunb.) Oster-Lilie)、石蓮 (*Echeveria elegans* Rose)、觀音蓮 (*Alocasia sanderiana* Bull.)、火鶴花 (*Anthurium andraenum* Lindl.)、四季海棠 (*Begonia semperflorens* Link & Otto)、春石斛 (*Dendrobium nobile* Gruppe)、秋石斛 (*Dendrobium bigibbum* Lindl.)、虎耳草 (*Saxifraga stolonifera* Meerb.)、晚香玉 (*Polianthes tuberosa* L.)。其中草莓由自大湖田間採得之匍匐莖育成；水稻為台農 67 號由種子育苗；其餘供試植物由田尾購得。線蟲來源為 Ar、As、Af 及 Ab。

水稻在育苗一週後，用消毒過之玻璃吸管分別吸取指形管內之線蟲各 500 隻，緩緩滴入葉鞘內，並保持水分；吸取 500 隻線蟲滴於草莓生長中之芽苞處，並保持水分；其他供試植物則以消毒過之醫用解剖刀於植株葉片及心芽製造傷口後，吸取 500 隻線蟲滴於傷口處，蓋上溼濾紙片，一天後將紙片取下。接種之植物置於溫室培養，每日觀察其病徵發展。

### 葉芽線蟲的交配試驗

於無菌操作檯中，以無菌水洗出於長滿 *A. citri* 的 PDA 斜面上培養二週的 Ar、As、Af 與 Ab，製成線蟲懸浮液，在解剖顯微鏡下，用消毒過之拉細玻璃吸管吸取 Ar 幼蟲 1 隻，再吸取 As 雄蟲 5 隻，注入長滿 *A. citri* 菌絲之 PDA 斜面上，置於室溫下進行交配試驗，並以同種之幼蟲 1 隻和雄蟲 5 隻的交配試驗，及單隻幼蟲、五隻雄蟲獨自培養做為對照，定期觀察是否有後代產生，每一處理 5 重複。對另三種葉芽線蟲亦進行相同的交叉交配試驗。

將交配試驗所得子代，Afs: Af 雄蟲 × As 幼蟲；Afr: Af 雄蟲 × Ar 幼蟲；Afb: Af 雄蟲 × Ab 幼蟲；Arf: Ar 雄蟲 × Af 幼蟲；Ars: Ar 雄蟲 × As 幼蟲，利用前面所述方法，進行形態觀察、測量及病原性測試。

### 葉芽線蟲雌雄比觀察

以 5 毫升無菌水將培養於試管兩週的 Ar、As、Af、Ab、Afs、Afr、Afb、Arf 和 Ars 洗出，每次取一毫升線蟲懸浮液置入直徑 6cm 鏡檢皿中，於解剖顯微鏡下觀察、記錄雄蟲及雌蟲數目，並計算其雌雄比。每個處理 5 重複，試驗進行兩次。

### DNA 的萃取

以無菌水將線蟲從培養之試管管壁上洗出，*A. citri* 則利用消毒過的挑直針由 PDA 斜面上刮下。線蟲和真菌總量 DNA 的萃取是利用 Tissue & Cell genomic DNA Purification Kit (DP021) (GeneMark, Tainan, Taiwan) 依標準流程進行。

### 葉芽線蟲隨機增幅核酸多形性 (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 與 rDNA 片段的增幅

萃取 15 個不同族群之葉芽線蟲與 *A. citri* 之總量 DNA 作為模板，其中兩個族群為山蘇花葉芽線蟲 (Af、Af')，一個為草莓葉芽線蟲 (As)，八個為水稻葉芽線蟲 (Ar、Ab、Ark、Ar1、Ar2、Ar3、Ar4、Ar5)，以及四個交配試驗的子代 (Ars、Arf、Afs、Afb)，利用 10 對隨機引子：S1(5'-GTTTCGCTCC-3')、S2(5'-TGATCCCTGG-3')、S3(5'-CATCCCCCTG-3')、S4(5'-GGACTGGAGT-3')、S5(5'-TGCGCCCTTC-3')、S6(5'-TGCTCTGCC-3')、S7(5'-GGTGACGCAG-3')、S8(5'-GTCCACACGG-3')、S9(5'-TGGGGACTC-3') 和 S10(5'-CTGCTGGGAC-3') (Operon Technologies, Alameda, CA, U.S.A.) 進行隨機增幅。

葉芽線蟲的 rDNA 片段為依據 Vrain 氏等<sup>(30)</sup> 所設計之 18S 與 26S 引子對進行增幅。以 200 μl 微量離心管盛裝預備進行 RAPD 的反應物，取約 100 ng 的線蟲 DNA 作為模板，加入 25 μl PCR 混合液 (Tag DNA polymerase 0.5 單位, 1.5 μM MgCl<sub>2</sub> polymerase buffer, 800 μM dNTP, and 1 μM 隨機引子)，各添加試劑經充分混合後，將微量離心管置入自動溫度循環控制器 (Perkin Elmer, Gene Amp PCR system 9600) 進行反應，共 35 個循環反應，第 1 至第 34 個循環設定為 94℃ 1 分鐘；35℃ 1.5 分鐘；72℃ 2 分鐘，第 35 個循環控制為 72℃ 10 分鐘，最後於 4℃ 中停止反應。取 10 μl PCR 產物以 1.2% 瓊脂凝膠 (agarose gel) 進行電泳分析。

### 葉芽線蟲 rDNA 片段限制酵素圖譜分析

將 PCR 增幅出的 rDNA 片段，以 *Rsa* I、*Hae* III 以及 *Eco* RI 三種限制酵素進行剪切 (digestion)，在 1.5 ml 微量離心管中分別加入 1 μl 10x buffer、5.5 μl 無菌水、2.5 μl PCR 產物，每管加入上述一種限制酵素 1 μl 並混和均勻，置於 37℃ 反應，以 1.5% agarose gel 進行電泳檢視。

## 結果

### 葉芽線蟲形態比較

葉芽線蟲的形態觀察與測量：於光學顯微鏡下觀察 Af、As 與 Ar 的形態如下，線蟲頭部稍隆起；口針細，節

球小；中部食道球幾乎與體寬同寬；尾端有分叉；雌蟲陰門開口位於蟲體 2/3 處，單卵巢；雄蟲尾部可見交接刺但無交接囊。三者之形態測量值，皆界於 *A. besseyi* 的標準範圍<sup>(12)</sup> 內(表一)。

掃描式電子顯微鏡形態觀察：電子顯微鏡觀察結果顯示，三者主要的鑑定依據之形態一致，口唇部圓，且較身

體寬；側線皆為四條；尾部分叉數均為 3-4 個(圖一)，此依據形態可以確定種的分類地位皆為 *A. besseyi*。

### 溫度對 *Aphelenchoides besseyi* 繁殖之影響

溫度試驗的結果(圖二)，4、6、8、12、36 與 40 各溫度處理，Af、As、Ar 與 Ab 皆無

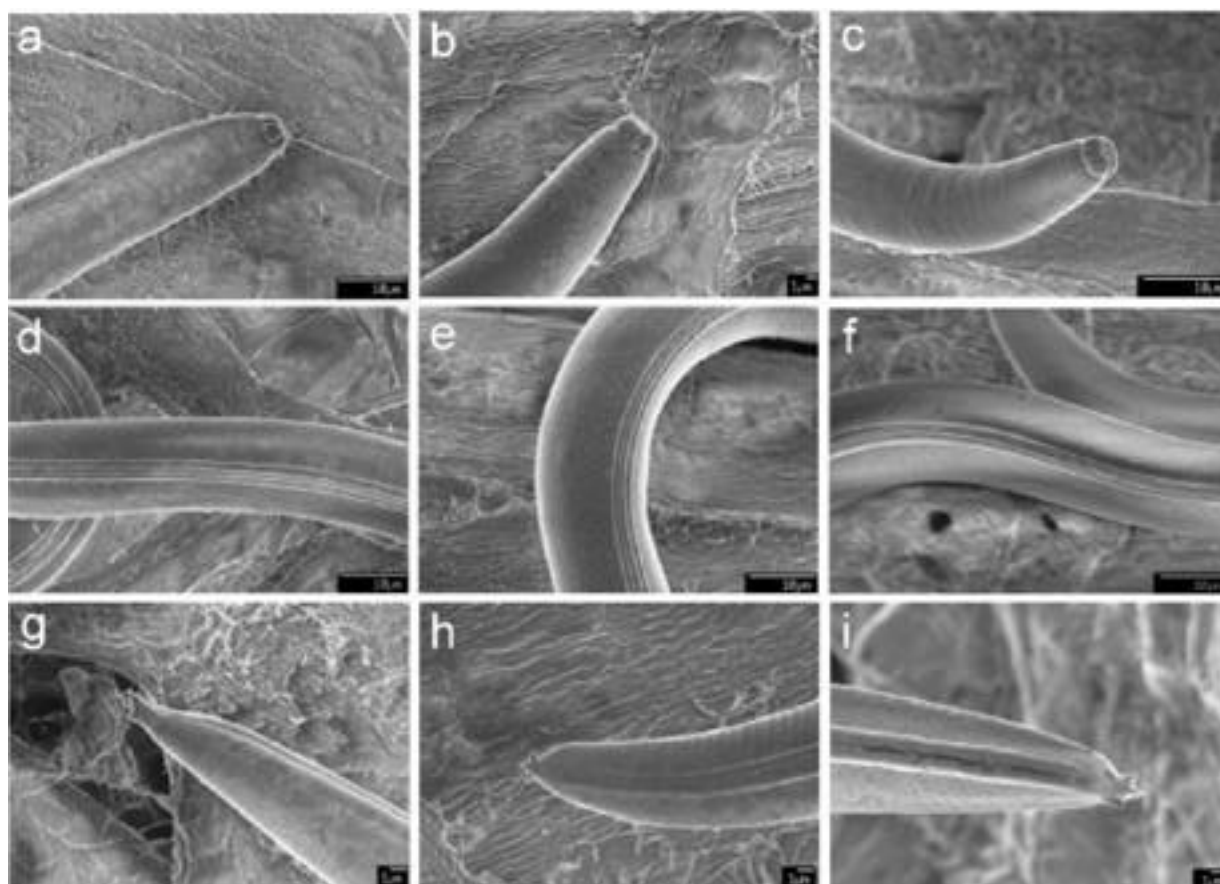
表一、親代與子代葉芽線蟲之形態測量值

Table 1. The morphometrics of parents and offspring of *Aphelenchoides besseyi* cultivated on PDA slant with *Alternaria citri*<sup>1</sup>

Characters	parents				offspring					Franklin and Siddiqi, 19
	Af	As	Ar	Ab	Afs	Afb	Afr	Arf	Ars	
L (mm)	0.73 bcd <sup>2</sup>	0.64 e	0.88 a	0.68 cde	0.66 de	0.74 bc	0.77 b	0.78 b	0.73 bcd	0.57-0.88
a	45 a	30 cd	41 ab	30 c	28.17 cde	25.03 de	37.8 5b	39.3 b	23.8 e	32-58
b	4.8 ab	4.2 c	5.0 a	4.4 bc	4.35 bc	4.61 abc	5.00 a	4.88 ab	4.43 bc	9-13.1
c	17 ab	15 b	17 a	15 b	15.22 b	16.33 ab	16.65 ab	16.14 ab	15.35 b	14-21
V (%)	69.9 ab	69.0 ab	68.2 b	69.9 ab	68.23 b	70.95 a	69.54 ab	68.60 ab	69.29 ab	66-73.6
S <sub>2</sub> (μm)	12.9 b	13.8 ab	14.08 ab	13.6 ab	14.8 a	14.0 ab	14 ab	12.8 b	14.5 a	10.0-12.5

<sup>1</sup> Data are means of fifty nematodes. Af: nematode isolated from fern; As: nematode isolated from strawberry; Ar: nematode isolated from rice; Ab: *A. besseyi* from plant nematology lab.; Ars, Arf, Afb, Afr and Afs are offspring from the mating test. L = total body length; total body length divided by the maximum body width; b = total body length divided by the oesophageal length; c = total body length divided by the tail length; V = the percentage of the distance from head end to vulva divided by the body length; S<sub>2</sub> = total stylet length

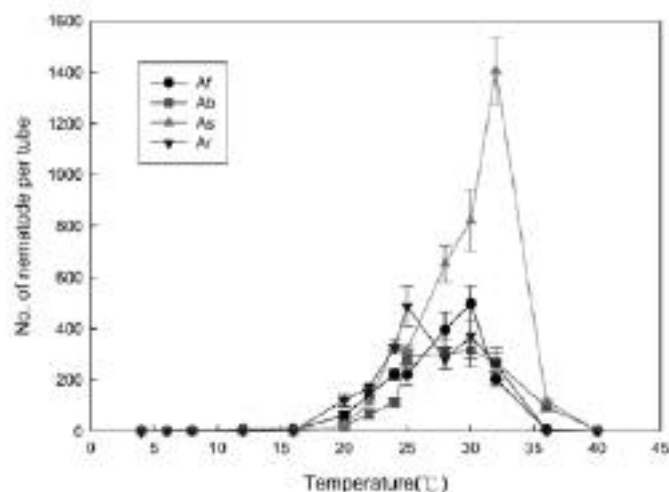
<sup>2</sup> Means followed by the same letter within rows are not significantly different according to Duncan's multiple test ( $p=0.01$ ).



圖一、以掃描式電子顯微鏡觀察 *Aphelenchoides besseyi* 之外部形態特徵。

Fig 1. SEM observation of *Aphelenchoides besseyi*. a, b, c; d, e, f; and g, h, i were anterior regions, lateral fields and tails of As and Ar respectively. Af: nematode isolated from fern; As: nematode isolated from strawberry; Ar: nematode isolated from rice.

生存，20 開始有繁殖現象；Af 之最適生長溫度為 30，24 時，族群中雄蟲數有變少的跡象；As 之最適生長溫度為 32，各處理溫度皆無雄蟲存在；Ar 之最適生長溫度為 25，20 時，族群中無觀察到雄蟲存在；Ab 之最適生長溫度為 28-30，各處理溫度皆無雄蟲存在。



圖二、溫度對試管培養之葉芽線蟲族群密度之影響。  
Fig 2. Effect of temperature on the reproductions of three foliar nematodes isolated from fern (Af), strawberry (As) and rice (Ar, Ab) cultivated on PDA slant with *Alternaria citri*. Twenty foliar nematodes were transferred onto slant culture of *A. citri* on PDA. After inoculation for 1 week, nematodes in each test tube were collected by washing with water and the population was determined using a stereomicroscope.

表二、供試葉芽線蟲之寄主範圍測試

Table 2. Host range test of *Aphelenchoides besseyi* (Af, As, Ar and Ab)

Scientific name of Plant (Chinese)	Af <sup>1</sup>	As	Ar	Ab	CK
<i>Alocasia sandneriana</i> (觀音蓮)	-	-	nd	-	-
<i>Aloe barbadensis chinensis</i> (蘆薈)	+	+	-	-	-
<i>Anthurium andraenum</i> (火鶴花)	-	-	-	-	-
<i>Asplenium nidus</i> (山蘇花)	+	-	-	-	-
<i>Begonia semperflorens</i> (四季海棠)	+	-	nd	+	-
<i>Chrysanthemum morifolium</i> (菊花)	+	+	+	+	-
<i>Dendrobium bigibbum</i> (秋石斛)	+	-	+	+	-
<i>Dendrobium nobile</i> (春石斛)	+	+	+	+	-
<i>Echeveria elegans</i> (石蓮)	+	+	+	-	-
<i>Fragaria ananassa</i> (草莓)	+	+	+	+	-
<i>Lilium longiflorum</i> (鐵砲百合)	-	-	-	-	-
<i>Oryza sativa</i> (水稻)	+	+	+	+	-
<i>Phalaenopsis aphrodite</i> (蝴蝶蘭)	-	-	-	-	-
<i>Polianthes tuberosa</i> (晚香玉)	-	-	-	-	-
<i>Saxifraga stolonifera</i> (虎耳草)	+	+	+	+	-
<i>Sinningia speciosa</i> (大岩桐)	+	+	+	+	-

<sup>1</sup> Nematodes were dripped into the bud of strawberry, the leaf sheath of rice, and the cut of others. Af: foliar nematode isolated from fern; As: foliar nematode isolated from strawberry; Ar and Ab: foliar nematode isolated from rice; CK: *A. citri*. "+", showing symptom.; "-", without symptom.; "nd", no data.

## 葉芽線蟲之生活史

葉芽線蟲完成生活史須經卵期，卵內一齡幼蟲褪皮為二齡幼蟲後孵化，再經兩次褪皮成為成蟲。Af 於第五天時成蟲數為 12.8 隻，且可觀察到雄蟲存在，第六天時成蟲數遽增至 42.8 隻，生活史約為 5 天；As 於第四天時成蟲數為 9.8 隻，第五天時成蟲數為 42.8 隻，生活史約 4-5 天；Ar 於第五天時成蟲數為 9.75 隻，且可觀察到雄蟲存在，第六天時成蟲數為 54.5 隻，生活史約 5-6 天；Ab 於第四天時成蟲數為 2 隻，第五天時成蟲數為 37.2 隻，生活史為 5 天。

## 寄主範圍測試

寄主測試結果如表二。以製造傷口方式接種葉芽線蟲之山蘇花，一週後，沿著傷口附近可見褐色有黃暈之壞疽，病斑隨時間擴展並轉成黑褐色（圖三a）。將線蟲懸浮液滴於草莓芽苞及水稻幼苗葉鞘內，第二週即見草莓新葉有皺縮變小現象，水稻則於第五週時，葉片間端有 1-2 公分白化病徵（圖三b, c）。秋石斛於接種 Ar 十天後，葉片出現油狀黃褐色與灰黑色病斑，病斑發展快速，第十五天葉片即乾枯且薄質化（圖三d），接種 Ab 之葉片於第二十二天表現病徵，而 Af 則在秋石斛造成黑色壞疽斑，病斑擴展速度極為緩慢，病斑出現一週後，仍無明顯擴大現象。接種第三天，菊花葉片沿著傷口出現深色壞疽斑（圖三j），而後葉片逐漸乾枯死亡。四季海棠罹病後，葉片出現紅褐色不規則形病斑。蘆薈接種後，第五天葉片出現凹陷現象，之後蘆薈葉片於凹陷處出現水浸狀斑點（圖三g），但病斑不隨時間擴大。石蓮於接種第六天時，肉質葉片出現不規則黃化及凹陷現象（圖三h），最後葉片乾癟掉落。大岩桐與虎耳草罹病後，由心芽長出之葉片扭曲變形，且葉片上若有傷口，傷口處出現褐色有黃暈之壞疽病斑（圖三f, i）。各植物出現病徵之病灶亦可分離出與接種源相同之線蟲。



圖三、由水稻、草莓與山蘇花上分離所得之 *Aphelenchoides besseyi* 接種於寄主上造成之病徵。

a) 山蘇花；b) 草莓；c) 水稻；d) 秋石斛；e) 春石斛；f) 大岩桐；g) 蘆薈；h) 石蓮；i) 虎耳草；j) 菊花。

Fig 3. Symptoms of host plants inoculated by *Aphelenchoides besseyi* isolated from rice, strawberry and fern, respectively.

a) *Asplenium nidus*; b) *Fragaria chilonsis*; c) *Oryza sativa*; d) *Dendrobium phalaenopsis*; e) *Dendrobium nobile*; f) *Sinningia speciosa*; g) *Aloe barbadensis chinensis*; h) *Echeveria elegans*; i) *Saxifraga stolonifera*; j) *Chrysanthemum morifolium*.

### 葉芽線蟲的交配試驗

試驗結果發現，一週後，每處理皆有卵與幼蟲產生。對照組中，同族群之葉芽線蟲皆可交配產生後代；Af 與 Ar 雄蟲、幼蟲無法獨自產生後代；As 及 Ab 單隻幼蟲繁殖試驗可觀察到子代產生，且子代中無雄蟲存在。因 As 及 Ab 培養於 *A. citri* 後，無法獲得雄蟲，所以 As 及 Ab 雄蟲與 Af 及 Ar 幼蟲交配試驗並無進行。

於光學顯微鏡及低溫場掃描式電子顯微鏡下觀察 Afs、Afr、Afb、Arf 及 Ars 得到之形態特徵及求得之測量值，皆界於 *A. besseyi* 的標準範圍<sup>(12)</sup>內(表一)。將 Afs、Afr、Afb、Arf 及 Ars 接種至山蘇花與草莓，第二週時，可見草莓長出之新葉皺縮；兩個月後，Afs、Afb 和 Afr 可於山蘇花葉片上造成黑褐色葉斑病徵。出現病徵之病灶亦可分離出與接種源相同之線蟲。

### 葉芽線蟲雌雄比觀察

各族群葉芽線蟲雌蟲數比雄蟲數 (F/M) 分別為：Af = 0.7/1；As = 111/1；Ar = 2.3/1；Arf = 24.8/1；Afr = 3.8/1；Ab、Afs、Afb 及 Ars 則無雄蟲存在，其中 Arf 於 *A. citri* 上培養一個月後，無法觀察到雄蟲存在。

### 葉芽線蟲隨機增幅核酸多形性 (RAPD)

引子 S1、S4、S7、S8、S10 可增幅出 Af、Af'、Ar 與 *A. citri* 之片段；引子 S2、S3、S5、S6、S9 則否。引子 S4、S7 與 S8 所增幅出之片段電泳圖(圖四)可發現同寄主之 Af 與 Af' 片段無差異；As 與 Ab 的片段相近；與 Ark 的片段差異小；Af、As 與 Ar 片段差異大。隨引子 S4 與 S8 之 RAPD 圖譜可將烏日地區的水稻葉芽線蟲 (Ar、Ar1、Ar2、Ar3、Ar4、Ar5) 與其他地區的葉芽線蟲區分開，而隨機引子 S7 增幅出之烏日地區水稻葉芽線蟲的片段，彼此間雖有差異，但仍可由圖四看出其與山蘇葉芽線蟲及草莓葉芽線蟲增幅出的片段有很大的差異。

### 葉芽線蟲 rDNA 片段限制酵素圖譜分析

增幅產物經電泳分析後發現，所有葉芽線蟲均可產一大小約 1,000 bps 之產物，且除 Ar1、Ar2、Ar3、Ar4、Ar5 外，其他供試葉芽線蟲及 *A. citri* 皆可產生一大小 800 bps 之增幅產物(圖五)，因此較小之片段應為真菌片段。增幅出之產物經酵素 *Hae* III 剪切後，所有葉芽線蟲均可得到一大小約 750 bps 的片段；利用酵素 *Rsa* I 切，Af'、Af 與 Ark 可得一大小約 1000 bps 的片段；A:

Ab、Ars、Afs 與 Afb 可得一大小約 700 bps 的片段；Ar、Ar1、Ar2、Ar3、Ar4、Ar5 與 Arf 可得一大小約 800 bps 的片段(圖五)。

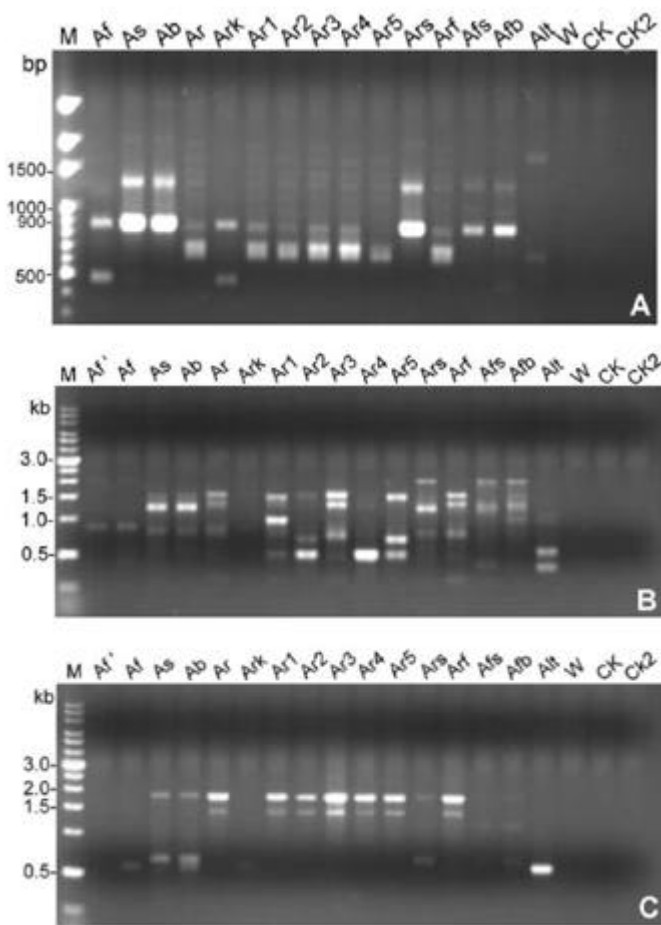
## 討論

由田間分離得到的葉芽線蟲 Ar、As 與 Af，經光學顯微鏡與掃描式電子顯微鏡觀察形態及測量，三者於形態特徵及體表細微構造相同，將各形態特性及測量值與 Franklin 和 Siddiqi 二氏<sup>(12)</sup>之報告比較後，確認分類地位為 *Aphelenchoides besseyi* 無誤。

雖然尚未有文獻記載有關葉芽線蟲生理小種的直接證據，但已有多篇研究報告指出，不同族群之 *A. besseyi* 於寄主植物上病原性及致病力的表現有差異<sup>(3, 6, 19, 22)</sup>。本研

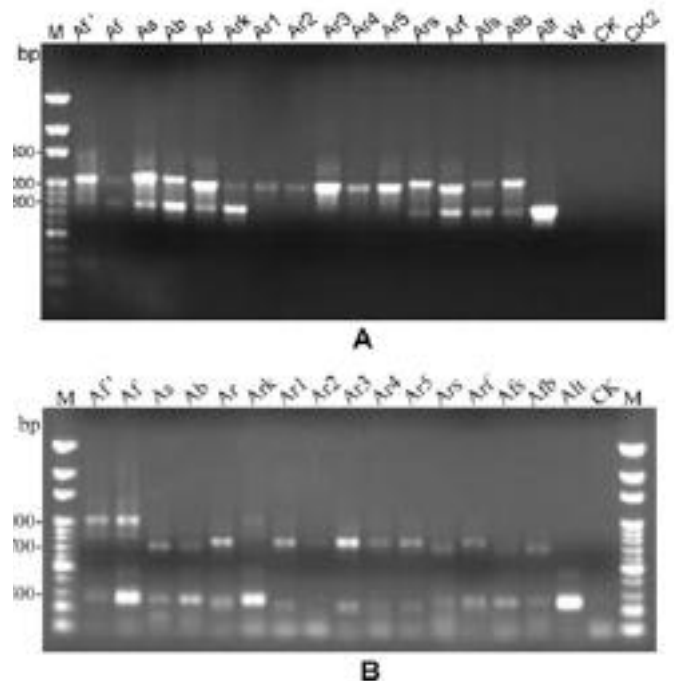
究寄主範圍測試結果發現，Ar、Ab、As 與 Af 皆不感染蝴蝶蘭與晚香玉，但此兩種植物於文獻記載上，為 *A. besseyi* 感受性寄主<sup>(1, 2)</sup>。1992 年，林氏等<sup>(2)</sup>報告 *A. besseyi* 可於秋石斛葉片上造成油狀黃褐色至灰黑色病斑 (greasy leaf blotch)，但本實驗結果顯示，僅 Ar 與 Ab 可造成相同病徵，Af 感染秋石斛葉片所形成的病徵為黑色病斑，且病勢進展遠較 Ar 引起的慢，感染 Ar 的葉片約 15 天即乾枯且薄質化，而感染 Af 的葉片約 30 天病斑仍無擴大至全葉，因此秋石斛對於 Ar 與 Af 的感受性並不相同。受 Ab 感染之秋石斛葉片至第 22 天才表現病徵，推測原因為長久以 *Alternaria citri* 菌絲培養，以致病原性降低。生理小種通常在寄主選擇性 (host preference) 上出現變異，即病原性的變異<sup>(25)</sup>。植物寄生性線蟲中，依據寄主範圍或致病力區分生理小種的種類如：*Meloidogyne incognita*、*M. chitwoodi*、*Ditylenchus dipsaci*、*Heterodera avenae*<sup>(9, 23, 26)</sup> 等，若只利用寄主範圍測試之結果來評估，Ar、Ab、As 與 Af 間確實存在著差異性。

將 Ar、Ab、As 與 Af 培養於 *A. citri*，生長溫度範圍與文獻中之 *A. besseyi* 一致<sup>(1, 14)</sup>，但最適繁殖溫度則各不相同。文獻記載之 *A. besseyi* 最適繁殖溫度有 Franklin 和 Siddiqi 二氏<sup>(12)</sup> 的 21-25 和劉氏等<sup>(5)</sup> 的 28-32 兩種說



圖四、利用引子 S4、S7與S8進行葉芽線蟲與 *Alternaria citri* 之RAPD電泳圖譜。

Fig 4. Electrophoresis patterns of random amplified polymorphic DNA (RAPD) obtained from *Aphelenchoides besseyi* and *Alternaria citri* with S4, S7 and S8 primers. A: S4; B: S7; C: S8; M: marker; Af, Af': two isolates of *A. besseyi* from fern; As: *A. besseyi* from strawberry; Ar, Ar1-5, Ark: *A. besseyi* from rice; Ab: *A. besseyi* from plant nematology lab.; Ars, Arf, Afb, and Afs are offspring from the mating test; Alt: *Alternaria citri*; W, CK, CK2: negative control.



圖五、A) 葉芽線蟲與 *Alternaria citri* rDNA 片段之PCR增幅結果。B) 以 *Rsa I* 剪切供試葉芽線蟲與 *Alternaria citri* 的 rDNA 片段之結果。

Fig 5. A) PCR products of rDNA fragment of *Aphelenchoides besseyi* and *Alternaria citri* amplified with 18S/26S primers. B) *Rsa I* digestion patterns of the rDNA fragments. M: marker; Af, Af': isolates of *A. besseyi* from fern; As: *A. besseyi* from strawberry; Ar, Ar1-5, Ark: *A. besseyi* from rice; Ab: *A. besseyi* from plant nematology lab.; Ars, Arf, Afb, and Afs are offspring from the mating test; Alt: *Alternaria citri*; W, CK, CK2: negative control.

法，本研究之葉芽線蟲最適生長溫度皆落於範圍之中。由實驗結果發現，於 32 定溫培養下，As 的族群數目可達 1405 隻，幾乎為 Af、Ar 及 Ab 之最高族群數目（分別為 499、487 及 316 隻）的 2.5 倍，甚至 4.5 倍之多，經觀察生活史後，發現 28 時，As 於 *A. citri* 上完成一個世代僅需 4 天，較其他葉芽線蟲的 5-6 天短，應為造成蟲數懸殊的因素。

黃氏二人觀察結果中發現了，用真菌培養所獲得的 *A. besseyi* 族群中，雄性恆佔 10% 左右<sup>(4)</sup>，而本實驗雌雄比計算結果顯示，Af 與 Ar 族群中的雄蟲比例較 10% 高出許多。蔡氏等計算 *A. besseyi* 於水稻上族群的消長，發現在授粉期，線蟲的雌雄比例可達 0.7/1<sup>(6)</sup>。一般而言，植物寄生性線蟲於營養供給缺乏或環境不良時，會產生更多雄蟲以增強族群適應力<sup>(29)</sup>，以此觀點來思考，與 Af、Ar 相較之下，*A. citri* 提供一較適合 As 及 Ab 生長的环境；但對 Af 和 Ar 而言，*A. citri* 除了提供食物來源外，可能也形成一逆境，造成 Af 及 Ar 雄蟲數較高的現象，意味著或許 *A. citri* 不是 Af 和 Ar 的最佳之寄主。由另一角度來看，四族群培養於 *A. citri* 後，會表現出雌雄比例不相同的現象。

本研究發現，As 與 Ab 於 *A. citri* 培養後，雌雄蟲數比例懸殊，甚至無雄蟲產生。Sudakova 和 Stoyakov 二氏曾指出，*A. besseyi* 可行孤雌生殖<sup>(27)</sup>，而 Huang 氏等針對葉芽線蟲之生殖模式、胚胎發生與雌雄性比作一系列完整研究，證實 *A. besseyi* 不行孤雌生殖，並認為 Sudakova 和 Stoyakov 兩學者報告的孤雌生殖有錯誤<sup>(15, 16)</sup>，之後亦有相關研究結果指出 *A. besseyi* 只行兩性生殖<sup>(2, 6)</sup>。本實驗結果發現 As 與 Ab 培養於真菌 *A. citri* 後，可行孤雌生殖，與前人<sup>(2, 6, 15)</sup>之研究不同。Huang 氏等<sup>(15)</sup>曾推測，*A. besseyi* 培養於不同真菌寄主上後，可能會改變生殖模式，但是並沒有文獻可以證實此一說法。Siddiqi 氏於研究室中觀察 *A. bicaudatus* 之生態，發現在雄蟲極度缺乏的情況下可行孤雌生殖<sup>(24)</sup>，Ab 與 As 是否因而發生同樣之行為，本實驗並未深入探究。此外，將寄生於山蘇花及水稻之 Af 與 Ar 進行單一幼蟲培養後，二者皆無法繁殖產生後代，生殖方式應為兩性生殖。因此，此一初步結果顯示 *A. besseyi* 具有不同生殖模式，但是否與其寄主種類有直接之相關，由本實驗結果無法定論。

種之界定，以林奈系統 (Linnaean systematics) 基於形態特徵之模式來區分時有爭議，需再考量種系遺傳形式 (phylogenetic hierarchies)、族群天然雜交潛勢及獨立繁衍能力<sup>(18)</sup>。交配試驗的結果，同族群之葉芽線蟲皆可繁殖產生後代，表示同種間具有親和性。將不同族群之葉芽線蟲交配後發現，Af 與 Ar 可雜交產生子代，且將子代移至新的培養基後，仍可繁殖產生後代，由此可知 Af 與 Ar 之親緣關係近；Af、Ar 雄蟲與 As 及 Ab 幼蟲交配試驗的結果，雖然皆可觀察到子代的產生，但由於對照組單一幼蟲繁殖試驗的結果顯示，As 與 Ab 不經兩性生殖即可自行繁殖後代，且 Af、Ar 雄蟲與 As 及 Ab 幼蟲產生之子代中並無雄蟲存在，因此不能證明此部份交配試驗所得之子代經由兩性生殖而來，而由於 As 和 Ab 培養於 *A. citri* 後，無法獲得雄蟲，所以與 Af 及 Ar 幼蟲交配試驗並無進行，無法由此得知其與 Af、Ar 的親緣性。

欲瞭解病原性是否會因雜交而產生改變，子代病原性測試的結果發現，所有子代皆可在草莓上造成與親代相同

之病徵；Afs、Afb 與 Afr 在山蘇花葉片上則可造成與親代相同之黑褐色病斑。As、Ab 與 Ar 於山蘇花上無法造成褐色病斑，其子代卻對山蘇花具有病原性，由以上結果知：(1) As、Ab 與 Ar 分別和 Af 所產生的子代在病原性發生變異；(2) Afs 和 Afb 病原性異於母本 As、Ab，子代是由兩性生殖所產生，而非孤雌生殖。文獻記載不莖線蟲 *Ditylenchus dipsaci* race 之間雜交產生的子代，原性與寄主範圍皆與親代有所差異<sup>(10)</sup>，亦支持本研究述之推論。

子代雌雄比計算的結果發現，Afs、Afb 與 Ars 中，無雄蟲存在；Afr 與 Arf 之雌雄比則各為 3.8/1 和 24.8/1。雄蟲比例皆低於親代 Af 與 Ar，且 Arf 經一個月後，箱中便無法觀察到雄蟲存在。由此可知，雜交所產生的子代較其親代更能適應食物來源 *A. citri*。這些現象顯示著雜交後，葉芽線蟲對於環境的反應有了改變。

RAPD 已知可成功應用於區分四種根瘤線 (*Meloidogyne arenaria*、*M. incognita*、*M. javanica*、*M. hapla*) 和四種黃金線蟲 (*Globodera rostochiensis*、*pallida*、*G. tabacum*、*G. "mexicana"*)<sup>(7, 28)</sup>；但於某些絛族群，如：*Pratylenchus vulnus*，其族群內基因變異高，便無法利用 RAPD 得知不同地理族群 *P. vulnus* 間的關性<sup>(21)</sup>。由本研究 RAPD 的結果得知，依增幅出之片相似度大致可分為三群：Af、Af 與 Ark；As 與 Ab；Ar1-5。若由寄主的角度來分析，本研究使用之山蘇葉芽線蟲 Af、草莓葉芽線蟲 As 及水稻葉芽線蟲 Ar，可用隨機引子 S1、S4、S7、S8 與 S10 所增幅出的電泳區區別開來，但由相同寄主山蘇花所分離之 Af 與 Af 所增出的片段無差異，卻也與水稻葉芽線蟲 Ark 之片段相似。草莓葉芽線蟲 As 與水稻葉芽線蟲 Ab 的片段亦很相似；為水稻葉芽線蟲之 Ar、Ab 及 Ark 的片段則有很大的異。若朝地理分佈的方向分析，利用 S4 和 S8 可明顯區烏日地區與其他地區的 *A. besseyi*，但無法將三峽、義、大湖、大里與高雄之葉芽線蟲區別開。由此可知，分子遺傳層次上，*A. besseyi* 族群內基因變異性高，無利用隨機引子 S1、S4、S7、S8 與 S10 得知不同寄主和地理族群 *A. besseyi* 間的相關性。RAPD 電泳圖譜雖可看 Arf 與父本 Ar 的片段相似度較高，但無法藉此確認 Ar、Afs 及 Afb 是否為兩性生殖或孤雌生殖所得之子代。

Ibrahim 氏等利用 PCR 技術應用於印度 (India) 及獅山 (Sierra Leone) *A. besseyi* 的 rDNA，皆可增幅出一大小 1,100 bps 的產物，經限制酵素 *Hae* 切割後，可區分兩不同地區的 *A. besseyi*<sup>(17)</sup>。本研究仿照文獻記載之方式，同樣可將本實驗所採用的 *A. besseyi* 增幅出一大小 1000 bps 左右之產物，而利用限制酵素 *Hae* 切割後，得產物大小皆為約 750 bps 的片段，與文獻的記錄不同，本研究之 *A. besseyi* 並無法利用限制酵素 *Hae* 區開來。利用酵素 *Rsa* I 切割，則可依所得片段大小將本驗之 *A. besseyi* 葉芽線蟲分為三群：Af、Af 與 Ark；As、Ab；Ar 與 Ar1-5，此結果和由 RAPD 歸納的結論相同。

由以上結果，可證實台灣葉芽線蟲 *A. besseyi* 種內生理特性上確實存在變異情形，但此變異與寄主或來源區之相關性仍有待進一步探討。

## 引用文獻

1. 王貴美、蔡東纂、林奕耀. 1993. 台灣草莓葉芽線蟲病之發生及其生態研究. 植保會刊 35:14-29.
2. 林奕耀、王貴美、蔡東纂. 1992. 秋石斛葉芽線蟲病之發生. 植保會刊 34:202-215.
3. 游培琪、蔡東纂. 2004. 山蘇花葉芽線蟲在台灣之發生. 植病會刊 13:35-44.
4. 黃炤雄、黃修斌. 1973. 水稻白尖病病原線蟲 (*Aphelenchoides besseyi*) 的生殖機構及性比例. 植保會刊 15:1870 (摘要).
5. 黃炤雄、蔡雲鵬、林奕耀、杜金池、黃修斌. 1972. 台灣植物寄生線蟲. 中央研究院植物研究所專刊 1:1-59.
5. 劉尚雲、林益昇. 1985. 草莓葉芽線蟲之生態. 植保會刊 27(4):466 (摘要).
6. 蔡東纂、程永雄、鄧堯銓、李明達、吳文希、林奕耀. 1998. 台灣水稻白尖病病原線蟲 *Aphelenchoides besseyi* 之生態及防治策略. 植保會刊 40:227-286.
7. Cenis, J. L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology* 83:76-78.
8. de Man, J. G. 1884. Die einheimischen, frei in der reinen Erde und im süssen Wasser lebenden Nematoden. *Tijdschr. Ned. Dierk. Ver.* 5:1-104.
9. Eisenback, J. D., and Triantaphyllou, H. H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. *Manual of Agricultural Nematology*. Pages 191-274 in: Nickle, W. R. (eds) Marcel Dekker Inc., New York.
10. Eriksson, K. B. 1974. Intraspecific variation in *Ditylenchus dipsaci* I. Compatibility tests with races. *Nematologica* 20:147-162.
11. Fortuner, R., and Orton Williams, K. J. 1975. Review of the literature on *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, the nematode causing "white tip" disease in rice. *Helminthological Abstracts. Series B. Plant Nematol.* 44:1-40.
12. Franklin, M. T., and Siddiqi, M. R. 1972. *Aphelenchoides besseyi*. *Descriptions of Plant-Parasitic Nematodes, Set 1, No. 4.* Commonwealth Institute of Helminthology, St. Albans, England.
13. Hopper, D. J. 1986. *Drawing and Measure for Work with Plant Nematodes.* London: Her Majesty's Stationary. pp. 87-94.
14. Huang, C. S., Huang, S. P., and Lin, L. H. 1972. The effect of temperature on development and generation periods of *Aphelenchoides besseyi*. *Nematologica* 18:432-438.
15. Huang, C. S., Huang, S. P., and Chiang, Y. C. 1979. Mode of reproduction and sex ratio of rice white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. *Nematologica* 25:255-260.
16. Huang, C. T., and Huang, C. S. 1974. Embryogenesis and morphometry of rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. *Plant Prot. Bull.* 16:56-68.
17. Ibrahim, S. K., Perry, R. N., Burrows, P. R., and Hooper, D. J. 1994. Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. *J. Nematol.* 26:412-421.
18. Lovtrup, S. 1979. The evolutionary species: fact or fiction. *Zool.* 28:386-392.
19. Noegel, K. A., and Perry, V. G. 1963. A foliar disease of Chrysanthemum incited by the strawberry summer crimp nematode. *Proceedings of the soil crop science Society of Florida, 22nd Annual Meeting (1962)* pp. 162-166.
20. Ou, S. H. 1985. *Rice disease (2<sup>nd</sup> Edition).* Kew, England, Commonwealth Mycological Institute. p380.
21. Pinochet, P., Cenis, J. L., Fernandez, C., Doucet, M., and Marull, J. 1994. Reproductive fitness and random amplified polymorphic DNA variation among isolates of *Pratylenchus vulnus*. *J. Nematol.* 26:271-277.
22. Riggs, R. D. 1991. Resistance-breaking races of plant parasitic nematodes. Pages 827-851 in: *Manual of Agricultural Nematology.* Nickle, W. R. (eds) Marcel Dekker Inc., New York.
23. Rivoal, R., and Cook, R. 1993. Nematode pests of cereals. Pages 259-304 in: *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture.* Evans, K., Trudgill, D. L., and Webster, J. W. (eds) Wallingford, Oxon, UK, CAB International.
24. Siddiqi, I. A. 1976. *Aphelenchoides bicaudatus*. *Descriptions of Plant-Parasitic Nematodes, Set 6, No. 84.* Commonwealth Institute of Helminthology, St. Albans, England.
25. Sturhan, D. 1971. Biological race. Pages 51-72 in: *Plant Parasitic Nematodes Volume II.* Zuckerman, B. M., Mai, W. F., and Rohde, R. A. (eds) Academic Press. New York.
26. Sturhan, D., and Brzeski, M. W. 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. Pages 423-464 in: *Manual of Agricultural Nematology.* Nickle, W. R. (eds) Marcel Dekker Inc., New York.
27. Sudakova, M. I., and Stoyakov, A. V. 1967. Reproduction and duration of life of *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942. *Zool. Zh.* 46:1079-1099. (In Russian) (Cited from *Helm. Abstr.* 37:325, 1968)
28. Thiery, M., Fouville, D., and Mugniery, D. 1997. Intra- and interspecific variability in *Globodera*, parasites of Solanaceous plants, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and correlation with biological features. *Fundam. Appl. Nematol.* 20:495-504.
29. Triantaphyllou, A. C. 1973. Environmental sex differentiation of nematodes in relation to pest management. *Ann. Rev. Phytopathol.* 11:441-462.
30. 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.
31. Waele, D. D. 2002. Foliar nematodes: *Aphelenchoides* species. Pages 141-151 in: *Plant Resistance to Parasitic Nematodes.* Starr, J. L., Cook, R., and Bridge, J. (eds) CAB International, Wallingford, UK.



**ABSTRACT**

Tzeng, C. Y.<sup>1</sup>, and Lin, Y. Y.<sup>1,2</sup> 2005. The intraspecific variation of *Aphelenchoides besseyi* populations in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 14:67-75. (<sup>1</sup>Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R. O. C.; <sup>2</sup>Corresponding author, Fax: +886-2-22876712)

The morphological and morphometric data of four populations of *Aphelenchoides besseyi*, including two populations isolated from rice plant (Ar and Ab) and one from strawberry (As) and fern (Af) respectively, were not different. All of them infested strawberry and rice, but only "Af" attacked fern. "As" could not infect bailey. Crossing hybrid test showed offsprings in every combination treatment, and they were reproducible. The morphology and morphometrics of parental generations and its offsprings had no significant differences. All offsprings could infect strawberry, but only Afs, Afb, and Afr could infect fern. Besides Afr and Arf, the males of Afs, Afb and Ars could not be found. Parthenogenesis was observed on As and Ab that cultivated on PDA slant with *Alternaria citri*. Random amplified polymorphic DNA data showed that the amplification fragments of Ar, Ab, As and Af were different, but the fragments of As and Ab were alike. Using 18S and 26S universal primers to amplify ribosomal DNA, all populations yield a product about 1,000 bps. Amplified rDNA fragments digested with restriction enzyme *Rsa* I, Af resulted a band uncut; As and Ab were digested into 700 bps and Ar was 800 bps, both with a minor band that had a size indistinguishable from *A. citri* products. Therefore, the physiology, host range and rDNA sequence of rice, strawberry, and fern foliar nematodes were variant in Taiwan.

Key words : foliar nematode, *Aphelenchoides besseyi*, intraspecific variation