

台灣松樹萎凋病分布與其病原線蟲之研究

陳珮臻¹ 黃盈彥¹ 蔡東纂¹ 顏志恒^{2,3}

¹ 台中市國立中興大學植物病理學系

² 台中市國立中興大學農業推廣中心

³ 連絡作者，電子郵件：jhyen@nchu.edu.tw，傳真：+886-4-22860267

接受日期：中華民國 95 年 12 月 02 日

摘要

陳珮臻、黃盈彥、蔡東纂、顏志恒. 2006. 台灣地區松材線蟲之種類與分布調查. 植病會刊 15 : 263-274

本文調查台灣地區松樹萎凋病之分佈，及台灣目前松材線蟲之種類。利用型態學之特徵、測量值，及核糖體 DNA 之 ITS 區間序列分析從台灣和外島採得之 19 個分離株，除 *B. xylophilus* 及 *B. mucronatus* 之外，還包含台灣未曾記錄種 *B. thailandae* 以及一分類地位尚未清楚之 *Bursaphelenchus* sp.。採樣以 *B. xylophilus* 為最多，共有 8 個分離株，分佈亦最廣；北部、中部、東部地區皆有其蹤跡。*B. mucronatus* 共有 5 個分離株，分佈於北部、中部地區。*B. thailandae* 僅於苗栗縣南庄鄉發現，*Bursaphelenchus* sp. 則主要分佈於桃竹地區以及馬祖離島。接種試驗顯示，此次由田間分離的 *B. xylophilus* 線蟲分離株可感染台灣原生種的台灣二葉松及台灣五葉松。*B. mucronatus* 的 O 分離株可於二葉松及五葉松中繁殖，但未能造成病徵。*B. thailandae*、未知的 *Bursaphelenchus* sp. 以及由萎凋的琉球松上分離的 *Aphelenchoides* sp. 皆未能在此次接種試驗中感染日本黑松、台灣二葉松及五葉松。由 ITS 區間片段大小及其序列顯示，台灣地區的 *B. xylophilus* 及 *B. mucronatus* 其種類差異極小，而未知的 *Bursaphelenchus* sp. 共四個分離株差異也僅有 1%。

關鍵詞：松樹萎凋病、松材線蟲、分佈、鑑定、*Bursaphelenchus mucronatus*、*Bursaphelenchus thailandae*、*Bursaphelenchus xylophilus*、*Pinus luchuensis*、*Pinus morrissonicola*、*Pinus taiwenensis*。

緒言

松樹萎凋病為松材線蟲 (*Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner) 所引起的松樹病害，1905 年於日本長崎首度發現，但直到 1972 年時才經由接種試驗確定為線蟲所引起，並將此線蟲命名為 *B. lignicolus*；復經型態比對以及種間親合性交配試驗之後發現與 Nickle 氏於美國報導的 *Bursaphelenchus xylophilus* 為同種⁽¹⁸⁾，最後正式定名為 *B. xylophilus* Nickle⁽²¹⁾。

松材線蟲屬 (*Bursaphelenchus*) 的線蟲全世界報導有 75 種^(19, 24)，其主要分布為北美、歐洲及亞洲地區；亞洲地區已報導的種佔 20 種，其中以中國發表的種類

(species) 為最多，有 11 種，蘇聯 9 種、日本 5 種；韓國、泰國、馬來西亞及台灣為零星報導地區只有一至三種^(6, 7, 13, 17, 18, 24, 31)。根據日本及美國的研究顯示，松材線蟲可感染五個屬的裸子植物，包括落葉松 (*Larix* spp.)、雪松 (*Cedrus* spp.)、雲杉 (*Picea* spp.)、冷杉 (*Abies* spp.) 及松樹 (*Pinus* spp.) 等，其中以松屬植物者眾，多達 34 種⁽¹²⁾。而在台灣，1989 年由曾氏及顏氏判定為抗病品種的台灣二葉松 (*Pinus taiwenensis*) 與馬尾松 (*P. massoniana*)，現已有感染松樹萎凋病的報導⁽²⁸⁾。故松材線蟲屬 (*Bursaphelenchus*) 的線蟲在台灣經不同寄主植物相與環境的選汰壓力之下，可能已產生病原性、生活史以及型態上的變異。了解現階段台灣地區松材

線蟲之種類變異，應為防治松樹萎凋病的首要研究課題。

台灣松樹萎凋病於1985年首先在台北縣石門、金山一帶發現，到1988年的3年間，病害在台灣北部地區迅速蔓延，陸續在三峽、桃園等15個地區發現^(9, 26)，且近期報導指出在金門⁽⁸⁾、惠蓀林場、德基水庫^(25, 29)、東勢及雪霸國家公園發現萎凋病⁽²⁷⁾，且罹病松樹上可分離出松材線蟲 *Bursaphelenchus xylophilus*，顯示台灣地區松材線蟲的分佈有向南移行的趨勢。

松材線蟲在不同地域之體型上有所差距，由不同寄主、地區分離，或生理小種之間型態數值上亦有些許差異^(5, 11, 26)。應用於松材線蟲分類及鑑定上的分子生物學技術有許多種；包括 heat shock gene 70、18S rDNA、ITS1 區間以及 satellite DNA 序列及片段大小^(3, 4, 5, 14, 16, 27)，這些研究的目的通常針對 *B. xylophilus* 與 *B. mucronatus* 的差異以及如何有效快速的將其與其他同屬的線蟲區分開來。rDNA 內轉錄區間 (internal transcribed spacer, ITS) 被廣泛的利用在鑑定線蟲的種類以及判定種間之親緣關係等方面^(2, 12, 10, 13, 16, 20)，松材線蟲 ITS 區間連同 5.8S 基因含有約 1000 個鹼基對左右，包含 *B. xylophilus* 及 *B. mucronatus* 在基因庫中已經有序列資料，此次研究也將收集到的松材線蟲族群之序列解出，以輔助鑑定線蟲之分類地位。

材料與方法

一、松材線蟲的採樣與鑑定

野外採集時，松樹若出現為針葉黃化呈紅棕色之情形，則進行採樣工作；採集方式為將疑似感染萎凋病之松樹，以手動式鑽孔器於離地基部一公尺（約植株胸高處）鑽孔取樣，蒐集松樹木屑約 50 公克，捨棄樹皮部分，以封口袋保存，於實驗室以改良式柏門氏漏斗分離法進行樣本分離⁽¹⁵⁾；而林務局委託檢驗之木材樣本，則先除去樹皮並鋸為小段，再以剪定鋏剪成 1cm² 以下之小木片，以利線蟲的分離。

木材樣本利用改良式柏門氏漏斗分離法 (modified Baermann funnel technique) 分離 24 小時後，將所收集之線蟲於解剖顯微鏡下觀察鑑定，以挑針將松材線蟲挑至長滿草蓴灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*) 之馬鈴薯洋菜培養基 (PDA) 斜面，於 25°C 下培養 3 週後，待線蟲族群量達到高峰，再以無菌水將試管內之線蟲洗出，於解剖顯微鏡下以挑針挑取一隻帶卵的母蟲，置於 *Botrytis cinerea* 之 PDA 斜面上進行純系培養。用無菌水將純系之線蟲自試管中洗出，於無菌操作台中，利

用消毒過的挑針挑取 20 隻線蟲，以孔雀綠 (malachite green) 1000ppm 處理 60 秒，再另挑至鏈黴素 (streptomycin sulfate) 1000ppm 中處理 60 分鐘，最後以無菌水漂洗 3 次⁽³⁰⁾，培養於長滿 *Botrytis cinerea* 之 PDA 斜面上，置於 25°C 無光照定溫箱中，以供下列試驗。

將培養於 PDA (potato dextrose agar) 斜面之 *Botrytis cinerea* Pers. 菌絲的單一品系線蟲以無菌水洗出，製成線蟲懸浮液，經熱殺之後，於解剖顯微鏡下挑取線蟲，並以 TAF (Triethanolamine Formalin solution) 固定液固定於載玻片上，在光學顯微鏡下觀察並記錄線蟲頭部、中部食道球、尾部、雌蟲陰門與雄蟲尾翼等各部位型態特徵。於解剖顯微鏡下挑取各地分離來的松材線蟲雌雄各 25 隻，利用光學顯微鏡鏡檢；根據 De Man (1880) 公式，測量線蟲各部位的長度及比例，並取平均值。

二、松材線蟲之病原性測試

將上述大量培養之病原性線蟲，利用改良式柏門氏漏斗分離法分離 24 小時後，收集其線蟲懸浮液，將線蟲量調整為每一毫升 25,000 隻線蟲備用。

為了解各松材線蟲之分離株對台灣地區主要松樹品種的病原性，挑選兩年生日本黑松 (*Pinus thunbergii* Parl.)、台灣二葉松 (*P. taiwanensis* Hay.) 及台灣五葉松 (*P. morrisonicola* Hay.) 為供試樹種 (分別購自彰化縣田尾鄉成和記農園、久留美園藝及東方草堂園藝)，由於黑松及二葉松針葉外觀上均為兩針一束，採莖部中段位置之老葉進行冷凍切片，觀察其解剖學之特徵及松脂管 (resin duct) 數目以鑑定其品種。

首先於松樹地基部上方 5 至 10 公分處，並以酒精拭去灰塵作初步消毒，再以過火消毒的鑽孔器鑽一 0.1 公分之小孔，填入經高壓殺菌的脫脂棉，滴入 100 μ l 線蟲懸浮液 (共 2500 隻)，並用透氣膠帶 (micropore, 3M) 封口，以保持濕度及避免其他微生物干擾。兩組對照組則分別接種 *Botrytis cinerea* 孢子懸浮液及水，每個處理 4 重複，置於溫室中，每 2 日澆水一次；接種後 21、28 及 35 天後觀察所產生之病徵及其發病度 (morbidity)，而線蟲數的調查方面，則於接種 35 天之後，自接種部位起 2cm 往上取約 15cm 長之松樹枝條，並除去側芽及針葉，帶回實驗室進行分離工作。將松樹枝條以修枝剪斜切，增加切面表面積，以利線蟲游出，約剪成 0.2cm 之薄片，再利用柏門氏漏斗分離，分離 48 小時之後，以 19 格鏡檢皿觀察之後將網篩連同樣本置入 70°C 烘箱 4 個小時，測木材乾重，以計算每克松樹所含之松材線蟲數。

三、以分生技術檢測輔佐鑑定松材線蟲

將培養在 PDA 斜面上的 *Botrytis cinerea* 之松材線蟲，利用改良式柏門氏漏斗分離法分離 24 小時，以除去大部分的孢子，並將線蟲量調整為每一毫升 1000 隻線蟲備用。取 1.4ml 線蟲懸浮液分裝至 1.5ml 之微量離心管中，以 3000rpm 轉速離心 1 分鐘並除去上清液。首先將 90 μ l extraction buffer 加入線蟲樣本中以液態氮研磨，再加入 20 μ l proteinase K 於 65°C 水浴 2 小時，每 30 分鐘將離心管取出震盪均勻 5-10 秒後，Genomic DNA 萃取流程遵照 Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit (GeneMark) 標準流程進行。松材線蟲之 Genomic DNA 保存於 -20 °C 備用。

以專一性之 18S (5' -TTGATTACGTCCCTGCCC TTT -3') 及 28S (5' -TTTCACTCGCCGTTACTAAGG -3') 引子對，進行聚合酶連鎖反應 (PCR)，將線蟲 ribosomal DNA 中包含部份的 28S、ITS1、完整的 5.8S 基因及部份的 ITS2 區間進行增幅，依 Taq Plus Master Mix 5X PCR Mix (GeneMark) 推薦用量，取 36 μ l 去離子水，加入 2 μ l 線蟲 Genomic DNA，以及 18S 與 28S 之專一性引子各 1 μ l，最後加入 10 μ l 5X PCR Plus Master Mix 使其每一樣本總體積為 50 μ l，PCR 增幅條件為 (i) 94°C 4 分鐘，1 個循環 (ii) 94°C 30 秒、52°C 30 秒、72°C 1 分鐘，30 個循環 (iii) 72°C 5 分鐘，1 個循環。

將 PCR 增幅後的產物進行電泳分析，取 10 μ l 線蟲 PCR 產物與 2 μ l 染液 (0.25% bromophenol blue, 30% glycerol in H₂O) 混合均勻，於 0.8% 瓊脂凝膠中，進行電泳分析，30 分鐘後以 0.5mg/ml 的 EtBr (Ethidium Bromide) 染色，將約 1000bp 的條帶切下，放到 1.5ml 之微量離心管中進行 DNA 純化；依 Micro-Elution DNA Clean/ Extraction Kit (GeneMark) 標準流程進行。DNA 與載體黏合使用 pGEM-T[®] Easy Vector System I (Promega)；首先在冰上將 1 μ l pGEM-T Easy vector 加入 5 μ l 2x Rapid ligation buffer 中，再加入 3 μ l 純化後之線蟲 PCR 產物 DNA，以 1 μ l T4 DNA Ligase 黏合之，最後加入去離子水至總體積為 10 μ l，於室溫中作用 1 個小時，後放置於 4°C 隔夜，以完成黏合。

將載體 DNA 5 μ l 加入 100 μ l *E. Coli* DH10B 細胞，置於冰上 30 分鐘，隨即以 42 °C (Heat shock) 處理 30 秒後，置回冰上，加入 800 μ l 含 Mg²⁺ 之 SOD 培養基，於 37 °C 下培養 30 分鐘。將含 100 ppm Ampicillin 之 LA 培養基，加入 100 μ l IPTG (isopropyl-D-thiogalactopyranoside) 及 20 μ l 10mg/ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside) 塗佈均勻；吸取轉型完成之 *E.coli* DH10B 菌液 20 μ l 均勻塗佈至 LA

培養基上，於 37°C 培養隔夜，以進行藍白篩選。以消毒過的牙籤挑取白色菌落，重新培養至含 100 ppm Ampicillin 之 LA 平板上，並同時接種至 5ml 含 100 ppm Ampicillin 之 LB 液態培養基中，於 37°C 定溫箱中培養 8-12 小時。

取 2ml 菌液以 12000 rpm (centrifuge 5415D, Eppendorf[®]) 轉速離心 1 分鐘，並將下層細胞移至 1.5ml 之微量離心管中，依照 Plasmid Miniprep Kit II (GeneMark) 標準流程進行以得到 *E. coli* DH10B 內質體 DNA。利用限制酵素 *EcoRI* 進行酶切，將目標 DNA 由質體切出，並以電泳膠確認。將轉型成功之 *E. coli* DH10B 菌液送交明欣生物科技公司 (台北市，台灣) 解序，進一步與基因庫之松材線蟲序列，以 VECTOR NTI 7.0 軟體進行序列比對。

結 果

本研究中採集地點多以未曾報導有松樹萎凋病例的地區為主，包括桃園、新竹、台中、彰化、苗栗及南投縣等 (表一)。在中部地區松樹萎凋病僅在苗栗火炎山及東海大學有大規模發病的情形。所採得之松材線蟲分離株共寄主樹種包含日本黑松 (*Pinus thunbergii* Parl.)、琉球松 (*P. luchuensis* Mayr.)、馬尾松 (*P. massoniana* Lamb.)、台灣二葉松 (*P. taiwanensis* Hay.) 及台灣五葉松 (*P. morrissonicola* Hay.)，分離株採自台灣二葉松為最多。本研究中所培養之松材線蟲樣本共計 19 個分離株。並發現馬祖 (Mm)、南竿 (Ms)、交通大學 (Ju)、中央大學 (Cu) 及東海大學 (Tk) 所分離之松材線蟲，在培養及觀察過程中未有雄蟲 (表一)。

利用型態特徵以及其測量值可將本研究中所收集之 19 個分離株分成以下五群，其中 8 個分離株鑑定為典型松材線蟲 *B. xylophilus*，5 個分離株為 *B. mucronatus*，苗栗南庄的族群 (Nz) 與泰國 2002 年發表之新種 *B. thailandae* 相符。由馬祖及交大、中央大學等地分離的族群中未發現雄蟲，而松材線蟲屬之檢索表內，雄蟲交接刺型態特徵為一重要初步分群的指標；故僅能暫定此四族群為 *Bursaphelenchus* sp.。這些族群的雌蟲型態與 *B. xylophilus* 十分相似，但卻無陰門蓋。而自東海大學分離之族群培養過程中亦未發現雄蟲；其母蟲尾部具數個分叉，此為松材線蟲不具有的特徵，但與同科之葉芽線蟲相似，故暫定為 *Aphelenchoides* sp.。茲將五種線蟲之特徵，說明如下：

1. *Bursaphelenchus xylophilus* :

8 群 *B. xylophilus* 分別由火炎山 (Bf)、陽明山 (YI)

表一、本研究中松材線蟲族群之分離株代號、寄主來源及生殖模式

Table 1. Pine wood nematodes isolates studied in this research, their code, original host and reproduction mode.

Isolates	Origins	Host plant	Reproduction form	Species
Bx	中興大學線蟲室 ¹	<i>Pine luchuensis</i> (琉球松)	Male & female	<i>B. xylophilus</i>
Ta	泰安休息站	<i>P. taiwenensis</i> (台灣二葉松)	Male & female	<i>B. xylophilus</i>
Dh	大湖法雲寺	<i>P. morrisonicola</i> (台灣五葉松)	Male & female	<i>B. xylophilus</i>
Bf	火炎山	<i>P. massoniana</i> (馬尾松)	Male & female	<i>B. xylophilus</i>
Yl	陽明山	<i>P. luchuensis</i> (琉球松)	Male & female	<i>B. xylophilus</i>
Yt	陽明山	<i>P. thunbergii</i> (日本黑松)	Male & female	<i>B. xylophilus</i>
Hl	花蓮	<i>P. luchuensis</i> (琉球松)	Male & female	<i>B. xylophilus</i>
Ht	花蓮	<i>P. taiwenensis</i> (台灣二葉松)	Male & female	<i>B. xylophilus</i>
Bm	北宜公路	<i>P. luchuensis</i> (琉球松)	Male & female	<i>B. mucronatus</i>
Mt	武陵農場	<i>P. taiwenensis</i> (台灣二葉松)	Male & female	<i>B. mucronatus</i>
Ot	奧萬大	<i>P. taiwenensis</i> (台灣二葉松)	Male & female	<i>B. mucronatus</i>
St	勝興車站	<i>P. taiwenensis</i> (台灣二葉松)	Male & female	<i>B. mucronatus</i>
O	新竹峨眉	<i>P. taiwenensis</i> (台灣二葉松)	Male & female	<i>B. mucronatus</i>
Mm	馬祖清水公園	<i>P. massoniana</i> (馬尾松)	Female only	<i>Bursaphelenchus</i> sp.
Ms	馬祖南竿	<i>P. massoniana</i> (馬尾松)	Female only	<i>Bursaphelenchus</i> sp.
Ju	交通大學	<i>P. taiwenensis</i> (台灣二葉松)	Female only	<i>Bursaphelenchus</i> sp.
Cu	中央大學	<i>P. taiwenensis</i> (台灣二葉松)	Female only	<i>Bursaphelenchus</i> sp.
Tk	東海大學	<i>P. luchuensis</i> (琉球松)	Female only	<i>Aphelenchoides</i> sp.
Nz	苗栗南庄	<i>P. luchuensis</i> (琉球松)	Male & female	<i>B. thailandae</i>

¹ 中興大學植病系植物線蟲研究室之松材線蟲種原保存(於北宜公路採得)

& Yt)、花蓮(Hl & Ht)、泰安休息站(Ta)及法雲寺(Dh)之分離而來,與中興大學線蟲研究室保存之典型松材線蟲 *B. xylophilus* 比對發現;中部食道球佔體寬 3/4 以上、雌蟲具有陰門蓋且尾部呈指狀;雄蟲交接刺導片(capitulum)平直、交接刺尾端三分之一處明顯彎曲成J字型,最尾端有一圓盤狀構造(cucullus),為典型 *xylophilus* 群具有之交接刺特徵,整體雄蟲尾部呈鷹爪狀。8個分離株之型態測量值體長皆在典型 *B. xylophilus* 範圍之內,並無顯著差異,故鑑定其為 *B. xylophilus*。而寄主範圍涵蓋琉球松、馬尾松、黑松、台灣二葉松及五葉松,而典型松材線蟲寄生於馬尾松為首次報導。

二、*Bursaphelenchus mucronatus* :

北宜公路(Bm)、武陵農場(Mt)、奧萬大(Ot)、勝興車站(St)及新竹峨眉(O)等5個分離株幼蟲及雌蟲尾部具有尾突,其餘特徵如中部食道球佔體寬 3/4 以上、雌蟲具有陰門蓋、雄蟲交接刺型態等特徵皆與 *B. xylophilus* 相似,型態測量值方面亦落在擬松材線蟲測量值範圍之內,故判斷其為擬松材線蟲 *B. mucronatus*。本研究僅在琉球松及台灣二葉松上發現;其分布則在北部及中部地區。

三、*Bursaphelenchus thailandae* :

採自苗栗南庄琉球松之松材線蟲 Nz 分離株,經測量其體長約在 900 到 1100 μm 之間,雄蟲交接刺導片有一明顯凹面、交接刺粗短,不具有明顯之勾狀且前端沒有圓盤(cucullus),成鈍圓狀(bluntly rounded)(圖一 A、E)。雌蟲尾部尖細無尾突、陰門成臍狀且無陰門蓋(圖一 D、F),外觀型態上與泰國發現之新種 *B. thailandae*⁶⁾ 相符。此為台灣首度發表之松材線蟲新記錄種;本研究之型態測量值,雌蟲及雄蟲體長及口針長均較泰國地模標本之測量值長,雌蟲 C 值較小,陰門位置較地模群近尾部;其餘測量值皆落在地模族群數值範圍之中(表二)。

四、*Bursaphelenchus* sp. :

採自交通大學(Ju)、中央大學(Cu)、馬祖清水公園(Mm)與南竿(Ms)四個分離株(表一),因培養過程中無雄蟲出現故無法將之分類至松材線蟲之亞群中,母蟲各部構造皆與典型松材線蟲十分相似(圖二 A),中部食道球佔體寬 3/4 以上(圖二 B),唯一不同之處;為雌蟲陰門處未具陰門蓋(圖二 C),尾部為指狀鈍圓(圖二 D),在光學顯微鏡下,型態特徵近似於 *B. xylophilus*;故暫稱為 *Bursaphelenchus* sp.。四個族群的型態測量值與 *B. xylophilus* 及 *B. mucronatus* 比較可發現 Mm、Ms 體長較接近於 *B. xylophilus*; Ju、Cu 比較接近 *B. mucronatus*。比例上來說,尾部較兩個已知種短,除此之外,平均數值皆落在 *B. xylophilus* 與 *B.*

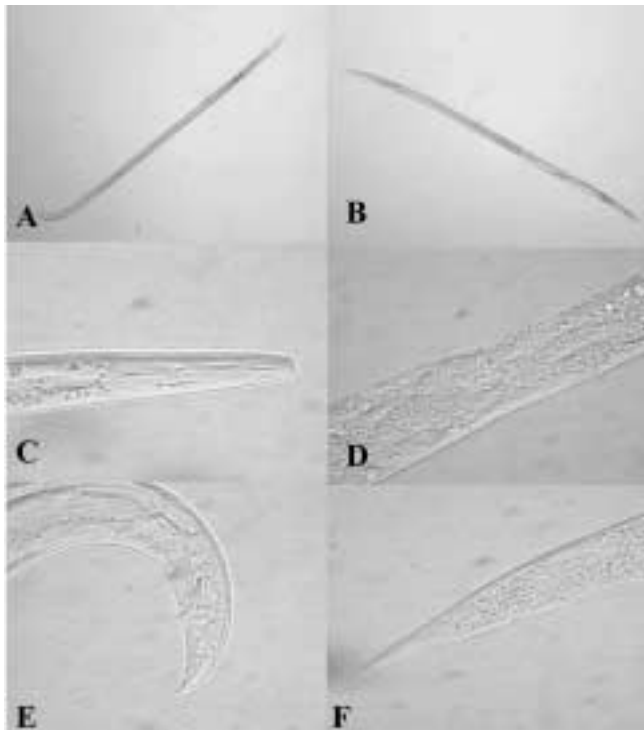
表二、*Bursaphelenchus thailandae* 分離株 NZ 之形態測量值

Table. 2 . Morphometric measurements of *Bursaphelenchus thailandae* isolate NZ in this study.

	Nz (南庄)		<i>B. thailandae</i> (Braasch, 2002)	
	F ²	M	F	M
n ¹	25	25	6	10
L	990 ± 8.04	937 ± 6.75	727 ± 69 (640-820)	582 ± 90 (435-720)
a	42.4 ± 1.28	38.8 ± 3.31	38 ± 1.9 (36-41)	39 ± 5.0 (29-46)
b	11.8 ± 1.84	11.9 ± 1.08	11.0 ± 1.5 (8.7-13.0)	7.8 ± 0.9 (6.9-9.3)
c	16.7 ± 3.16	30.5 ± 2.76	31.0 ± 0.6 (22-37)	28 ± 4.1 (2.6-5.1)
V	75.9 ± 1.16	—	73.0 ± 0.4 (72-73)	—
S1	—	22.6 ± 0.02	—	14 ± 1.6 (12-17)
S2	17.8 ± 2.51	16.7 ± 0.16	13 ± 0.5 (12-13)	13 ± 1.3 (11-15)

¹ n= numbers of nematodes, L=body length (μm), a=body length/greatest body width, b=body length/the distance from lips to the base of esophageal gland, c=body length/tail length, V=the distance of vulva from anterior end/body length x100 (%), S1=spicule length (μm), S2=stylet length (μm).

² M: male; F: female



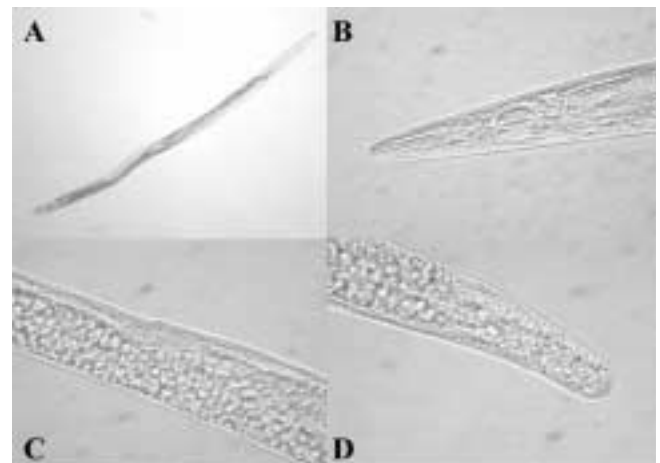
圖一、苗栗南庄 *Bursaphelenchus thailandae* 分離株 NZ 形態特徵。

Fig. 1. Morphological characteristics of *Bursaphelenchus thailandae* isolate NZ. A) male B) female C) head D) vulva flap absent E) male spicule weak, without cucullus F) female tail pointed.

mucronatus 兩個種的型態測量值範圍內 (表三)。這四個族群正確的分類地位目前尚無定論，其寄主包括馬尾松及台灣二葉松。

五、*Aphelenchoides* sp. :

從東海大學校園中琉球松林採得之分離株 (Tk)，經培養其族群中亦未發現雄蟲，此線蟲外部型態在光學顯微鏡下與典型松材線蟲相較差異甚大；各種蟲齡



圖二、本研究發現之 *Bursaphelenchus* sp. 形態特徵。

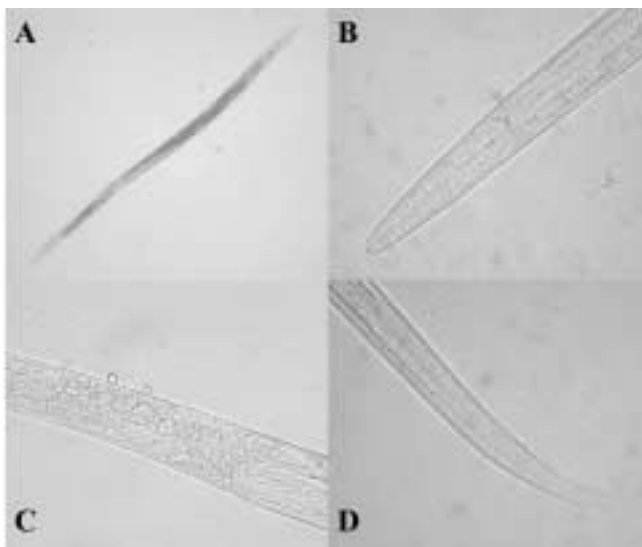
Fig. 2. Morphological characteristics of *Bursaphelenchus* sp. isolates found in this study. A) female whole body B) strong medium bulb C) vulva flap absent D) female tail blunt and rounded.

表三、台灣地區4個未知種 *Bursaphelenchus* sp. 族群之形態測量值Table 3. Morphometric measurements of 4 *Bursaphelenchus* sp. populations isolated from Taiwan

	Mm (馬祖)	Ms (南竿)	Ju (交大)	Cu (中央)	<i>B. xylophilus</i> (Mamiya & Kiyohara, 1972)	<i>B. mucronatus</i> (Mamiya, 1973)
	F ²	F	F	F	F	F
n ¹	25	25	25	25		
L	818 (762-933)	819 (775-893)	1014 (840-1123)	898 (735-971)	810 (0.71-1.01)	870 (700-980)
a	36.4 (27.9-40.2)	39.4 (37.5-42.3)	44.2 (38.9-48.0)	43.3 (35.4-45.7)	40.0 (33-46)	41.8 (37-46)
b	9.9 (8.3-12.5)	12.6 (10.2-14.8)	13.4 (9.0-14.7)	11.4 (9.6-12.9)	10.3 (9.4-12.8)	12.6 (9.6-15.9)
c	33.0 (27.8-33.9)	33.4 (31.4-35.7)	30.4 (31.9-36.2)	35.7 (32.3-38.7)	26.0 (23-32)	26.2 (20-30)
V	75.9 (70.5-77.3)	76.5 (68.5-79.7)	77.8 (72.5-79.6)	74.0 (69.2-78.0)	72.7 (67-78)	75 (73-77)
S2	16.4 (15-17)	15.3 (15-18)	15.4 (11-16)	16.1 (14-18)	15.9 (14-18)	15.8 (14-16)

1 n = numbers of nematodes, L=body length (μm), a=body length/greatest body width, b=body length/the distance from lips to the base of esophageal gland, c=body length/tail length, V=the distance of vulva from anterior end/body length x100 (%), S2=stylet length

2 F: female



圖三、東海大學感染松樹萎凋病之琉球松上分離之 *Aphelenchoides* sp. 形態特徵。

Fig. 3. Morphological characteristics of *Aphelenchoides* sp. isolated from *Pinus luchuensis* in Tunghai University. A) female B) head C) vulval region D) female tail with several spikes.

之中部食道球佔體寬 3/4 以上 (圖三 A、B)；雌蟲不具陰門蓋 (圖三 C)，尾部微向腹側彎曲並具有數個尾突，尾部的多個尾突為松材線蟲以及葉芽線蟲最重要的分野之一 (圖三 D)；故將之暫定為葉芽線蟲 (*Aphelenchoides*) 屬；與台灣已發表的 *A. besseyi* 型態測量值相比，除了食道佔身體的比例 (b 值)，以及陰門位

表四、由琉球松分離之 *Aphelenchoides* sp. 分離株 TK 形態測量值

Table 4. Morphometric measurements of TK-*Aphelenchoides* sp. population isolated from *Pinus luchuensis*.

	Tk (東海)	<i>Aphelenchoides besseyi</i> (Fortuner, 1970)
n ¹	25	—
L	889.3 (724.6-902.5)	680 (570-840)
a	39.29 (28.43-42.25)	47.7 (39-53)
b	11.09 (9.87-16.57)	11.46 (9.2-13.1)
c	25.34 (21.50-30.66)	17.7 (13.8-20.4)
V	75.65 (70.92-77.53)	71.2 (58.7-73.6)
S ²	18.31 (15.98-20.57)	11.9 (10.0-12.5)

¹ n = numbers of nematodes, L=body length (μm), a=body length/greatest body width, b=body length/the distance from lips to the base of esophageal gland, c=body length/tail length, V=the distance of vulva from anterior end/body length x100 (%), S2=stylet length

² F: female

置比例 (V 值) 相似之外，並無其他相同之處 (表四)。故此族群正確之分類地位更待進一步鑑定。

將 19 個分離株接種於日本黑松、台灣二葉松及台灣五葉松上，測試其病原性，最感病的日本黑松接種

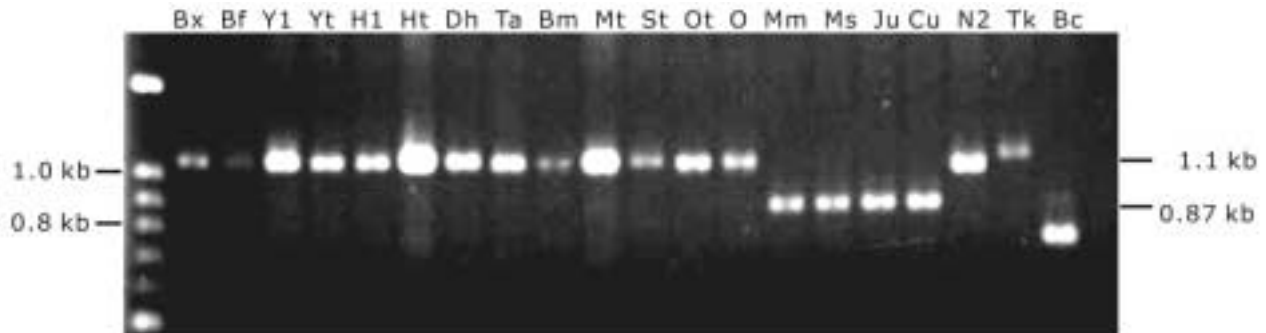
表五、十九個松樹萎凋病原線蟲族群分別接種日本黑松、台灣二葉松及五葉松35天之後松樹的發病率

Table 5. The morbidity of *Pinus thunbergii*, *P. taiwanensis* and *P. morrissonicola* 35 days after pine wilt nematode inoculation.

Isolate Code	Bx	Bm	Bf	Yl	Yt	Hl	Ht	Ta	Dh	Mt	Ot	St	O	Mm	Ms	Ju	Cu	Nz	Tk
<i>P. thunbergii</i>	100 ¹	75	100	25	0	50	100	100	75	0	75	0	100	0	0	0	0	0	0
<i>P. taiwanensis</i>	50	0	75	0*	0	25*	0*	100	100	0	0	0	0*	0	0	0	0	0	0
<i>P. morrissonicola</i>	0 ²	0	50	0	0	0	0	100	50	0	0	0	0*	0	0	0	0	0	0

¹ The percentage of morbidity of four Pine trees from each species.

² * pine wilt nematodes were found in the plant tissue of pine trees without symptoms.



圖四、十九個松樹萎凋病原線蟲族群經專一性引子對增幅其rDNA ITS區間產物之電泳圖譜

Fig. 4. The PCR products of rDNA ITS regions from 19 pine wilt nematode populations. Line Bx to Ta were *Bursaphelenchus xylophilus* isolates; line Bm to O were *B. mucronatus*; line Mm to Cu were *Bursaphelenchus* sp.; line N2 was *B. thailandae*; line Tk was *Aphelenchoides* sp. and line Bc was *Botrytis cinerea* check.

B. xylophilus (Bf)，於第10天觀察發現上位葉開始退色缺綠，第14天時，下位葉開始褐化乾枯，接著全株由葉基部開始向外產生萎凋的情形，在21天時，從頂芽開始褐化萎凋，到第28天大部分葉已經完全乾枯，僅有少部份仍為青綠色，而在35天時，所有的針葉已完全褐化，全株呈現紅褐色萎凋情形。

八個分離株 *B. xylophilus* 當中，有7個分離株可以對日本黑松產生致病力，Bx、Bf、Ht及Ta在接種後35天達到100%致病率。而五個 *B. mucronatus* 族群，僅Bm、Ot和O在日本黑松上造成病徵。其他分離株包含 *B. thailandae*、*Bursaphelenchus* sp. 及 *Aphelenchoides* sp. 三個種；在日本黑松上不造成萎凋病徵(表五)。

接種台灣二葉松第35天時，*B. xylophilus* 的Bx、Bf、Hl、Dh及Ta五個分離株，可導致松樹發生萎凋病，而 *B. mucronatus* 皆不會在台灣二葉松上產生病徵(表五)。進一步分析線蟲數則顯示O分離株在台灣二葉松莖幹中每克乾重可分離到90.3隻。此外，蟲數分析結果顯示，接種35天後，*B. xylophilus* 除了Yt分離株無病徵亦未發現線蟲外，其他七個分離株均可自台灣二葉松中再次分離出，每克最高可達1327.9隻，顯示即使未產生病徵，這些松材線蟲族群也可殘存於台灣二葉松上。

本研究所收集之分離株，僅Bf、Dh及Ta等3株 *B. xylophilus* 分離株可在台灣五葉松上造成病徵，Ta在21天時，便使接種植株發病，而原本分離自台灣五葉松之Dh於接種後35天時，亦造成50%接種松樹的發病率(表五)。蟲數分析結果顯示，Bx及O分離株雖未產生病徵，但五葉松中卻可分離到5.51到2.66隻之線蟲。

由以上結果顯示，日本黑松為最感病品種，*B. xylophilus*、*B. mucronatus* 及分離自二葉松之 *Bursaphelenchus* sp. 都可以感染並在其上造成病徵。台灣五葉松感受性最低，僅3/8的 *B. xylophilus* 分離株可造成病徵。此外 *Bursaphelenchus thailandae*、*Bursaphelenchus* sp. (Ms、Ju及Cu) 以及 *Aphelenchoides* sp. 所屬之5個分離株對於3種松樹完全沒有病原性，亦在接種處之外分離不出線蟲(表五)。

利用ITS區間專一性引子對增幅19個分離株，將產物進行電泳分析，結果顯示，包括 *B. xylophilus*、*B. mucronatus* 及 *B. thailandae* 等14株分離株，得到片段大小約為1050 bp之產物，而 *Bursaphelenchus* sp. 4個分離株其片段大小皆約為900 bp。*Aphelenchoides* sp. 分離株之片段則稍大，約為1100 bp。所有的線蟲DNA並未增幅出與對照組 *Botrytis cinerea* 大小相同之片段(圖四)。而由解序所得之線蟲序列資料，兩兩進

表六、本試驗分離之十九個松樹萎凋病原線蟲 ITS 區間兩兩比較後之相似度

Table 6. The similarity percentage of pair-wise comparison of the nineteen isolates ITS regions.

	Bx	Bf	Yl	Yt	Hl	Ht	Ta	Dh	Bm	Mt	Ot	St	O	Nz	Ju	Cu	Mm	Ms	Tk
Bx	100 ¹	100	100	99	100	99	100	100	91	91	91	91	91	62	52	52	52	52	59
Bf		100	100	100	100	99	100	100	91	91	91	91	91	62	52	52	52	52	59
Yl			100	100	100	99	100	100	91	91	91	91	91	62	52	52	52	53	59
Yt				100	100	100	99	99	91	91	91	91	91	62	52	52	52	52	59
Hl					100	99	100	100	91	91	91	91	91	62	52	52	52	52	59
Ht						100	99	99	90	91	91	91	90	62	52	52	52	52	59
Ta							100	100	91	91	91	91	91	62	52	52	52	52	59
Dh								100	91	91	91	91	91	62	52	52	52	52	59
Bm									100	100	100	100	100	62	54	54	54	54	59
Mt										100	100	100	100	62	54	54	54	54	59
Ot											100	100	100	62	54	54	54	54	59
St												100	100	62	54	54	54	54	59
O													100	62	54	54	54	54	59
Nz														100	50	50	51	51	64
Ju															100	99	99	99	56
Cu																100	99	99	56
Mn																	100	99	56
Ms																		100	57
Tk																			100

¹ The percentage of similarity.

行相似度比較，發現形態鑑定為 *B. xylophilus* 之分離株，序列上的相似度約在 99% 到 100% (表六)。於本島分離之四個 *B. mucronatus* 分離株相似度為 100%，但馬祖地區採得知 Mm 分離株與這群僅有 54% 相似度，而型態上為未知種之 O 分離株則和此群序列相似度達 100%。分類地位未定之三個分離株 Ju、Cu、Ms，其序列相似度為 99% 但與 *B. xylophilus* 僅有 52% 相似度；與 *B. mucronatus* 為 54% 相似。*B. thailandae* 與兩種已知松材線蟲的序列皆不相似；僅有 62% 相似度，而 *Aphelenchoides* sp. 的相似度就更低僅有 56-59% (表六)。

將線蟲 ITS 序列解序後，以 VECTOR NTI 7.0 軟體進行親緣性之比對，並參考基因庫中 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 *B. xylophilus* BXU92464 及 *B. mucronatus* AY347916 等已發表之松材線蟲 ITS 區間序列。比對發現 *B. mucronatus* AY347916 與型態上鑑定為擬松材線蟲的 5 個分離株約有 74% 的相似度；而 *B. xylophilus* BXU92464 也與本研究發現之 8 個分離株相似度在 82% 到 83% 之間，相較之下，*B. thailandae*、*Bursaphelenchus* sp. 及 *Aphelenchoides* sp. 與上述兩者之間關係則較疏遠，約在 54% 到 62% 之間。

討 論

此次研究調查松材線蟲的種類由原本的 *B.*

xylophilus, *B. mucronatus* 增加了 *B. thailandae* 及一個未知的 *Bursaphelenchus* sp.。由於這四個暫列於 *Bursaphelenchus* sp. 的族群在培養過程中皆沒有發現雄蟲，因此無法利用 Ryss 等人於 2005 年發表的檢索表將之鑑定至種的地位。但是基於此線蟲的口唇部隆起 (off-set)，中部食道球占體寬的四分之三以上以及尾部的型態為不具分岔的特徵，確定為 Aphelenchoididae 科、松材線蟲屬 *Bursaphelenchus*。分離株 Tk，因其尾部具有 3-4 個分岔，明顯不屬於松材線蟲⁽²⁴⁾，且其 ITS 區間之序列結果將之親緣性列為近似於 *Aphelenchus avenae*，故將之歸類於 *Aphelenchoides* 屬。本次線蟲病原測試當中 *Bursaphelenchus* sp. 及 *Aphelenchoides* sp. 皆無法成功感染日本黑松、台灣二葉松及五葉松，且接種松樹中亦未觀察到這些線蟲族群。故其與松樹萎凋病的關係，需再進行更多的測試佐證。

台灣地區本土松樹有 4 種，分別為台灣二葉松、馬尾松、台灣五葉松以及台灣華山松，就山區的垂直分佈狀況而言，馬尾松及台灣五葉松多分佈於 300-1500 公尺高的山地，偶有小面積種植，而台灣二葉松及台灣華山松的分布較廣，約在 800-3500 公尺山區⁽⁹⁾。其中以台灣二葉松較為普遍，常可形成大面積的純林相。全省包括離島所採得之 19 個分離株，寄主囊括五種松樹，本土松樹除了華山松之外加上琉球松及日本黑松，這五種松樹除了馬尾松之外，在前人研究中皆

有感病的報導^(8, 9, 26, 28, 29)。本次試驗 *B. xylophilus* 的 8 個分離株採集之寄主包含五種松樹；*B. mucronatus* 的 5 個分離株則由琉球松及台灣二葉松上採得；*B. thailandae* 由琉球松上採得；而四個未知種則由馬尾松及台灣二葉松上分離得來。此結果表示，目前自然分布中以 *B. xylophilus* 所感染的寄主範圍最廣。以此次採集地點而言，*B. mucronatus* 主要分布在中部山區，而 *B. xylophilus* 則廣泛分布於整個北台灣（南投台中以北）、東台灣，又以北部及台中盆地附近為主。就整個萎凋病的分布而言，松樹萎凋病已從原本的北部地區蔓延至台灣中部、東部以及外島馬祖。

爲了測試各個分離株的寄主範圍，本研究將所有的分離株接種至三種松樹上；分別是日本黑松、台灣二葉松及台灣五葉松，因爲純系之琉球松及馬尾松苗取得不易，故尚未執行接種病原性測試。此試驗並首次於野外台灣五葉松上分離出松材線蟲 *B. xylophilus*，完成柯霍氏法則，證明 *B. xylophilus* 可以感染台灣五葉松且對日本黑松及台灣二葉松亦有高度的致病力。接種三種松樹的結果顯示，致病能力最強的爲 *B. xylophilus*，其三個分離株 Bf, Dh, Ta 可以成功感染三種供試松樹；而 *B. mucronatus* 僅兩個分離株可以感染日本黑松；*B. thailandae* 以及未知種的四個族群在此次研究的接種試驗中，並無感染松樹的情況。不同地區不同來源的松材線蟲致病力有些許差異⁽³⁾，曾有報導指出，由歐洲赤松 (*Pinus sylvestris*) 分離之 *B. xylophilus* 族群可以感染歐洲赤松以及奧地利松 (*P. nigra*)；而由白松 (*P. strobes*) 上分離的族群僅能感染白松⁽²³⁾。本次接種試驗僅包含三種供試松樹，其結果並無法證明生理小種的存在，僅能顯示不同族群間有致病力的差異。Ta 分離株自感染的松樹組織中分離的蟲量最低（每克松樹組織 3.8 隻線蟲）但造成松樹死亡率卻達到 100%，顯示其僅須少量的族群密度就可使產生松樹萎凋病，也暗示了不同族群的致病毒力也有差異。

自陽明山黑松 (Yt)、武陵 (Mt) 及勝興 (St) 二葉松所分離之三個族群，回接至黑松及二葉松，均未產生病徵。這三個分離株皆於 1997 年分離，至 2005 年本研究進行接種試驗爲止，已經於 *Botrytis cinerea* 上人工繼代培養 8 年之久。在 *Botrytis cinerea* 上經長時間繼代培養 (subculture) 後，可能受環境以及取食之營養物質改變，而造成病原性的突變，喪失對於原本松樹品種的致病性⁽³⁾。但是其它數個分離株雖然不會在二葉松及五葉松上造成病徵，經分離接種松樹發現高線蟲量，表示這些族群可以於松樹之中繁殖，但卻未必造成松樹萎凋或死亡。如 *B. xylophilus*-Ht 分離株在台灣二葉松尚未造成病徵但平均每克松樹組織中可分離到

1327.9 隻線蟲；*B. mucronatus*-O 分離株，在台灣二葉松及台灣五葉松上均未產生病徵，但卻仍發現線蟲在平均每克接種植株中分別有 90.3 及 2.7 隻線蟲。

松材線蟲的生活史中，其三齡幼蟲在松樹中等待傳播媒介昆蟲羽化的期間，以取食樹木中的真菌菌絲維生，這種兼行腐生的特性使得它們可以在非寄主的松樹中存活下來，進行共生的行爲。共生的現象是自然演化當中產生寄生現象可能的先前步驟，這也許解釋了爲何松材線蟲寄生不同松樹品種的能力，演化的如此快速。

自馬祖、南竿、交大及中央大學分離之松材線蟲在培養及觀察過程中未發現雄蟲，此一現象就松材線蟲而言並未曾出現於文獻當中，孤雌生殖現象的產生，也許代表著線蟲在適應環境時，改變了原本的繁殖模式，且單一幼蟲的培養 28 天之後，均有相當高的繁殖成功率。孤雌生殖的模式一般相信較兩性生殖爲後演化出⁽¹⁰⁾；可能的起因則是非同種的子代爲了克服減數分裂中同源染色體配對的困難，而演化出只有絲分裂的方式來繁殖後代。這個首次發現只有孤雌生殖的松材線蟲 *Bursaphelenchus* sp. 族群是否具有演化上的意義，則需進行染色體的觀察才能證明。

本研究中尚發現與 2002 年發表於泰國之新種 *B. thailandae* 型態特徵相符之分離株，唯蟲體長度較 *B. thailandae* 長⁽⁶⁾，在本次研究的接種測試結果發現此一分離株均無法感染日本黑松、台灣二葉松與台灣五葉松。泰國之 *B. thailandae* 首先發現於南洋松 (*P. merkusii* Jungh & de Vriese) 上⁽⁶⁾，本分離株係從琉球松分離，但本研究並未進行相關接種實驗。

自東海大學琉球松所分離之線蟲 *Aphelenchoides* sp.，於此次接種試驗亦未感染日本黑松台灣二葉松以及五葉松，然而，在東海大學卻有 2000 株以上的琉球松死亡。另外，在位置接近的台中清泉崗高爾夫球場，亦發現有超過 5000 株左右的松樹死亡情形，勘察結果未發現有 *B. xylophilus* 與 *B. mucronatus*，但卻可分離到與此一 *Aphelenchoides* sp. 型態上類似之線蟲，此線蟲與琉球松之萎凋病的發生相關性，必須在收集足夠的琉球松苗之後才可以釐清。

參考文獻

1. Abad, P. 2004. Satellite DNA used as a species specific probe for identification of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Pages 155-163 in: *Nematology Monographs and Perspectives Volume 1: The pine wood nematode, Bursaphelenchus xylophilus*. Mota, M. and Vieira, P., eds. Koninklijke

- Brill NV, Leiden, The Netherlands, 291pp.
2. Beckenbach, K., Blaxter, M., Webster, J. M. 1999. Phylogeny of *Bursaphelenchus* species derived from analysis of ribosomal internal transcribed spacer DNA sequences. *Nematology* 1 (5): 539-548.
 3. Bolla, R. I., Weaver, C., Koslowski, P., Fitzsimmons, K., and Winter, R. E. K. 1987. Characterization of non-parasitic isolate of *Bursaphelenchus xylophilus*. *J. Nematol.* 19: 304-310.
 4. Bolla, R.I., Weaver, C., and Winter, R.E.K. 1988. Genomic differences among pathotypes of *Bursaphelenchus xylophilus*. *J. Nematol.* 20: 309-316.
 5. Bolla, R.I., and Wood, R. 2004. Pine wood nematode: pathogenic or political? Pages 31-54 in: *Nematology Monographs and Perspectives Volume 1: The pine wood nematode, Bursaphelenchus xylophilus*. Mota, M. and Vieira, P., eds. Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands, 291pp.
 6. Braasch, H. and Braasch-Bidasak, R. 2002. First record of the *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 in Thailand and description of *B. thailandae* sp. n. *Nematology* 4 (7): 853-863.
 7. Braasch, H. and Burgermeister, W. 2002. *Bursaphelenchus rainulfi* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae), first record of the genus *Bursaphelenchus* Fuch, 1937 from Malaysia. *Nematology* 4 (8): 971-978.
 8. Chang, R. J., Cheng, T. C., Feng, Y. S., Hsu, K., and Ho, Y. M. 1994. The occurrence of pine wilt disease in Kimen. *Taiwan For. Sci.* 20 (11): 12-13. (in Chinese)
 9. Chang, R. J. and Lu, S. S. 1996. Investigation of the occurrence of pine wilt disease and its naturally infected hosts in the Fushan Botanical Garden. *Taiwan J. For. Sci.* 11 (2): 201-207. (in Chinese)
 10. Chen, P., Roberts, P. A., Metcalf, A. E. and Hyman, B. C. 2003. Nucleotide substitution patterning within the *Meloidogyne* rDNA D3 region and its evolutionary implications, *J. Nematol.* 35: 404-410.
 11. Cheng, H. R. 1986. Study on the morphological diagnosis and the pathogenicity of *Bursaphelenchus mucronatus*. *J. Nanjing Agr. Soc.* 2: 55-61. (in Chinese)
 12. Dorpkin, V. H., Foudin, A., Kondo, E., Linit, M. and Smith, M. 1981. Pinewood nematode: A threat. *Plant disease* 65: 1022-1027.
 13. Giblin-Davis, R. M., Mundo-Ocampo, M., Baldwin, J. G., Norden, B. B. and Batra, S. W. T. 1993. Description of *Bursaphelenchus abruptus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae), an associate of a digger bee. *J. Nematol.* 25:161-172.
 14. Harmey, J. H. and Harmey, M. A. 1993. Detection and Identification of *Bursaphelenchus* species with DNA fingerprinting and polymerase chain reaction. *J. Nematol.* 25: 406-415.
 15. Hirata, K., Suzuki, K., and Hisai, J. 2004. A comparative study on the efficiency of cutting and drilling methods for the Baermann funnel to extract pine wood nematodes (*Bursaphelenchus xylophilus*) from wood sample. *Res. Bull. Plant Prot. Japan* 40: 75-77. (in Japanese)
 16. Iwahori, H., Tsuda, K., Kanzaki, N., Izui, K. and Futai, K. 1998. PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease. *Fundam. Appl. Nematol.* 21: 655-666.
 17. Kanzaki, N., Tsuda, K., and Futai, K. 2000. Description of *Bursaphelenchus conicaudatus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae), isolated from the yellow spotted longicorn beetle, *Psacothoe hilaris* (Coleoptera: Cerambycidae) and fig tree, *Ficus carica*. *Nematology* 2 (2): 165-168.
 18. Mamiya, Y. 1988. History of Pine Wilt Disease in Japan. *J. Nematol.* 20: 219-226.
 19. Mota, M. M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas, A. C., Burgermeister, W., Metge, K., and Sousa, E. 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1 (7-8): 727-734.
 20. Ni, H. F., Cheng, Y. H., Chen, R. S., Tsay, T. T. and Chen, D. Y. 2003. Discrimination of *Xiphinema* species from Taiwan by rDNA RFLP analysis. *Plant Patho. Bull.* 12:235-241. (in Chinese)
 21. Nickel, W. R. 1970. A taxonomic review of the genera of the Aphelenchoidea Fuchs, 1937 Thorne. 1949. (Nematoda: Tylenchida). *J. Nematol.* 2: 375-392.
 22. Nickle, W. R., Golden, A. M., Mamiya, Y. and Wergin, W. P. 1981. On the taxonomy and morphology of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, (Steiner & Buhner 1934) Nickle 1970. *J. Nematol.* 13: 385-392.
 23. Riggs, R.D. 1991. Resistance-breaking races of plant parasitic nematodes. Pp. 827-851, in: *Manual of Agricultural Nematology*. Nickle, W.R. eds. Marcel Dekker Inc. New York, U.S. A.
 24. Ryss, A., Vieira, P., Mota, M. and Kulinich, O. 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology* 7 (3): 393-458.
 25. Tzean, S. S. and Yen, J. H. 1989. The development and control of pine wilt nematode in Taiwan. In: *Proceeding symposium on plant nematode disease control*. Tu, C. C. and Cheng, Y.H. eds. Pp.15-32. Taiwan Agricultural Research Institute. (in Chinese)
 26. Tzean, S. S., Yen, J. H. and Chang, R. J. 1997. Pine wood nematode page. 42 pp. *Taiwan For. Res. Ins.* (in

- Chinese)
27. Wu, M.-L., Chang, T.-T., Fu, C.-H., Feng, Y.-C., Wang, L.-C. 2004. PCR detection applied in a study of the causal agent of pine wilt disease in Taiwanese red pine, *Pinus taiwanensis*. Taiwan J. For. Sci. 19: 89-96. (in Chinese)
 28. Yen, J. H. and Tzean, S.S. 1996. Study on the complex causal agents of Japanese black pine, *Pinus thunbergii*. Plant Prot. Bull. 38:215-224. (in Chinese)
 29. Yen, J. H., Tzean, S.S. and Chang, R. J. 1997. Occurrence of pine wilt disease in Taiwan red pine, *Pinus taiwanensis*, in Taiwan. Plant Patho. Bull. 6: 49-57. (in Chinese)
 30. Yu, P. C. and Tsay, T. T. 2004. Occurrence of a foliar nematode disease of fern in Taiwan. Plant Patho. Bull. 13:35-44. (in Chinese)
 31. Zheng, J., Subbotin, S. A., He, S., Gu, J., and Mose, M. 2003. Molecular characterisation of some Asian isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* using PCR-RFLPs and sequences of Ribosomal DNA. Russian J. Nematol. 11: 17-22.

ABSTRACT

Chen, P.¹, Huang, Y.Y.¹, Tsay, T.T.¹ and Yen, J.H.^{2,3}. 2006. Distribution of Pine wilt diseases in Taiwan and the study of its causal nematodes. *Plant Pathol. Bull.* 15:263-274 (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ² Agricultural extension service center, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ³ Corresponding author, Email: jhyen@nchu.edu.tw; Fax: +886-4-22860267)

The distribution of pine wilt diseases and the nematode associated with the disease were investigated in this study. Using morphometric data and ITS region sequences in the rDNA, a total of 19 isolates were classified into five groups, including *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus*, a new described species *B. thailandae*. Two groups including 5 isolates were not able to be identified to species according to the current keys, they were referred to as *Bursaphelenchus* sp. and *Aphelenchoides* sp. in this study. Among 19 isolates studied, 8 were identified as *B. xylophilus*, those isolates were collected from the northern, central and eastern part of Taiwan. Five isolates belonged to *B. mucronatus* and were collected from northern and central Taiwan. *B. thailandae* was only found in Nan-Chuan in Miaoli County; *Bursaphelenchus* sp. isolates were found in Tao-Yuan, Hsing-Chu Counties and Ma-Zu islands. *B. xylophilus* isolated from the field were inoculated on *Pinus taiwenensis* and *P. morrisonicola*, were able to produce pine wilt disease symptoms, while all the isolates of *B. mucronatus* were not able to. But O isolate was found to reproduce inside the pine trees. *B. thailandae*, *Bursaphelenchus* sp. and *Aphelenchoides* sp. could neither cause symptoms nor reproduce on these 3 pine trees. The ITS sequences showed very little variation within the species of *B. xylophilus* and *B. mucronatus* isolates found in Taiwan. Four isolates of *Bursaphelenchus* sp. only had 1 % differences, indicating these 4 isolates were potentially the same species.

Key words: Distribution, *Bursaphelenchus mucronatus*, *B. thailandae*, *B. xylophilus*, *Pinus morrisonicola*, *P. taiwenensis*, Pine wilt disease