

利用核糖體內轉錄區間序列及聚合酵素連鎖反應檢測作物根瘤線蟲¹

倪蕙芳² 陳瑞祥³ 王美華² 蔡東纂⁴ 程永雄^{2,5}

摘要

倪蕙芳、陳瑞祥、王美華、蔡東纂、程永雄。2003。利用核糖體內轉錄區間序列及聚合酵素連鎖反應檢測作物根瘤線蟲。中華農業研究 52:1-13。

本研究主要目的為比對分析台灣地區作物根瘤線蟲的核糖體 DNA 序列，並藉以設計對根瘤線蟲具有專一及靈敏特性之引子對，配合聚合酵素連鎖反應(PCR)增幅技術，研發作物根瘤線蟲之分子檢測系統。利用過去相關研究中之植物病原線蟲通用性引子，自南方根瘤線蟲、爪哇根瘤線蟲、花生根瘤線蟲以及水稻根瘤線蟲 DNA 增幅含內轉錄區間及 5.8S 之核糖體 DNA 序列。經選殖解序後發現南方、爪哇及花生等根瘤線蟲彼此間之序列相同度可達 99%，而與水稻根瘤線蟲間之相同度則僅有 85%。經以得自南方根瘤線蟲 DNA 序列設計檢測用 PCR 引子對 Mi148/Mi452，利用此引子對可自根瘤線蟲 DNA 獲得一約 342 bp 的專一性增幅產物，而測試其它屬之植物病原線蟲或腐生性線蟲則無類似之 PCR 產物。利用此引子對可以由病株及土壤中順利偵測到根瘤線蟲之存在。此外，經測試發現此引子對敏感度可達 10 pg，並可在僅有 5 隻二齡幼蟲存在的土壤中檢測出根瘤線蟲，顯示此專一性引子對可實際應用於田間作物根瘤線蟲檢測之所需。

關鍵詞：根瘤線蟲、聚合酵素連鎖反應、核糖體 DNA、內轉錄區間序列、分子檢測。

前言

根瘤線蟲是本省蔬菜、花卉、果樹、根莖薯類及特用作物最主要之植物寄生性線蟲，也是國際上植物檢疫之品管病原，其在植物寄生性線蟲中是分佈最為廣泛且危害相當嚴重的世界性病害(蔡 1995)。台灣地區 *Meloidogyne* 屬線蟲之種類，目前已有記錄者計有 *M. incognita*(南方根瘤線蟲)、*M. javanica*(爪哇根瘤線蟲)、*M. hapla*(北方根瘤線蟲)、*M. arenaria*(花生根瘤線蟲)以及 *M. graminicola*(水稻根瘤線蟲)等五種(王等 1977；程 & 杜 1980；蔡 1997)。根瘤線蟲侵害作物根部時，其病徵有在根系上形成大小不一的腫瘤者，有於根系上結瘤呈念珠狀者，亦有結瘤於根系末端者，甚至也有不出現

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2140 號。接受日期: 91 年 11 月 30 日。
2. 本所嘉義分所助理研究員、研究助理及研究員兼分所長。臺灣省 嘉義市。
3. 國立嘉義大學生物科技研究所助理教授。臺灣省 嘉義市。
4. 國立中興大學植物病理學系副教授。臺灣省 臺中市。
5. 通訊作者，電子郵件：cyh@dns.caes.gov.tw；傳真機：(05)2773630。

腫瘤者；其在本省氣候下的繁殖力一年可達 11 世代，在短短一個月的生活史中可以產 3 至 4 次卵，每次產卵由 200 至 2000 個不等，其繁衍速度極快，頗具為害作物之潛力(蔡 1995)。

由於根瘤線蟲在個體形態具有明顯的差異性，因此在鑑定上常增加許多複雜性(Harmann & Saesser 1985)，而正確的鑑定根瘤線蟲種類在許多研究工作進行前，甚至在病害成功管理上都是相當重要問題，特別在一些歸屬於檢疫線蟲的種類鑑定上更為重要(Zijlstra 2000)。傳統根瘤線蟲之鑑定以形態特徵，如陰門膜紋之型式及寄主範圍來加以區分(程 & 杜 1980；Eisenback 1985；Eisenback *et al.* 1981)，然而有些用來做為鑑定的關鍵特性可能因遺傳變異或因環境影響而改變，因此增加了鑑定工作之困難度。近年來，隨著核酸生物技術之進步，有關線蟲之鑑別方法已有利用基因體 DNA(Carpenter *et al.* 1992；Van der Beek *et al.* 1998)或是粒線體 DNA 之限制酵素長度多型性圖譜(RFLP) 進行分析(Powers *et al.* 1986；Harris *et al.* 1990)，或者利用逢機增幅多型性核酸技術(RAPD)來進行分析(Powers *et al.* 1986；Cenis 1993；Baum *et al.* 1994；Castagnone-Sereno *et al.* 1994；Fragette *et al.* 1994；Blok *et al.* 1997；Williamson *et al.* 1997)，以及利用核糖體 DNA(rDNA)序列進行分析等(Zijlstra *et al.* 1995, 1997；Peterson & Vrain 1996；Peterson *et al.* 1997；Zijlstra 1997)。

以核糖體 DNA 而言，真核細胞中之核糖體 DNA 中由 18S、28S 以及 5.8S 的次單元(subunit)基因所組成，而整段 rDNA 中包含了轉錄區(transcribed region)及非轉錄區(non-transcribed region)，已知 rDNA 基因在轉錄區之序列於同種或不同種生物間具有極高之相似性，然而在非轉錄區間，在不同種甚至種內之序列相似性則極低，因此在高度相似性之轉錄區之序列可以作為屬分類之依據，而在序列變異性大的非轉錄區間序列則可作為種內或種間鑑別之依據(Powers *et al.* 1997；Gasser 2001)。因此，應用核糖體 DNA 序列差異性之比對分析，已成為線蟲種間或種內鑑定之研究模式(Hoste *et al.* 1993，1995，1998；Campbell *et al.* 1995；Hoglund *et al.* 1999)。

由於目前台灣地區作物根瘤線蟲之檢測或鑑定，尚未見應用分子生物技術之相關文獻報告。因此本研究首先利用線蟲核糖體 DNA 通用性引子對(universal primer pair)，將台灣主要根瘤線蟲之核糖體 DNA 序列進行解析，並與國外報告之根瘤線蟲核糖體 DNA 序列比對分析，藉以了解台灣地區與國外存在根瘤線蟲間之親緣關係，並嘗試由核糖體內轉錄區間(internal transcribed spacer, ITS)序列設計檢測作物根瘤線蟲之專一性引子，以作為台灣地區常見根瘤線蟲檢測之用，並期望藉此建立診斷鑑定技術，作為未來重要作物線蟲防檢疫工作之模式基礎。

材料與方法

根瘤線蟲之來源

本研究所使用之植物根瘤線蟲乃由國立中興大學植病系線蟲研究室所保存，依根瘤線蟲母蟲的陰門膜紋，分別鑑定為南方根瘤線蟲(*Meloidogyne incognita*)、爪哇根瘤線蟲(*M. javanica*)、花生根瘤線蟲(*M. arenaria*)，以及水稻根瘤線蟲(*M. graminicola*)。將感染 *M. incognita*、*M. javanica* 之罹病根部土壤洗淨挑取線蟲單一卵塊，將孵化之二齡幼蟲接種在甕菜(農友種苗)之幼苗根部，*M. arenaria* 則接種於花生根部；另外 *M. graminicola* 則接種於水稻根部。上述接種植株，置於溫室中培養待卵塊成熟後做為 DNA 抽取之來源或孵化後為二齡幼蟲之來源。

線蟲 DNA 之抽取

由罹病根部收集之根瘤線蟲卵塊後以無菌水漂洗兩次，置於研鉢中以液態氮將其冷凍磨碎，再加入 200 μ l 萃取 DNA 用之緩衝液(200 mM Tris-HCl, pH 8.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5 % SDS; 60 μ g/ml Proteinase K)，置於 37°C 中作用過夜，繼而取出離心，將上層液依 DNA 純化組(DNA clean up kit, Promega, Madison, USA)所示之方法進行總量 DNA 之純化，經過管柱純化後之 DNA 溶於 30 μ l 無菌水中，以作為 PCR 反應之 DNA 模板。

rDNA ITS 區間(含 5.8S)序列之增幅

總計 50 μ l 增幅反應液中含通用性引子對 18S 及 28S(18S: 5'TTGATTACGTCCTGCCCTTT3'; 28S: 5'TTTCCTCGCCGTTACTAAGG3')(Vrain *et al.* 1992)各 1 μ M, A、T、C、G 四種 deoxyribonucleotide (dNTP)各 0.2 mM, 一單位(unit)Yea Tag DNA polymerase(Yestern Biotech Co., Taiwan), 1 X Taq reaction buffer 及 10 ng 供試模板 DNA, 進行 PCR 反應, 並於溫度循環控制反應器(BioRad, CA, USA)進行聚合酶連鎖反應。反應器所設定之反應程式為: 先以 94°C 4 分鐘使雙股 DNA 分開成單股後, 再以 94°C 30 秒變性(denaturing)、52°C 30 秒黏合(annealing)、72°C 1 分鐘延長(extension)進行 30 個循環(cycles), 最後再以 72°C 反應 7 分鐘進行 PCR 產物最後延長。反應後, 吸取 10 μ l PCR 增幅產物, 以 1.5 %瓊脂凝膠及 1 X TBE 緩衝液, 以 5 V/cm 之電壓進行電泳分析, 經 EtBr 染色後, 觀察聚合酶連鎖反應的結果。

聚合酶連鎖反應產物之選殖及核酸定序

為進一步確定上述所得之 PCR 產物為 *Meloidogyne* sp.之 rDNA, 將增幅產物以 QIAGEN 公司所開發生產的 QIAquick PCR purification kit 純化去除不必要的干擾後, 以 p-GEM-T easy 載體(Promega, Madison, USA)連結後轉形於 DH5 α 大腸桿菌中, 轉形成功之菌株以 Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system(Promega, Madison, USA)純化質體 DNA, 經定量後, 繼而委由台灣生工有限公司以 T7 及 Sp6 為解序引子進行 DNA 的定序。

rDNA 序列比對及專一性 PCR 引子對設計

將上述定序完成後所獲得之南方、爪哇、花生及水稻根瘤線蟲 rDNA 序列應用 GCG 程式與由 GeneBank 及 EMBL 等序列資料庫中所登錄之 *Meloidogyne* 屬之線蟲進行比對。並利用南方根瘤線蟲之 rDNA 區段之序列, 以 GCG 系統中的引子設定程式設計一組分別位於 ITS1(18S 至 5.8S 區間)及 ITS2 區(5.8S 至 28S 區間)之引子對 Mi148:5'GCTGGTGTCTAAGTGTTC 3'及 Mi452: 5'CCGCTATAAGAGAAAATGACCC3'。

Mi148 及 Mi452 引子對根瘤線蟲偵測之敏感度及專一性測試

於體積 50 μ l 的 PCR 反應中, 分別利用不同濃度之根瘤線蟲 DNA 做為反應模板, 以 Mi148 及 Mi452 為增幅引子對, 於 94°C 30 sec、55°C 30 sec、72°C 30 sec 中進行 30 個增幅循環, 同上法以電泳觀察結果。此外, 為進一步探討此對引子之專一性, 本研究分別利用土壤中常見的腐生性線蟲(*Rhabditis* spp.)、柑桔線蟲(*Tylenchulus semipenetrans*)、劍線蟲(*Xiphinema* sp.)、鞘線蟲(*Hemicriconemoides* spp.)、根腐線蟲(*Pratylenchus* sp.)及冠線蟲(*Hoploaimus* sp.)等線蟲之 DNA 為反應模板, 同上述以 Mi148 及 Mi452 為增幅所用之引子進行 PCR 反應後, 進行電泳分析其結果。

Mi148 及 Mi452 引子對檢測植物根部及土壤中根瘤線蟲之測試

秤取 0.1 g 之根系樣品, 以清水將土壤沖洗乾淨, 並以衛生紙將水份吸乾, 經液態氮研磨後以 DNeasy plant mini kit(QIAGEN)抽取植物體之 DNA, 供聚合酶連鎖反應試驗用。PCR 之反應條件同上。另稱取 0.075g 之砂土分別加入 1 隻及 5 隻根瘤線蟲, 利用前人所述之方法(黃 2001), 以研鉢研磨土壤樣品並將其置入 1.5 ml 之離心管中, 加入 200 μ l 3.2%脫脂奶粉溶液, 以 12000 g 離心 10 分鐘除去沉澱之土壤, 取出上清液(第一部份 DNA)至新的離心管繼續加入 10 % SDS 溶液(終濃度 0.3 %, w/v)及等體積 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1), 混合均勻置放 2 分鐘, 並離心取上清液(第二部份 DNA)加入 400 μ l extraction buffer(0.3 % SDS, 0.14 M NaCl, 50 mM NaAc, pH 5.1)短暫離心後加入等體積 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)同上述離心後吸取上清液, 繼續加入 2.5 倍體積之酒精, 置於 -20°C, 隔日以 12000 g 離心 30 分鐘, 並以 70 %酒精潤洗沉澱物兩次, 經風乾後, 以 15 μ l 無菌水溶解沉澱物(第三部份 DNA), 將上述三部份之 DNA 做為模板進行 PCR 反應。

結 果

本研究由台灣地區最常見的根瘤線蟲著手進行研究，經利用 18S 及 28S 通用性引子對進行 PCR 反應後，發現測試之不同種根瘤線蟲之增幅產物大小均為 800 bp 左右(圖 1)，進一步選殖解序後，發現南方、爪哇及花生根瘤線蟲之核酸序列彼此間之相同度可達 99 % 以上，而此三種線蟲與水稻根瘤線蟲之核酸差異較大，其核酸序列間之相同度僅有 85 % 左右(圖 2)。

進一步利用南方根瘤線蟲之 rDNA 核酸序列，選擇已知不同屬間歧異度較大之 ITS1 及 ITS2 區間，設計出 Mi148/Mi452 引子對(圖 2)，以此引子對針對不同種之根瘤線蟲 DNA 進行 PCR 反應時，皆可以增幅獲得含部份 ITS1、5.8S 以及部份 ITS2 的 rDNA 片段(圖 3)，其產物大小經解序確定為 342 bp。另外，當以根腐線蟲、鞘線蟲、劍線蟲、冠線蟲、柑桔線蟲及腐生性線蟲等不同屬之線蟲所抽取之 DNA 進行此對引子之專一性測試時，發現此引子對對其它屬之線蟲均未能增幅出任何產物(圖 3)。

分別由溫室已感染根瘤線蟲的番茄根系及健康的番茄根部所抽取的植物總量 DNA，以 Mi148/Mi452 引子對進行 PCR 增幅反應，結果顯示僅由感染根瘤線蟲的番茄根系所抽取得到之 DNA 方可增幅獲得 342 bp 的預期產物片段，而由健株抽取的 DNA 則無任何增幅產物(圖 4)。另一方面，利用 Mi148/Mi452 引子對直接由土壤中偵測根瘤線蟲之存在，結果顯示第一個部份的 DNA 無法獲得 PCR 增幅產物，而再經過 phenol/chloroform/isoamylalcohol 純化及沉降步驟後就可以得到較明顯的 PCR 增幅產物(圖 5)。

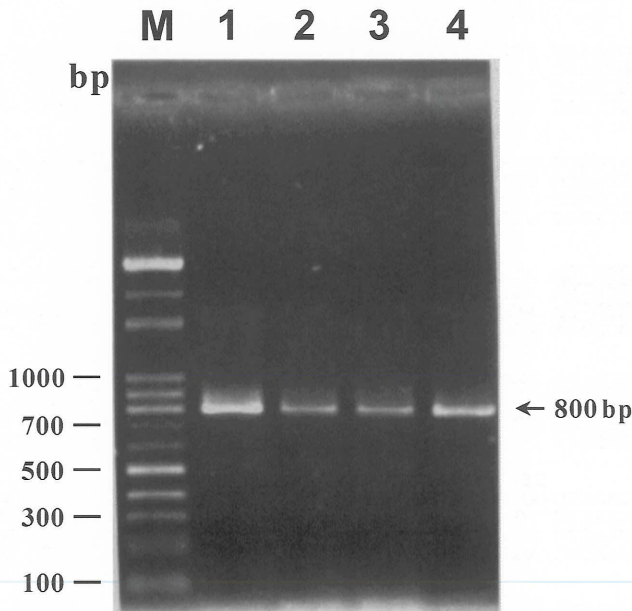


圖 1. 利用通用性引子對 28S/18S 進行不同種根瘤線蟲核糖體 DNA 之聚合酵素連鎖反應結果。

Fig. 1. PCR amplification of the ribosome DNA of *Meloidogyne* spp. by universal primer 28S/18S. Lane M: 100 bp ladder DNA Marker; Lane 1: *M. incognita*; Lane 2: *M. javanica*; Lane 3: *M. arenaria*; Lane 4: *M. graminicola*.

	1	18S				60
Ma	TGATGGAAC	CAATTTAATC	GCAGTGGCTT	GAACCGGGCA	AAAGTCGTAA	CAAAGTAGCT
Mi	TGATGGAAC	CAATTTAATC	GCAGTGGCTT	GAACCGGGCA	AAAGTCGTAA	CAAAGTAGCT
Mj	TGATGGAAC	CAATTTAATC	GCAGTGGCTT	GAACCGGGCA	AAAGTCGTAA	CAAAGTAGCT
Mg	TGATGGAAC	CAATTTAATC	GCAGTGGCTT	GAACCGGGCA	AAAGTCGTAA	CAAAGTAGCT
	61		ITS1			120
Ma	GTAGGTGAAC	CTGCTGCTGG	ATCATTACTT	TATGTG---A	TGTTCAAAT	TGAAT---TC
Mi	GTAGGTGAAC	CTGCTGCTGG	ATCATTACTT	TATGTG---A	TGTTCAAAT	TGAAT---TC
Mj	GTAGGTGAAC	CTGCTGCTGG	ATCATTACTT	TATGTG---A	TGTTCAAAT	TGAAT---TC
Mg	GTAGGTGAAC	CTGCTGCTGG	ATCATTACTT	TTTATGTAAT	GCTTTACAT	TGAATTTATC
	121		Mi148			180
Ma	GCAATGAAAT	GATCGTTGTG	AAACGGCTGT	<u>CGCTGGTGT</u>	<u>TAAGTGTTC</u>	TGATACGGTT
Mi	GCAATGAAAT	GATCGTTGTG	AAACGGCTGT	<u>CGCTGGTGT</u>	<u>TAAGTGTTC</u>	TGATACGGTT
Mj	GCAATGAAAT	GATCGTTGTG	AAACGGCTGT	<u>CGCTGGTGT</u>	<u>TAAGTGTTC</u>	TGATACGGTT
Mg	GCAATGAAAT	GATCGTTGTG	AAACGGCTGT	<u>CGCTGGTGT</u>	<u>TAAGTGTTC</u>	TGATACGGTT
	181					240
Ma	GTGAACGTC	GTGGCTGTAT	ATGTGGTGAC	ATGTTAGGAC	TCTAATGAGT	-TTAAGACCT
Mi	GTGAACGTC	GTGGCTGTAT	ATGTGGTGAC	ATGTTAGGAC	TCTAATGAGT	-TTAAGACCT
Mj	GTGAACGTC	GTGGCTGTAT	ATGTGGTGAC	ATGTTAGGAC	TCTAATGAGT	-TTAAGACCT
Mg	GTCTTCGTCC	GTGGCTGAAT	ATGAGGTGAC	ATGTTAGGAT	TCTATTGAAT	CGTAAGACCT
	241					300
Ma	AATGAGCCTC	TTAAGTGAGG	CCGCCAGCAA	CCTTTTTTTT	CTCTACA---	----TTTTAA
Mi	AATGAGCCTC	TTAAGTGAGG	CCGCCAGCAA	CCTTTTTTTT	CTCTACA---	----TTTTAA
Mj	AATGAGCCTC	TTAAGTGAGG	CCGCCAGCAA	CCTTTTTTTT	CTCTACA---	----TTTTAA
Mg	AATGAGCCTC	TTAAGTGAGG	CCGCCAGCAA	TTTTTTTTTT	TTCAATAAAT	TTTTTTTTTAA
	301	5.8S				360
Ma	AAAAAAACT	AAAATTCCTAC	CCTTATCGGT	GGATCACTAG	GCTCGTGGAT	CGATGAAGAA
Mi	AAAAAAACT	AAAATTCCTAC	CCTTATCGGT	GGATCACTAG	GCTCGTGGAT	CGATGAAGAA
Mj	AAAAAAACT	AAAATTCCTAC	CCTTATCGGT	GGATCACTAG	GCTCGTGGAT	CGATGAAGAA
Mg	AAGACATATA	TAAAAATTAA	CCTTACCCTG	GGATCACTCG	GTTTCGTGGAT	CGATGAAGAA
	361					420
Ma	CGCAGCAAAC	TGCGATAAAT	ATTGCGAACT	GCAGAAATAT	TGAGCACAAA	AGTTTTGAAC
Mi	CGCAGCAAAC	TGCGATAAAT	ATTGCGAACT	GCAGAAATAT	TGAGCACAAA	AGTTTTGAAC
Mj	CGCAGCAAAC	TGCGATAAAT	ATTGCGAACT	GCAGAAATAT	TGAGCACAAA	AGTTTTGAAC
Mg	CGCAGCTAAC	TGCGATAAAT	TATGCGAACT	GCAGAAACCT	TGAGCATAAA	AGTTTTGAAC
	421		ITS2		Mi452	480
Ma	GCAAAATGGCC	GCATTGAGGT	CAAACCTTTT	GCAACGCTCG	GTTT- <u>AGGGT</u>	<u>CATTTTCTCT</u>
Mi	GCAAAATGGCC	GCATTGAGGT	CAAACCTTTT	GCAACGCTCG	GTTT- <u>AGGGT</u>	<u>CATTTTCTCT</u>
Mj	GCAAAATGGCC	GCATTGAGGT	CAAACCTTTT	GCAACGCTCG	GTTT- <u>AGGGT</u>	<u>CATTTTCTCT</u>
Mg	GCAATATTGCG	GCATTGGGGT	CAAACCCTTT	GGCAGCTCTG	GTTCAAGGGT	CATTTTCTAA
	481					540
Ma	<u>TATAGCG-GA</u>	AGCTTTAATT	TCTATAATGA	TGTTGTTGCT	TTATATTTTA	AAAGGATTTT
Mi	<u>TATAGCG-GA</u>	AGCTTTAATT	TCTATAATGA	TGTTGTTGCT	TTATATTTTA	AAAGGATTTT
Mj	<u>TATAGCG-GA</u>	AGCTTTAATT	TCTATAATGA	TGTTGTTGCT	TTATATTTTA	AAAGGATTTT
Mg	CAAAGCGAAA	AGCTTTTATT	TTTATAATGT	CATTATTGA	CTTTATAAAA	TGAAAAATGT
	541					600
Ma	TGTTTATTCA	TGTATTAAT	CTAACTGTGA	AAATCAAACA	A-----	----TTTTG
Mi	TGTTTATTCA	TGTATTAAT	CTAACTGTGA	AAATCAAACA	A-----	----TTTTG
Mj	TGTTTATTCA	TGTATTAAT	CTAACTGTGA	AAATCAAACA	A-----	----TTTTG
Mg	TTTATTGGTT	TTTTTTACTT	GAATTAATAT	TAACCAATAA	ATATTATAAA	TTTTTTTTTG
	601	28S				660
Ma	ACCTGAACTC	AGTCGAGAGC	ACCCGCTGAA	CCTAAGCATA	TCAGTAAGCG	GAGGAAAAGA
Mi	ACCTGAACTC	AGTCGAGAGC	ACCCGCTGAA	CCTAAGCATA	TCAGTAAGCG	GAGGAAAAGA
Mj	ACCTGAACTC	AGTCGAGAGC	ACCCGCTGAA	CCTAAGCATA	TCAGTAAGCG	GAGGAAAAGA
Mg	ACCTGAACTC	AGTCGAGATC	ACCCGCTGAA	CCTAAGCATA	TCAGTAAGCG	GAGGAAAAGA
	661	675				
Ma	AACTAAATAG	GATTC				
Mi	AACTAAATAG	GATTC				
Mj	AACTAAATAG	GATTC				
Mg	AACTAAACAG	GATTC				

圖 2. 不同種根瘤線蟲核糖體內轉錄區間 DNA 序列比對結果。

Fig. 2. DNA sequence alignments of the internal transcribed spacer (ITS) region of *Meloidogyne* spp. Ma: *M. arenaria*; Mi: *M. incognita*; Mj: *M. javanica*; Mg: *M. graminicola*.

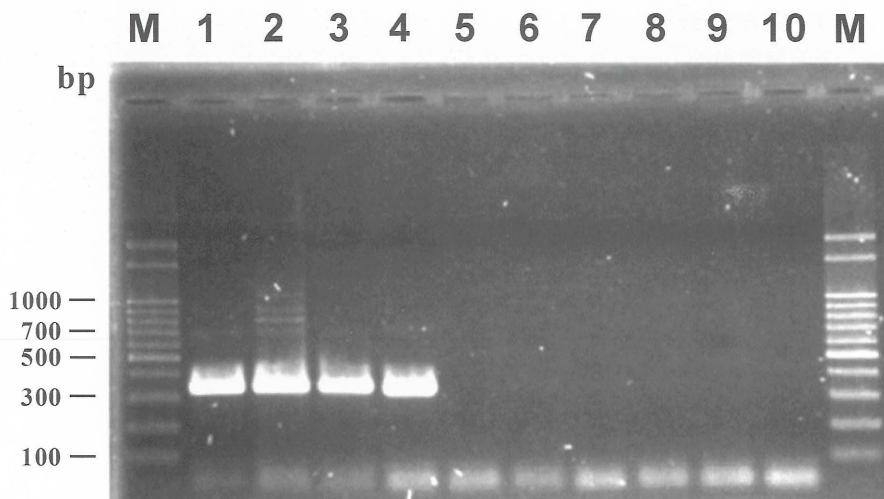


圖 3. 專一性引子對 Mi148/Mi452 對不同種類之植物病原線蟲及腐生性線蟲核糖體 DNA 之聚合酵素連鎖反應結果。

Fig.3. PCR amplification of the ribosome DNA of different plant pathogenic nematodes and free-living nematodes by the specific primers Mi148/Mi452. Lane M: 100 bp ladder DNA marker; Lane 1: *Meloidogyne incognita*; Lane 2: *M. javanica*; Lane 3: *M. arenaria*; Lane 4: *M. graminicola*; Lane 5: *Pratylenchus* sp.; Lane 6: *Pratylenchus* sp.; Lane 7: *Haploimius* sp.; Lane 8: *Tylenchus semipenetrans*; Lane 9: *Rabditis* sp.; Lane 10: *Xhiphinema diffusum*.

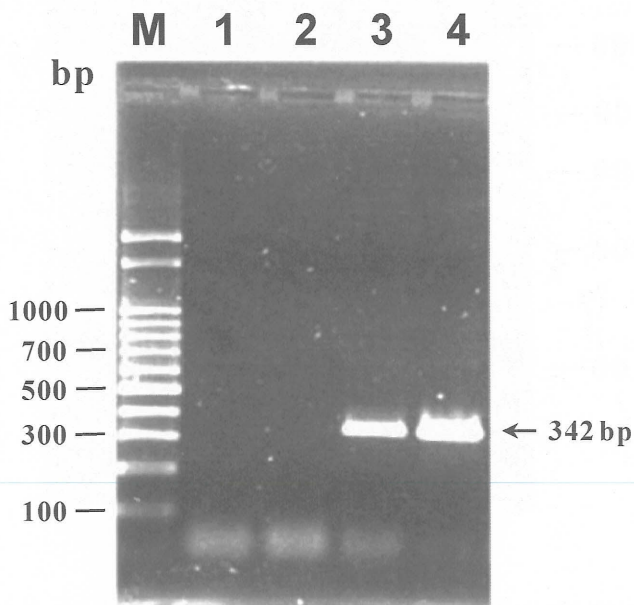


圖 4. 專一性引子對 Mi148/Mi452 對未感染及感染根瘤線蟲之番茄根部 DNA 進行聚合酵素連鎖反應結果。

Fig. 4. PCR amplification of the DNA from *Meloidogyne*-infected and non-infected tomato roots by specific primers Mi148/Mi452. Lane M: 100 bp ladder DNA Marker; Lane 1, 2: non-infected tomato; Lane 3, 4: infected tomato.

利用不同濃度之南方根瘤線蟲 DNA 為模板，進行此引子對的敏感性測試，結果發現 Mi148/Mi452 引子對具有相當高的檢測靈敏度，在僅有 10 pg 的根瘤線蟲 DNA 濃度下，仍然可以增幅獲得預期之反應產物(圖 6)。另一方面，利用 1 隻及 5 隻之南方根瘤線蟲二齡幼蟲所抽取之 DNA，以 Mi148/Mi452 引子對進行反應，結果發現由 1 隻二齡幼蟲所抽取到的總量 DNA 取其 1/25 做為 PCR 模板，結果即可順利偵測到根瘤線蟲之存在(圖 7)。另外於無菌砂土中分別加入 1 隻及 5 隻之南方根瘤線蟲二齡幼蟲，經抽取其全量 DNA，並以 Mi148/Mi452 引子對進行 PCR 增幅反應，結果顯示當土壤中含有 5 隻二齡幼蟲時所抽取到的 DNA 做為模板時可以增幅出 342 bp 的產物片段，但由僅加入 1 隻二齡幼蟲及未加線蟲之無菌土中所得到的總量 DNA 則無任何增幅產物的出現(圖 7)。

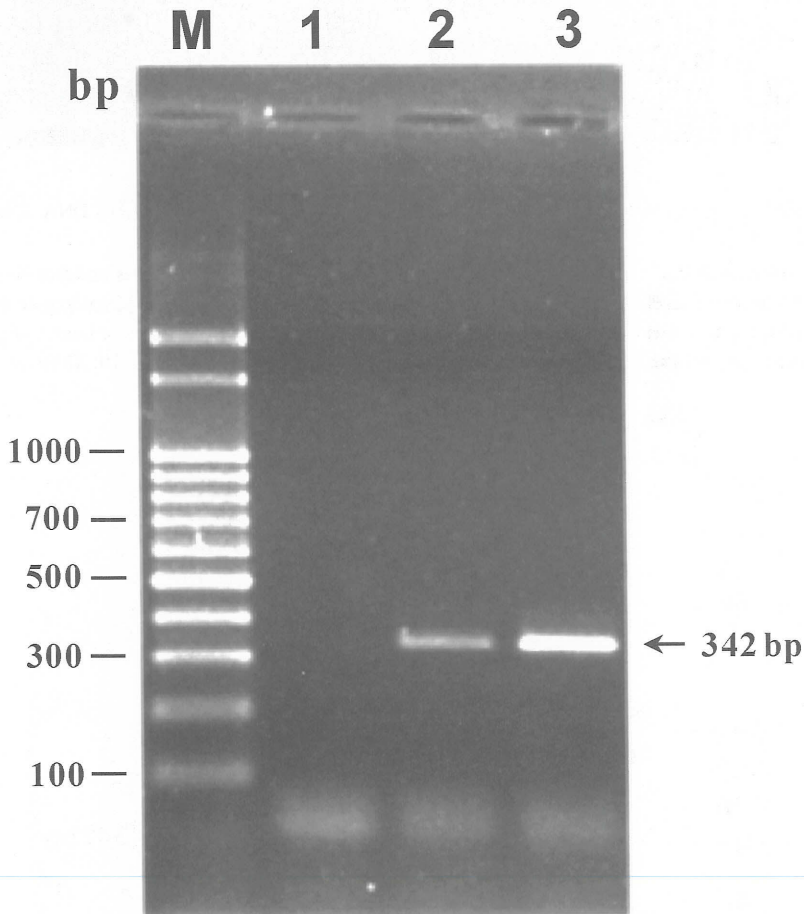


圖 5. 專一性引子對 Mi148/ Mi452 對感染番茄根瘤線蟲之土壤所抽取之 DNA 進行聚合酶連鎖反應結果。

Fig. 5. PCR amplification of the DNA from meloidogyne-infected soil by specific primers Mi148/Mi452. Lane M: 100 bp ladder DNA Marker; Lane 1: the first DNA fraction; Lane 2: the second DNA fraction; Lane 3: the third DNA fraction.

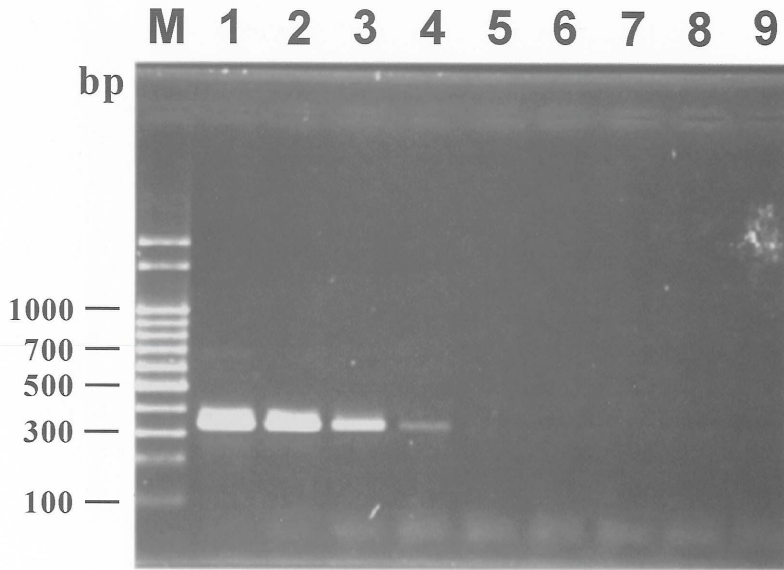


圖 6. 專一性引子對 Mi148/Mi452 對不同濃度南方根瘤線蟲 DNA 進行聚合酵素連鎖反應結果。

Fig. 6. PCR amplification of different concentration of template DNA from *Meloidogyne incognita* by specific primers Mi148/Mi452. Lane M: 100 bp DNA ladder marker; Lane 1: 10 ng; Lane 2: 1 ng; Lane 3: 100 pg; Lane 4: 10 pg; Lane 5: 1 pg; Lane 6: 100 fg; Lane 7: 10 fg; Lane 8: 1 fg; Lane 9: negative control.

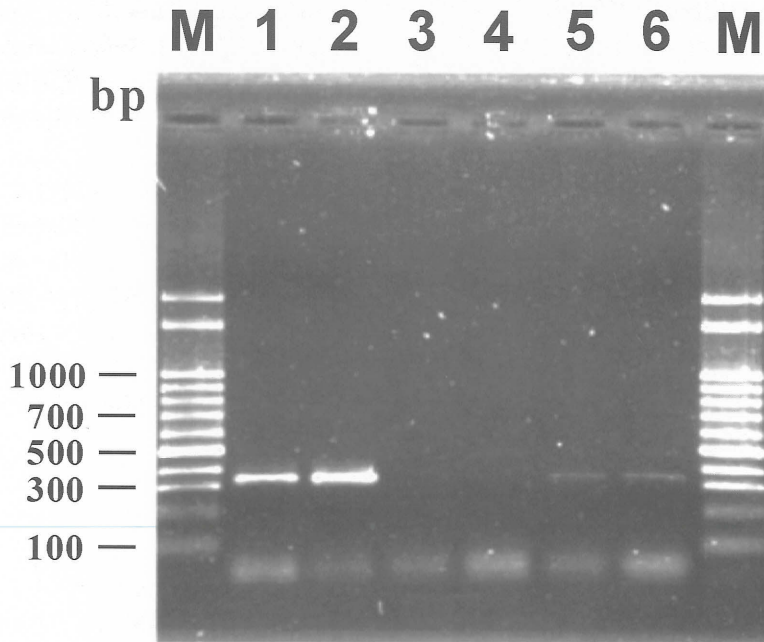


圖 7. 專一性引子對 Mi148/Mi452 對不同數量根瘤線蟲二齡幼蟲 DNA 進行聚合酵素連鎖反應結果。

Fig. 7. PCR amplification of template DNA from different numbers of second stage *Meloidogyne incognita* juvenile by specific primers Mi148/Mi452. Lane M: 100 bp ladder DNA marker; Lane 1: one purified juvenile; Lane 2: five purified juveniles; Lane 3,4: soil amended one juvenile; Lane 5,6: soil amended five juveniles.

討 論

核糖體 DNA(rDNA)序列分析已廣泛應用於真核生物種內或種間鑑別之研究工具，近年來在不同種類動物或植物病原性線蟲相關之研究也愈趨受重視(Hoste *et al.* 1993, 1995; Hoglund *et al.* 1999; Gasser 2001)。本研究發現南方、爪哇及花生根瘤線蟲之核酸序列彼此間之相同度可達 99% 以上，而此三種線蟲與水稻根瘤線蟲之核酸差異較大，其核酸序列間之相同度僅有 85% 左右(圖 2)。由此序列比對結果可知南方、爪哇及花生等根瘤線蟲之親緣關係較為相近，而與水稻根瘤線蟲間之親緣關係則較遠。此外，將本研究所得之南方、爪哇以及花生根瘤線蟲之序列與國外已登錄於 Genebank 中之根瘤線蟲序列比對之後，發現本省根瘤線蟲之 rDNA 序列與國外所發表之序列極為相似，以南方根瘤線蟲為例，其 rDNA 序列與 Genebank 中登記號為 U96304 之 *Meloidogyne incognita* 之 rDNA 序列相同度達 99.5% (結果未示出)。在過去國外的相關研究亦顯示，南方、爪哇及花生根瘤線蟲之 rDNA 序列極為相似(Powers *et al.* 1997)，顯示國內之根瘤線蟲與國外之根瘤線蟲具有相當接近的親緣關係。

爲了進一步利用此 rDNA 片段進行常見南方、爪哇及花生等根瘤線蟲的檢測工作，本研究依據南方根瘤線蟲之 rDNA 核酸序列，選擇已知不同屬間歧異度較大之 ITS1 及 ITS2 區間，設計了 Mi148/Mi452 引子對(圖 2)，另外，當以根腐線蟲、鞘線蟲、劍線蟲、冠線蟲、柑桔線蟲及腐生性線蟲等不同屬之線蟲所抽取之 DNA 進行此對引子之專一性測試時，發現此引子對對其它屬之線蟲均未能增幅出任何產物(圖 3)，並可由感染根瘤線蟲的番茄根系中所抽取得到之 DNA 獲得預期增幅產物(圖 4)，顯示 Mi148/Mi452 引子對在檢測作物根瘤線蟲上具有相當好的專一性，並不會受到植物體或土壤其它線蟲之影響。此外，由溫室含根瘤線蟲之病土中抽取土壤中 DNA 分爲三個部份，第一個部份的 DNA 無法獲得 PCR 增幅產物，而再經過 phenol/chloroform/isoamylalcohol 純化及沉降步驟後就可以得到較明顯的 PCR 增幅產物(圖 5)，顯示土壤粗萃取液中可能具有某些干擾 PCR 反應之物質，必須加以純化清除，以免造成檢測時之干擾。綜合本研究結果顯示，Mi148/Mi452 引子對在實際檢測上，可檢測出土壤中少量線蟲的存在與否，預期將可大幅改善傳統利用分離鏡檢方式無法檢測少量線蟲存在的缺點。

在本研究中發現，南方、爪哇以及花生等根瘤線蟲彼此間之 rDNA 序列相同度相當高，因此利用此段 DNA 序列設計之引子對並無法將三者加以鑑別，故僅爲屬專一性引子對。由於在田間作物根瘤線蟲病害常見南方及爪哇根瘤線蟲複合感染之情形，爲進一步鑑別不同種之根瘤線蟲，未來必須另行設計測試種專一性引子對。由於在 rDNA 基因間尚有 intergenic spacer(IGS)區域亦爲非轉錄區(18S 與 28S 之間)，亦常被用在種間或種內之鑑別工具(Petersen & Vrain 1996; Petersen *et al.* 1997)，未來應可進一步由 IGS 序列著手進行南方、爪哇及花生根瘤線蟲的鑑別工作，配合本研究設計所得的專一性偵測用引子對，應可同時快速偵測及鑑別不同種之根瘤線蟲，預期本研究結果將可做爲植物防檢疫線蟲快速檢測之研究模式基礎。

誌 謝

本研究經費承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 (89 科技-6.2-04(3), 90 農科-6.2.2-檢-B1) 補助經費，並感謝國立中興大學植物病理學系植物線蟲研究室吳信郁先生、黃惠茂先生所給予之協助，謹此致謝。

引用文獻

- 王國強、楊瓊儒、蔡安娜。1977。台灣 *Meloidogyne hapla* 根瘤線蟲之初次發現。植物保護學會會刊 20:386。
- 黃良玉。2001。應用 rDNA 內轉錄區間(ITS)序列特性探討萎凋病菌之親緣關係及利用聚合酵素連鎖反應技術檢測番茄萎凋病菌。國立中興大學植物病理學系碩士論文。98 pp。
- 程永雄、杜金池。1980。台灣落花生根瘤線蟲 *Meloidogyne arenaria* 之鑑定。中華農業研究 29:47-53。
- 蔡東纂。1995。植物病原線蟲檢疫。植物病理學會會刊 4:43-59。
- 蔡東纂。1997。可能入侵台灣之植物病原線蟲及其防止對策。植物保護學會會刊 39:33-61。
- Baum, T. J., P. M. Gresshoff, S. A. Lewis and R. A. Dean. 1994. Characterization and phylogenetic analysis of four root-knot nematode species using DNA amplification fingerprinting and automated polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol. Plant Microb. Int.* 7:39-47.
- Blaxter, M. L. 2001. Molecular analysis of nematode evolution. p.1-24. *in: Parasitic Nematodes-Molecular Biology, Biochemistry and Immunology.* (Kennedy, M. W. and W. Harnett, eds) CABI publishing.
- Blok, V. C., M. S. Philips, J. W. McNicol and M. Fargette. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* species as shown by RAPDs. *Fund. Appl. Nematol.* 20:127-133.
- Campbell, A. J. D., R. B. Gasser and N. B. Chilton. 1995. Differences in a ribosomal sequence of *Strongylus* species allows identification of a single eggs. *Inter. J. Parasitol.* 25:359-365.
- Carpenter, A. S., E. E. Hiatt, S. A. Lewis and A. G. Abbott. 1992. Genomic RFLP analysis of *Meloidogyne arnearia* race 2 populations. *J. Nematol.* 24:23-28.
- Castagnone-Sereno, P., F. Vanderberghe-Masutti and F. Leroy. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome* 37:904-909.
- Cenis, J. L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology* 83:76-78.
- Eisenback, J. D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) p.95-112. *in: An Advanced Treatise on Meloidogyne.* Vol. I. Biology and Control. (Sasser, J. N. and C. C. Carter, eds.) North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, U.S.A.
- Eisenback, J. D., H. Hirschmann, J. N. Sasser and A. C. Triantaphyllou. 1981. A Guide to the Four Most Common Species of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species) with a Pictorial Key. North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, U.S.A. 48 pp. °
- Fargette, M., V. C. Block, M. S. Philips and D. L. Trudgill. 1994. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* species. p. 91-96. *in: Advances in Molecular Plant Nematology.* (Lamberti, F., C. De Giorgi and D. M. Bird, eds.) Plenum Press, New York, U.S.A.
- Gasser, R. B. 2001. Identification of parasitic nematodes and study of genetic variability using PCR approaches. p.53-82. *in: Parasitic Nematodes-Molecular Biology, Biochemistry and Immunology.* (Kennedy, M. W. and W. Harnett, eds.) CABI publishing.
- Harmann, K. M. and J. N. Saesser. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of different host test and perineal pattern morphology. p. 69-77. *in: An Advanced Treatise on Meloidogyne.* Vol. II. Methodology. (Baker, K. R., C. C. Carter and J. N. Sasser, eds.) North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, U.S.A.

- Harris, T. S., L. J. Sandal and T. O. Powers. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. *J. Nematol.* 22:518-524.
- Hoglund, J., E. Wilhelmsson, D. Christensson, T. Morner, P. Waller and J. G. Mattsson. 1999. ITS2 sequences of *Dictyocaulus* species from cattle, roe deer and moose in Sweden: molecular evidence for a new species. *Inter. J. Parasitol.* 29:607-611.
- Hoste, H., R. B. Gasser, N. B. Chilton, S. Mallet and I. Beveridge. 1993. Lack of intraspecific variation in the second internal transcribed spacer (ITS-2) of *Trichostrongylus colubriformis* ribosomal DNA. *Inter. J. Parasitol.* 23:1069-1071.
- Hoste, H., N. B. Chilton, R. B. Gasser and I. Beveridge. 1995. Differences in the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: *Trichostrongylidae*). *Inter. J. Parasitol.* 25:75-80.
- Hoste, H., N. B. Chilton, I. Beveridge and R. B. Gasser. 1998. Differences in the first internal transcribed spacer of ribosomal DNA among five species of *Trichostrongylus*. *Inter. J. Parasitol.* 28:1251-1260.
- Petersen, D. J. and T. C. Vrain. 1996. Rapid identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. hapla* and *M. fallax* using PCR primers to amplify their ribosomal intergenic spacer. *Fund. Appl. Nematol.* 19:601-605.
- Petersen, D. J., C. Zijlstra, J. Wishart, V. Blok and T. C. Vrain. 1997. Specific probes efficiently distinguish root-knot nematode species signature sequences in the ribosomal intergenic spacer. *Fund. Appl. Nematol.* 20:619-626.
- Powers, T. O. and T. S. Harris. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 25:1-6.
- Powers, T. O., E. G. Platzer and B. C. Hyman. 1986. Species-specific restriction site polymorphism in root-knot nematode mitochondrial DNA. *J. Nematol.* 18:288-293.
- Powers, T. O., T. C. Todd, A. M. Burnell, C. B. Murray, C. C. Fleming, A. L. Szalanski, B. A. Adams and T. S. Harris. 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *J. Nematol.* 29:441-450.
- Van der Beek, J. G., R. Folkertsma, C. Zijlstra, P. H. G. VanKoert, L. M. Poleij and J. Baker. 1998. Genetic variation among pathogenetic *Meloidogyne* species revealed by AFLPs and 2D-protein electrophoresis contrasted to morphology. *Fund. Appl. Nematol.* 21:401-411.
- Vrain, T. C., D. A. Wakarchuk, A. C. Levesque and R. I. Hamilton. 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fund. Appl. Nematol.* 15:563-573.
- Williamson, V. M., E. P. Cashwell-Chen, B. B. Westerdahl, F. F. Wu and G. Caryl. 1997. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *J. Nematol.* 29:9-15.
- Zijlstra, C. 1997. A fast PCR assay to identify *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi* and *M. fallax*, and to sensitivity differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. *Fund. Appl. Nematol.* 20:505-511.
- Zijlstra, C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:283-290.

- Zijlstra, C., A. E. M. Lever, B. J. Uenk and C. H. Van Silfhout. 1995. Differences between ITS regions of isolates of the root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology* 85: 1231-1237.
- Zijlstra, C., B. J. Uenk and C. H. Van Silfhout. 1997. A reliable, precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. *Fund. Appl. Nematol.* 20:59-63.

PCR-mediated Detection of *Meloidogyne* spp. Based on Ribosomal Internal Transcribed Spacer Sequences¹

Hui-Fang Ni², Ruey-Shyang Chen³, Mei-Hwa Wang²,
Tung-Tsuan Tsay⁴ and Yung-Hsiung Cheng^{2,5}

Summary

Ni, H. F., R. S. Chen, M. H. Wang, T. T. Tsay and Y. H. Cheng. 2003. PCR-mediated detection of *Meloidogyne* spp. based on ribosomal internal transcribed spacer sequences. J. Agric. Res. China 52:1-13.

The main objective of the study is to design a pair of specific primers for the detection of *Meloidogyne* spp. by PCR. The internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA from the representative isolates of *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, and *M. graminicola* were amplified by universal primers. The entire ITS region, including 5.8S subunit, was cloned and sequenced. The aligned results of obtained sequences showed that a high level of sequence identity was found among *M. incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*. Two PCR primers, Mi148 and Mi452, were designed based on rDNA sequence of *M. incognita*. The primer pair was subsequently shown to amplify a 342 bp fragment from the DNA of *Meloidogyne* spp. On the contrary, this primer pair failed to amplify any fragments from the DNA from other tested nematodes. Using this primer pair, *Meloidogyne* spp. could be successfully detected from diseased plants and soil. The detection limit of the primer pair was as few as 10 pg template DNA, or 5 juveniles in soil.

Key words: *Meloidogyne* spp., Plant pathogenic nematodes, PCR-mediated detection, Ribosomal DNA (rDNA), Internal transcribed spacer (ITS).

1. Contribution No.2140 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted : November 30, 2002.

2. Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experimental Station, TARI, Chiayi, Taiwan, ROC.

3. Graduate Institute of Biotechnology, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

4. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

5. Corresponding author, e-mail : cyh@dns.caes.gov.tw ; Fax : (05)2773630.