

# 土壤植物寄生性線蟲分離方法之優劣比較

顏志恆<sup>1</sup> 李明達<sup>2</sup> 陳殿義<sup>1</sup> 林俊義<sup>1</sup> 蔡東纂<sup>2</sup>

1. 台中縣霧峰鄉 台灣省農業試驗所
2. 台中市 國立中興大學植物病理學研究所

(接受日期: 民國 87 年 4 月 13 日)

## 摘 要

顏志恆、李明達、陳殿義、林俊義、蔡東纂 1998 土壤植物寄生性線蟲分離方法之優劣比較 植保會刊 40: 153 - 162.

比較不同土壤植物寄生性線蟲分離方法—改良式柏門氏漏斗分離法(modified Baermann funnel method)、離心懸浮法(centrifugal-flotation method)、及懸浮網篩技術(flotation-sieving technique), 針對不同的土壤質地(砂質土及砂質壤土)、不同種類與不同體形大小的供試線蟲(南方根瘤線蟲二齡幼蟲、南方根腐線蟲、葉芽線蟲、及腐生線蟲)、及線蟲的活性(活線蟲及死線蟲)作比較, 以回收率(recovery rate)及所需時間(time)作為測試項目。其試驗結果顯示, 在回收率及所需時間方面, 離心懸浮法及懸浮網篩技術優於改良式柏門氏漏斗分離法。因此推薦使用懸浮離心法及懸浮網篩技術, 作為土壤植物寄生性線蟲的分離方法。

(關鍵詞: 改良式柏門氏漏斗分離法、離心懸浮法、懸浮網篩技術、回收率)

## 緒 言

在臺灣從事植物線蟲學的研究最常使用的土壤植物寄生性線蟲分離方法為改良式柏門氏漏斗分離法(modified Baermann funnel method, BF), 其著眼點即為操作步驟簡便容易、及所需器材不多且不佔空間<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9</sup>。而除了改良式柏門氏漏斗分離法外, 分離土壤植物寄生性線蟲常用的分

離方法還有離心懸浮法(centrifugal-flotation method, CF)、懸浮網篩技術(flotation-sieving technique, FS)和柏門氏漏斗分離法混用、及半自動線蟲分離機(semi-automatic elutriator)和離心懸浮法混用等等<sup>10, 11, 16, 17</sup>。各種不同的土壤線蟲分離方法依其分離的目的、不同的土壤環境及欲分離線蟲之體形大小, 各有其優點及缺點。改良式柏門氏漏斗分離法的缺點為回收率(recovery

rate) 不高，大都在50%以下、分離等待時間過長 (over night)、而且無法分離到行動遲緩或已死亡的線蟲及卵<sup>(13, 19, 21)</sup>。而懸浮離心法則有操作簡單快速、土壤線蟲可分離後迅速觀察、亦可分離到行動遲緩的線蟲如 *Criconebella* spp. 或 *Hemicriconebellodes* spp. 及外寄生性線蟲卵的優點，但其缺點為分離所用之介質—蔗糖溶液容易影響欲分離線蟲的活性<sup>(10, 20)</sup>。因此如何選擇一適合的土壤線蟲分離方法，為一相當重要的課題。

由於主觀及客觀條件的限制，在臺灣土壤植物寄生性線蟲分離方法仍以改良式柏門氏漏斗分離法為主，但由於分離不同種類或不同寄生習性之植物寄生性線蟲，所適用的線蟲分離方法並不盡然相同，且不同的土壤質地及種類亦會影響線蟲回收率的多寡，因此針對臺灣不同的植物寄生性線蟲相及不同的土壤環境，一套完善且操作簡便迅速的土壤線蟲分離方法是必須且迫切需要的。本實驗的目的即是試圖比較不同土壤植物寄生性線蟲分離方法的優劣，並找出適合臺灣不同植物寄生性線蟲相及不同土壤環境的分離方法。

## 材料與方法

### 供試之植物寄生性線蟲蟲源

本實驗所使用之植物寄生性線蟲蟲源，係由國立中興大學植物病理學系植物線蟲實驗室所提供，以該實驗室能夠大量培養的線蟲蟲源為主。南方根瘤線蟲之培養 (*Meloidogyne incognita*) 乃於溫室中先行種植空心菜 (*Ipomoea reptans* Poir., 尖甕品種) 植株於泥炭土與珍珠石等量之盆鉢，再將上述線蟲的卵塊接種至種植盆鉢中之空心菜根部，約一個半月後，一個世代完成新的卵塊產生後，作為實驗之蟲源。南方根腐線蟲 (*Pratylenchus coffeae*) 先以混合消

毒液消毒三次，每次15分鐘。混合消毒液之組成份包括 1000 ppm streptomycin sulfate、1000 ppm chloromycin、及 1000 ppm penicillin-G。再以無菌水漂洗三次後，於胡蘿蔔癒合組織 (carrot callus) 中作無菌培養一個月後備用。葉芽線蟲 (*Aphelenchoides besseyi*) 則以自罹葉芽線蟲病之草莓植株上分離出的 *Alternaria citri*，移單胞於馬鈴薯洋菜斜面培養基 (PDA slant) 上繁殖一個月，待菌絲長滿斜面後，以消毒過之吸管吸取消毒過之線蟲懸浮液注入斜面中，於 28°C 的恆溫箱中培養一個月後備用。腐生線蟲 (*Rhabditis* spp.) 則於長滿細菌的馬鈴薯洋菜斜面培養基 (PDA slant) 上繁殖一個月後備用。

### 供試蟲源的製備

本實驗所使用之南方根瘤線蟲供試蟲源於實驗前，收集由空心菜根部組織分離出之南方根瘤線蟲卵塊，置於無菌水中浸泡 24 小時後，以消毒過的玻璃吸管吸取孵化出來的二齡幼蟲，收集於 100 mL 的小燒杯中，計算蟲量備用。南方根腐線蟲供試蟲源則以無菌水沖洗培養於胡蘿蔔癒合組織中之根腐線蟲，並收集於 100 毫升的小燒杯中，計算蟲量以備試驗所需。葉芽線蟲供試蟲源於實驗前，以無菌水沖洗培養於 *Alternaria citri* 中之葉芽線蟲，並收集於 100 mL 的小燒杯中，計算蟲量備用。而腐生線蟲供試蟲源則以無菌水沖洗培養於細菌中之腐生線蟲，並收集於 100 mL 的小燒杯中，計算蟲量備用。

### 供試土壤

本實驗所用之土壤有兩種—砂質土 (sandy soil) 及砂質壤土 (sandy loam soil)，經土壤分析為砂質土之質地為砂粒 (sand) 佔 93.4%，粘粒 (clay) 佔 2.2%，粉粒 (silt) 佔 4.4%，砂質壤土之質地為砂粒佔 67.4%，粘粒佔 25.2%，粉粒佔 7.4%。供試土壤經蒸

汽滅菌消毒 (121°C, 15lb., 20 min) 後備用。

### 實驗前處理

本處理的目的即是比較不同土壤植物寄生性線蟲分離方法的優劣，並找出適合臺灣不同植物寄生性線蟲相及不同土壤環境的分離方法。考慮的因子包括不同的土壤質地 (砂質土及砂質壤土)、不同種類不同體形大小的供試線蟲 (南方根瘤線蟲二齡幼蟲、南方根腐線蟲、葉芽線蟲、及腐生性線蟲)、線蟲的活性 (活線蟲及死線蟲) 以及不同分離方法 (改良式柏門氏漏斗分離法、離心懸浮法、及懸浮網篩技術) 的優劣比較。因此首先需模擬土壤線蟲所棲息的土壤環境，以做為分離方法的參考。實驗前處理則是以定量500隻活線蟲及以高壓滅菌處理過的500隻死線蟲的線蟲懸浮液各15 mL注入分別裝有100 g之砂質土或砂質壤土的塑膠袋中，以手搖拌塑膠袋使土壤攪拌均勻後置於室溫下3個小時後備用，以測試不同線蟲分離方法分離土壤中活線蟲及已死亡線蟲的能力，及比較由不同土壤質地的土壤中分離線蟲的差異，並測試不同土壤線蟲分離方法—改良式柏門氏漏斗分離法、離心懸浮法、及懸浮網篩技術之優劣比較。

### 改良式柏門氏漏斗分離法

改良式柏門氏漏斗分離法主要適用於由少量的土壤樣本中分離出體形小且活動力強之線蟲<sup>(10, 11, 13, 15, 16)</sup>。本試驗測試之線蟲 (500隻活線蟲或500隻死線蟲) 包括南方根瘤線蟲二齡幼蟲、南方根腐線蟲、葉芽線蟲、及腐生性線蟲。以不同質地之土壤100 g (砂質土或砂質壤土) 為單位，混合攪拌均勻後，置於鋪有兩張舒潔面紙的60孔目的網篩上，再將網篩以45度角度緩慢地置放於直徑7 cm的小漏斗中，以避免網篩底部氣泡的產生。然後下接一以夾子封口的橡

皮管，加蒸餾水至水稍蓋滿供試土壤為止。靜置24小時後，收集下方指形管中的線蟲懸浮液，倒入培養皿中待檢 (設定24小時為先置實驗的結果)。每個處理5重複。

### 離心懸浮法

測試之線蟲 (500隻活線蟲或500隻死線蟲) 包括南方根瘤線蟲二齡幼蟲、南方根腐線蟲、葉芽線蟲、及腐生性線蟲。離心懸浮法特別適用於由田間土壤中分離根瘤線蟲的二齡幼蟲及 *Criconebella* 屬線蟲<sup>(10, 12, 13, 14, 15, 20)</sup>。此方法所使用之蔗糖溶液是以484.5 g的家庭用蔗糖溶解於1000 mL的蒸餾水中，使成一比重 (specific gravity, spgr) 大約為1.2的蔗糖溶液備用。分別充分混合經過前處理並添加有不同供試線蟲的兩種土壤後，取出25 g土壤置於1000 mL之大燒杯中，然後倒入250 mL的蒸餾水，以攪拌棒快速攪拌30秒後，靜置一分鐘，將土壤懸浮液傾倒於上層為250孔目，下層為500孔目的雙層網篩中，以裝有蒸餾水的塑膠洗滌瓶將殘留於500孔目的網篩中之殘留物洗入50 mL的離心管中，低速離心 (1500 rpm) 3分鐘後，去除上層液，加入飽和蔗糖溶液至九分滿，以攪拌棒快速攪拌10秒後，再離心 (1000 rpm) 一分鐘，取其上層糖液，傾倒於上層為250孔目，下層為500孔目的雙層網篩中，再以裝有蒸餾水的塑膠洗滌瓶將殘留於500孔目的網篩中之線蟲洗入培養皿中鏡檢<sup>(10, 20)</sup>。每個處理5重複。

### 懸浮網篩技術

懸浮網篩技術主要適用於由土壤中分離體積較大的土壤線蟲，如劍線蟲 (*Xiphinema* spp.) 等<sup>(10, 18, 21)</sup>。以手分別充分攪拌混合經過前處理並添加有不同供試線蟲的兩種土壤後，取出25 g土壤置於1000 mL之大燒杯中，然後倒入250 mL比重為1.2的蔗糖溶液，以攪拌棒快速攪拌10秒後，靜置1分鐘，將土壤懸浮液傾倒於最上層為

250孔目，下層為500孔目的兩層網篩中，以裝有蒸餾水的塑膠洗滌瓶將殘留於500孔目的網篩中之線蟲洗入培養皿中鏡檢<sup>(10, 20)</sup>。測試之線蟲 (500隻活線蟲或500隻死線蟲) 包括南方根瘤線蟲二齡幼蟲、南方根腐線蟲、葉芽線蟲、及腐生性線蟲。每個處理5重複。

## 結 果

### 不同線蟲分離方法分離南方根腐線蟲的優劣比較

以不同土壤植物寄生性線蟲分離方法分離線蟲的優劣比較，主要是依據供試線蟲的形狀大小 (size)、活動性 (motility) 及不同介質土壤質地的選擇，這些條件對不同植物寄生性線蟲分離方法所得之反應。

所評估的標準包括回收率—能由土壤中回收線蟲的比率、效率 (efficiency) —在田間大量使用的可能性、及時間 (time) —操作是否快速簡單。其中時間可區分為操作時間 (operational time) 及等待時間 (waiting time)，操作時間即為前處理包括調配蔗糖溶液、準備離心管及網篩、以及操作低速離心機所需的時間，而等待時間為前處理完畢後等待線蟲樣品觀察的時間，兩者所需時間的總和為總時間 (total time)。以南方根腐線蟲為例試驗結果顯示，在砂質土中，不管分離活的或死的線蟲，皆以懸浮網篩技術之回收率最高 (29.4%、38%)，離心懸浮法次之 (12%、22%)，改良式柏門氏漏斗分離法最差 (4%、1%)。而在砂質壤土中，不管分離活的或死的線蟲，皆以離心懸浮法之回收率最高 (52%、46%)，懸浮網篩技術次之 (32%、26%)，改良式柏門氏漏

表一、不同線蟲分離方法由不同土壤介質分離南方根腐線蟲回收率及所需時間之比較

Table 1. The results of nematode-extraction recovery rate and required time on *Pratylenchus coffeae* extracted by different nematode extraction methods

Nematode Extraction method	Sandy soil		Sandy loam soil	
	Recovery rate (%)	Total time	Recovery rate (%)	Total time
<i>Pratylenchus coffeae</i> (alive)				
Baermann funnels (BF)	4.0 e <sup>1)</sup>	24 hr	15.0 c	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	12.0 d	179.2 min	52.0 a	179.2 min
Flotation sieving (FS)	29.4 b	64 min	32.0 b	64 min
<i>Pratylenchus coffeae</i> (dead)				
Baermann funnels (BF)	1.0 e	24 hr	3.0 d	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	22.0 c	179.2 min	46.0 a	179.2 min
Flotation sieving (FS)	38.0 a	64 min	26.0 b	64 min
No nematode (check)				
Baermann funnels (BF)	0	24 hr	0	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	0	128 min	0	128 min
Flotation sieving (FS)	0	64 min	0	64 min

<sup>1)</sup> Means (n=5) in the same column followed by the same letter are not significantly different ( $p=0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

斗分離法最差 (15%、3%)。在所費時間方面，以操作懸浮網篩技術所耗時間最少(操作時間64分鐘、等待時間0分鐘、總時間為64分鐘)，蔗糖懸浮離心法次之(操作時間179.2分鐘、等待時間0分鐘、總時間為179.2分鐘)，改良式柏門氏漏斗分離法所須時間最長(操作時間60分鐘、等待時間23小時、總時間為24小時)。不放線蟲之對照組，三種方法之回收率皆為0(表一)。

#### 不同線蟲分離方法分離南方根瘤線蟲二齡幼蟲的優劣比較

以不同土壤植物寄生性線蟲分離方法分離南方根瘤線蟲二齡幼蟲的結果，以懸浮網篩技術所耗時間最少(操作時間64分鐘、等待時間0分鐘、總時間為64分鐘)，離心懸浮法次之(操作時間128分鐘、等待時間0分鐘、總時間為128分鐘)，改良式柏門氏漏斗分離法所須時間最長(操作時間60分

鐘、等待時間23小時、總時間為24小時)。回收率方面，在砂質土壤中分離活的線蟲所得的結果，以懸浮網篩技術之回收率最高(24.8%)，離心懸浮法次之(12%)，改良式柏門氏漏斗分離法最差(3.8%)。在砂質壤土中則以離心懸浮法之回收率最高(32.2%)，懸浮網篩技術次之(25.1%)，改良式柏門氏漏斗分離法最差(3.8%)。在砂質土及砂質壤土中分離死的線蟲所得的結果皆以離心懸浮法之回收率最高(29.8%、25.4%)，懸浮網篩技術次之(22.6%、15.4%)，改良式柏門氏漏斗分離法最差(0.1%、0.2%)(表二)。

#### 不同線蟲分離方法分離腐生性線蟲的優劣比較

以不同土壤植物寄生性線蟲分離方法分離腐生性線蟲，以懸浮網篩技術所耗時間最少(操作時間64分鐘、等待時間0分

表二、不同線蟲分離方法由不同土壤介質分離南方根瘤線蟲二齡幼蟲回收率及所需時間比較

Table 2. The results of nematode-extraction recovery rate and required time on *Meloidogyne incognita* J2 extracted by different nematode extraction methods

Nematode	Sandy soil		Sandy loam soil	
	Recovery rate (%)	Total time	Recovery rate (%)	Total time
<i>Meloidogyne incognita</i> (alive)				
Baermann funnels (BF)	3.8 d <sup>1)</sup>	24 hr	3.8 c	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	12.0 c	128 min	32.2 a	128 min
Flotation sieving (FS)	24.8 ab	64 min	25.1 ab	64 min
<i>Meloidogyne incognita</i> (dead)				
Baermann funnels (BF)	0.1 d	24 hr	0.2 c	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	29.8 a	128 min	25.4 ab	128 min
Flotation sieving (FS)	22.6 b	64 min	15.4 b	64 min
No nematode (check)				
Baermann funnels (BF)	0	24 hr	0	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	0	128 min	0	128 min
Flotation sieving (FS)	0	64 min	0	64 min

<sup>1)</sup> Means (n=5) in the same column followed by the same letter are not significantly different (p=0.05) according to Duncan's multiple range test.

鐘、總時間為64分鐘)，離心懸浮法次之(操作時間128分鐘、等待時間0分鐘、總時間為128分鐘)，改良式柏門氏漏斗分離法所須時間最長(操作時間60分鐘、等待時間23小時、總時間為24小時)。回收率方面，在砂質土中分離活的線蟲所得的結果，以懸浮網篩技術之回收率最高(15%)，離心懸浮法次之(12%)，改良式柏門氏漏斗分離法最差(5%)。在砂質壤土中分離活的線蟲所得的結果，三個分離方法之間並無差異。而在砂質土及砂質壤土中分離死的線蟲所得的結果皆以離心懸浮法之回收率最高(12%、20%)，懸浮網篩技術次之(10%、16%)，改良式柏門氏漏斗分離法仍為最差(0%、1%)(表三)。

#### 不同線蟲分離方法分離葉芽線蟲的優劣比較

以不同土壤植物寄生性線蟲分離方法分離葉芽線蟲，以懸浮網篩技術所耗時間

最少(操作時間64分鐘、等待時間0分鐘、總時間為64分鐘)，離心懸浮法次之(操作時間147.2分鐘、等待時間0分鐘、總時間為147.2分鐘)，改良式柏門氏漏斗分離法所須時間最長(操作時間60分鐘、等待時間23小時、總時間為24小時)。在砂質土中分離活的線蟲所得的結果，以離心懸浮法之回收率最高(25.9%)，改良式柏門氏漏斗分離法次之(20%)，懸浮網篩技術最差(12.6%)。在砂質壤土中分離活的線蟲所得的結果，則以離心懸浮法之回收率最高(24.8%)，其它兩種分離方法之間並無差異。而在砂質土中分離死的線蟲所得的結果，則以離心懸浮法之回收率最高(15.8%)，懸浮網篩技術次之(11.7%)，改良式柏門氏漏斗分離法(BF)最差(0%)。在砂質壤土中分離死的線蟲所得的結果，則以懸浮網篩技術之回收率最高(10.4%)，離心懸浮法次之(9.1%)，改良式柏門氏漏斗分離法的結果最差(0%)(表四)。

表三、不同線蟲分離方法由不同土壤介質分離腐生性線蟲回收率及所需時間之比較

Table 3. The results of nematode-extraction recovery rate and required time on free-living nematode extracted by different nematode extraction methods

Nematode Extraction method	Sandy soil		Sandy loam soil	
	Recovery rate (%)	Total time	Recovery rate (%)	Total time
Free-living nematode (alive)				
Baermann funnels (BF)	5.0 b <sup>1)</sup>	24 hr	12.0 b	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	12.0 a	128 min	9.4 b	128 min
Flotation sieving (FS)	15.0 a	64 min	13.0 b	64 min
Free-living nematode (dead)				
Baermann funnels (BF)	0 c	24 hr	1.0 c	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	12.0 a	128 min	20.0 a	128 min
Flotation sieving (FS)	10.0 ab	64 min	16.0 b	64 min
No nematode (check)				
Baermann funnels (BF)	0	24 hr	0	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	0	128 min	0	128 min
Flotation sieving (FS)	0	64 min	0	64 min

<sup>1)</sup> Means (n=5) in the same column followed by the same letter are not significantly different (p=0.05) according to Duncan's multiple range test.

## 討 論

綜觀本試驗所考量的因子，包括不同的土壤質地（砂質土及砂質壤土）、不同種類不同體形大小的供試線蟲（南方根瘤線蟲二齡幼蟲、南方根腐線蟲、葉芽線蟲、及腐生性線蟲）、線蟲的活性（活線蟲及死線蟲）以及不同的分離方法（改良式柏門氏漏斗分離法、離心懸浮法、及懸浮網篩技術）。由試驗結果可得知，三種土壤植物寄生性線蟲分離方法的比較，以離心懸浮法及懸浮網篩技術兩種分離方法，其回收率遠較改良式柏門氏漏斗分離法為高。此外離心懸浮法及懸浮網篩技術分離線蟲所需之總時間（3小時以內）亦較改良式柏門氏漏斗分離法（24小時）為短。因此綜觀本試驗結果，分離土壤線蟲可以懸浮離心法及懸浮網篩技術為主，改良式柏門氏漏斗分離法為輔。

雖然分離土壤線蟲可以懸浮離心法及懸浮網篩技術為主，改良式柏門氏漏斗分離法為輔。但是在所需時間方面，由於以離心懸浮法及懸浮網篩技術兩種分離方法分離線蟲所需之時間只有操作時間（operational time）並無等待時間（waiting time），因此適用於分離需要快速檢測的土壤線蟲樣品例如植物進出口檢疫所需。而改良式柏門氏漏斗分離法操作時間60分鐘、等待時間23小時、總時間為24小時，雖然其操作時間60分鐘和懸浮網篩技術所耗之操作時間64分鐘相近，但由於其等待時間長達23小時，因此只適用於一般的土壤線蟲相調查工作或欲取得大量接種線蟲源所需。

在砂質土中分離活的南方根瘤線蟲二齡幼蟲、南方根腐線蟲、及腐生性線蟲所得的結果，以懸浮網篩技術之回收率較以離心懸浮法分離的回收率為高。而在砂質

表四、不同線蟲分離方法由不同土壤介質分離葉芽線蟲回收率及所需時間之比較

Table 4. The results of nematode-extraction recovery rate and required time on *Aphelenchoides besseyi* extracted by different nematode extraction methods

Nematode	Sandy soil		Sandy loam soil	
	Recovery rate (%)	Total time	Recovery rate (%)	Total time
<i>Aphelenchoides besseyi</i> (alive)				
Baermann funnels (BF)	20.0 b <sup>1)</sup>	24 hr	11.0 b	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	25.9 a	147.2 min	24.8 a	147.2 min
Flotation sieving (FS)	12.6 c	64 min	12.0 b	64 min
<i>Aphelenchoides besseyi</i> (dead)				
Baermann funnels (BF)	0 d	24 hr	0 c	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	15.8 bc	147.2 min	9.1 b	147.2 min
Flotation sieving (FS)	11.7 c	64 min	10.4 b	64 min
No nematode (check)				
Baermann funnels (BF)	0	24 hr	0	24 hr
Centrifugal flotation (CF)	0	128 min	0	128 min
Flotation sieving (FS)	0	64 min	0	64 min

<sup>1)</sup> Means (n=5) in the same column followed by the same letter are not significantly different (p=0.05) according to Duncan's multiple range test.

壤土中，不管分離活的或死的線蟲，皆以離心懸浮法之回收率最高，懸浮網篩技術次之。此乃由於砂質土的砂粒比例 (93.4%) 相當高，因此易於充分懸浮在蔗糖溶液中，以減少線蟲和土壤粒子吸附的可能性。又懸浮網篩技術的施行步驟較蔗糖懸浮離心法為少且所費時間亦較短，因此在砂質土中以懸浮網篩技術之回收率為高。而在砂質壤土中，其砂粒比例較低 (67.4%)，線蟲易和土壤粒子吸附，以懸浮網篩技術的步驟直接將土壤懸浮液傾倒於最上層為250孔目，下層為500孔目的兩層網篩中，線蟲不易被分離出，須以離心懸浮法之離心沉降才能將線蟲分離沉降出來，因此在砂質壤土中以離心懸浮法之回收率最高，懸浮網篩技術次之。因此由田間土壤中分離植物寄生性線蟲，應視田間土壤之質地為何，以決定應採用何種土壤線蟲分離方法。此外由於懸浮網篩技術之操作步驟不需要任何大型儀器如離心機等，因此適用於田間植物寄生性線蟲病害診斷現場操作所需。

在供試線蟲方面，其體形大小長度在0.37 mm至0.76 mm之間，體寬在16.4  $\mu$ m至29.5  $\mu$ m之間，對於不同土壤植物寄生性線蟲方法、不同土壤質地、及線蟲活性所得之分離結果，其差異並不明顯。由於實驗室線蟲大量培養技術的限制，因此大型線蟲如針線蟲 (*Longidorus* spp.) 及劍線蟲 (*Xiphinema* spp.) 並未測試。

由於分離不同種類或不同寄生習性植物寄生性線蟲，所適用的線蟲分離方法並不盡然相同，且不同的土壤質地及種類亦會影響線蟲回收效率的多寡，因此針對臺灣不同的植物寄生性線蟲相及不同的土壤環境，改良式柏門氏漏斗分離法仍有其需要性。由於懸浮離心法及懸浮網篩技術兩種分離方法皆以蔗糖溶液為其分離介質，土壤線蟲浸潤於此飽合溶液中雖然只有短短數分鐘，分離出之線蟲其死亡率常在50%

以上，因此若實驗欲取得大量之活的接種線蟲蟲源，其分離方法仍需以改良式柏門氏漏斗分離法為主。此外懸浮離心法及懸浮網篩技術兩種分離方法其操作步驟甚多，一般而言分離方法操作步驟越多，其分離出線蟲的數量及種類漏失的可能性越大。因此如何改良及減少蔗糖懸浮離心法及懸浮網篩技術兩種分離方法之操作步驟，亦是一重要課題。此外分離後線蟲之存活率多寡及病原性有否喪失亦是後續研究的重點。而本試驗偏重於由土壤中分離線蟲，由植物殘體分離外寄生或內寄生線蟲則未涉及，因此亦為後續研究所必須探討。

## 謝 辭

作者等感謝國立中興大學植物病理學系植物線蟲實驗室鄧堯銓先生、吳信郁先生、及黃惠茂先生所給予的協助，僅此以表謝忱。

## 引用文獻

1. 王兩全 1985 茶園種植瓜地馬拉草與線蟲發生密度之關係。臺灣茶業研究彙報 4: 29-37。
2. 杜金池、程永雄、郭芬蓮 1972 臺灣棉作線蟲種類調查及腎形線蟲、根瘤線蟲和殘根線蟲對棉作為害情形之初步觀察。植保會刊 14: 95-109。
3. 林奕耀、許天助 1973 直接取食洋菇菌絲線蟲之研究 I. 分類與分佈。中國園藝 19: 143-154。
4. 林奕耀、蔡東纂 1984 臺灣地區葡萄園中植物寄生性線蟲相之調查。中國園藝 30: 173-179。
5. 林奕耀、蔡東纂 1985 臺灣中部地區香蕉根瘤線蟲病之研究。中國園藝 31: 44-49。



6. 程永雄、杜金池 1980 臺灣落花生根瘤線蟲 *Meloidogyne arenaria* 之鑑定。中華農業研究 29: 47-53。
7. 蔡東纂、林奕耀 1983 臺灣中部荖花及荖葉根瘤線蟲病害之發生。植保會刊 25: 281-284。
8. 蔡東纂、程永雄 1994 臺灣花卉線蟲問題。pp.225-241。劉玉章、柯勇、陳隆鐘、曾國欽。臺灣花卉病害研討會專刊。中華植物保護學會。臺中。
9. 蔡東纂、程永雄、林奕耀、陳昭豐 1994 臺灣根莖薯類作物線蟲病害之發生。植保會刊 36: 225-238。
10. Barker, K. R. 1985. Nematode extraction and bioassays. pp. 19-35. In K. R. Barker, C. C. Carter, and J. N. Sasser, [eds.], An advanced treatise on *Meloidogyne* Vol. II: Methodology. North Carolina State University Graphics, North Carolina.
11. Barker, K. R., Nusbaum, C. J., and Nelson, L. A. 1969. Seasonal population dynamics of selected plant-parasitic nematodes as measured by three extraction procedures. *Journal of Nematology* 1: 232-239.
12. Caveness, F. E., and Jensen, H. J. 1955. Modification of the centrifugal-flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* 22: 87-89.
13. Ferris, H. 1987. Extraction efficiencies and population estimation. pp. 59-63. In J. A. Veech, and D. W. Dickson, [eds.], *Vistas on Nematology*. Society of Nematologists, Maryland.
14. Fortuner, R. 1991. Methods for collection and preparation of nematodes. Part 1. Field sampling and preparation of nematodes for optic microscopy. pp. 75-87. In W. R. Nickle, [ed.], *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, Inc. New York.
15. Hooper, D. J. 1986. Extraction of free-living stages from soil. pp. 5-30. In J. F. Southey, [ed.], *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Her Majesty's Stationery Office, London.
16. Hooper, D. J. 1990. Extraction and processing of plant and soil nematodes. pp. 45-68. In M. Luc, R. A. Sikora, and J. Bridge, [eds.], *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CAB International, London.
17. McSorley, R. 1987. Extraction of nematodes and sampling methods. pp. 13-47. In R. H. Brown, and B. R. Kerry, [eds.], *Principles and practice of nematode control in crops*. Academic Press, New York.
18. Singh, R. S., and Sitaramaiah, K. 1994. *Laboratory methods in Nematology*. pp. 261-289. In R. S. Singh, and K. Sitaramaiah, [eds.], *Plant pathogens: the plant parasitic nematodes*. International Science Publisher, New York.
19. Viglierchio, D. R., and Schmitt, R. V. 1983. On the methodology of nematode extraction from field samples: Baermann funnel modifications. *Journal of Nematology* 15: 438-444.
20. Viglierchio, D. R., and Schmitt, R. V. 1983. On the methodology of nematode extraction from field samples: Density flotation techniques. *Journal of Nematology* 15: 444-449.
21. Viglierchio, D. R., and Schmitt, R. V. 1983. On the methodology of nematode extraction from field samples: Comparison of methods for soil extraction. *Journal of Nematology* 15: 450-454.

## ABSTRACT

Yen, J. H.<sup>1</sup>, Lee, M. D.<sup>2</sup>, Chen, D. Y.<sup>1</sup>, Lin, C. Y.<sup>1</sup>, and Tsay, T. T.<sup>2</sup> 1998. The comparison of three nematode-extraction methods on four selected nematodes. Plant Prot. Bull. 40: 153-162. (<sup>1</sup>Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.; <sup>2</sup>Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

The comparison of three nematode-extraction methods (modified Baermann funnel method, centrifugal-flotation method, and flotation-sieving technique) on four selected nematodes (*Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus coffeae*, *Aphelenchoides besseyi*, and free-living nematode) has been conducted. The results showed that the recovery rates and required time in nematode extraction of centrifugal-flotation method and flotation-sieving technique are greater than of modified Baermann funnel method.

(Key words: modified Baermann funnel method, centrifugal-flotation method, flotation-sieving technique, recovery rate)

C  
(L  
C  
M  
Pw  
re  
p  
th  
d  
s  
o  
p  
d