

檢疫線蟲的鑑定技術實務

蔡東纂

中興大學植物病理系

第一章 植物線蟲採樣

目的：本實習旨在明瞭植物寄生性線蟲存在之土壤、根部、地上部及其他植物組織的取樣方法，並觀察其所導致之地上部與地下部病徵，俾供作為植物線蟲之形態、生活史、周年族群消長、生態環境和防治等研究之基本技術。

採樣：臺灣地處亞熱帶，且海島型氣候，又有山丘多及溪河網佈之特殊地型；古來，農作物栽培多採地利之便，而以渠水灌溉為主。因此，植物線蟲病害之發生及傳播有異於平原廣闊，栽作規格化之美國及歐洲等地；在線蟲採樣方法上自亦有所不同。

A.工具：圓鋤、小鏟子、塑膠手套、塑膠袋、簽字筆。

B.時機：植物寄生性線蟲之採樣時機可分為植前及植後兩種。植前採樣範圍除栽培土壤或介質外，尚包括種苗、種子、鱗莖、塊莖、塊根、根莖、葉片、枝條等植物繁殖體。植後採樣則以作物本體及根圍土壤或介質為主要對象，而於作物生長中後期採樣最好。

C.方法：

1.種苗採樣：植前種苗採樣一如檢疫採樣，首須對植物病原線蟲所引起於植物體上之病徵有所認識，方能於多量之檢體中檢出感病個體。有鑑於此，茲特以代表性例子表列各種不同寄生方式線蟲種類在種子、苗木及繁殖體上之病徵，以供參攷。(表一)將採樣品置於塑膠袋中，以繩索綁緊後，置陰涼處待驗。

2.盆新採樣：盆栽介質除較鬆軟的土外，多為泥炭土、鋸木屑、水草、人造纖維球、珍珠石、蛇木屑、塑膠泡綿、樹皮、椰子殼碎片及士林土等質材；採樣時可以塑膠手套探尋根系，擷取生長異常或有病變根段連同介質握於手中，翻脫手套同時將採樣物包裹於手套中，標記後置於塑膠袋中待檢。以外科用塑膠手套代替傳統之金屬採集器；原因為一、方便手指採樣時操作。二、避免同一金屬採集器在樣品間相互污染，以確保採樣之精確度。三、輕便易攜帶，有利於大量樣品之採集及長時間之操作，提高效率。

3.畦栽作物：本省畦栽作物除茶、桑等灌木型多年生特用作物外，蔬菜、花卉及少數水果為一年生作物。畦栽作物植物線蟲病害之田間表現常呈不均勻分佈，植株罹病程度亦有所差異。採樣時宜就病徵(黃化、矮化、葉片數少、枯萎等)程度分為0至4級，各級病株全株帶土挖起，裝入塑膠袋中，攜回待檢。採樣數視作物面積大小而定，各級採樣數不得低於6件。

4.多年生作物：本省多年生作物的主要以木本果樹及林木為主。果樹中栽植

於平坦地者以葡萄、番石榴、蓮霧、木瓜、楊桃、百香果等為多；而栽植於山坡或丘陵地者如柑桔、蘋果、梨、桃、李、枇杷及釋迦等皆是。平坦地果樹之線蟲病害根系採樣，由於樹型較一致，可按發病等級之不同於植株根系分佈之對等位置採三至四件樣品。(圖一、二)每等級植株採5株以上。

此方法有異於傳統的樹冠下平行四邊形對角線或星形尖端採樣法。歐美國家果樹枝條修剪乃因應機械採收之便，結果母枝呈輻射狀，故其根系分佈較呈圓輻分佈。而本省果樹修剪則圖人工採收之便，結果母枝間角度不一，常有為適應地勢、風向及陽光而作人工調整，因此根系分佈以在結果母枝正下方之土壤中為多，故在根部線蟲採樣點之抉擇自然須以結果母株之走向為依歸。

山坡及丘陵地之果樹依山而栽，在有坡度因素存在下，水份及肥份之累積偏重於下方，根系亦隨而聚集，故分佈更不均勻。其根系之採樣須視根系分佈而異。(圖三)

林木根系之線蟲採樣亦同上述。若為松材線蟲所感染者，則須以鋸子或砍刀取樣。

果樹根群生長深度受土壤密度、透水性及孔隙率等物理條件限制；本省各地土壤性狀不一，得因地制宜，理論和實際彈性配合，靈活運用。

D.標本存放：線蟲採樣物件之貯放須注意濕度、光線及溫度三項條件。

- 1.濕度：地上部線蟲如心苞內之葉芽線蟲(*Aphelenchoides* Fischer, 1894)，須於苞、芽、葉片或枝條置於塑膠袋後噴上少許水，保持濕度。若為種子或種球，則儘可能保持原狀，以免水分過多滋生雜菌。根部採樣時，若土壤過於乾燥或貯放於冷氣室，亦須噴水以免土壤太乾，線蟲死亡或活力不佳，影響分離效果。
- 2.光線：直射太陽光，會升高塑膠袋中溫度、土壤樣品容易乾燥及採樣植物標本萎凋，器官及組織死亡，須極力避免。
- 3.溫度：貯放線蟲樣品以10°C至15°C為佳。尋常冰箱溫度(5°C)，常導致線蟲活力降低，甚至死亡；尤以喜高溫性熱帶線蟲種類為甚。

參考文獻：

- 1.王貴美、蔡東纂、林奕耀。1993。臺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.蔡東纂、程永雄。1994。臺灣花卉線蟲問題。臺灣花卉病蟲害研討會專刊 225~241。
- 3.Southey, J. F. 1986. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 6th Ed. 202 pp.
- 4.Whyte, E. B., and Gowen, S. R. 1974. Recovery of nematodes from banana roots and soil samples. Nematropica 4:27-41.

第二章 植物病原線蟲之檢出

目的：本實習旨在分離及檢出活體植物病原線蟲，一方面讓學者在操作中觀察到線蟲寄生部位之病變及其棲息部位，也作為進一步線蟲種類鑑定之先前工作。

方法：植物病原線蟲之分離及檢出方法，依其寄生部位(如根、莖、葉、花、種子、球根、塊根、塊莖、球莖、鱗莖、根莖，甚至游移於土壤中)與寄生方式(如內寄生、外寄生、半內寄生)之不同而有所分別。茲說明如下：

A、介質中線蟲

依改良式柏門氏漏斗分離法(modified Baermann's funnel method)，以100公克介質為單位，於60孔目網篩上，靜置清水24小時後，將指形管中收集之線蟲倒入Syracuse鏡檢皿中檢視。

B、植物地上部寄生線蟲

寄生於植物地上部之線蟲種類有小麥腫癭線蟲(Anguina tritici (Steinbuch,1799) Chitwood,1935)、葉芽線蟲(Aphelenchoides spp.)、松材線蟲(Bursaphelenchus xylophilus)、莖線蟲(Ditylenchus angustus、D. dipsaci)及椰子紅輪線蟲(Rhadinaphelenchus cocophilus)等。依表一及表二所示病徵，取線蟲寄生之部位，如種子、莖、葉、球莖、心苞或枝幹等組織，剝開種子、切碎病組織或挑取線蟲絨團(莖線蟲)後，置於培養血清水中，30分鐘內線蟲即可游移於水中。以挑針挑取於玻片中，於光學顯微鏡下鏡檢。有時檢疫樣品中線蟲在運送過程中，因環境不適，導致活動力降低，麻痺或部份族群死亡，則可依後述之染色法確定之。

C、植物地下部寄生線蟲

1.內寄生性(endoparasitic)

(a)固著性(sedentary)

內寄生固著性植物病原線蟲，如根瘤線蟲(Meloidogyne spp.)、包囊線蟲(Heterodera spp.及Globodera spp.)及假根瘤線蟲(Nacobbus Thorne & Allen, 1944)等。根瘤線蟲及假根瘤線蟲在根系上結瘤情形頗為類似，但後者之瘤腫產生於根部側面，呈念珠狀，且無小根自瘤上長出；且於瘤中巨大細胞附近積聚大量澱粉，以碘液染色時呈現黑色，為其與根瘤線蟲在診斷上之差異。另一項不同點為根瘤線蟲可在馬鈴薯薯塊上形成腫瘤，而假根瘤線蟲則無。兩者在自土壤柔根系中之分離方法大致相同：以解剖刀切開根瘤及根部，檢視其中之雌、雄蟲、卵及發育中各齡期線蟲。必要時得以後述之染色法輔助觀察。包囊線蟲之雌成蟲很容易自根部上掉落，土壤中之包囊則於燒杯中加水輕輕攪拌，包囊將漂浮於水面上層，再倒於濾紙上即可搜集。

(b)潛移性(migratory)

內寄生潛移性植物病原線蟲，如根腐線蟲(Pratylenchus spp.)、穿孔線蟲(Radopholus spp.)及穿根線蟲(Hirschmanniella Luc & Goodey,1964)等。此類線蟲在土壤中族群分佈多在根圈附近，取根圈土壤依改良式柏門氏漏斗分離法分離即可。而根部內線蟲可採取一般根浸法(root incubation

technique)分離，其法即切碎根段置於培養皿中，注入10毫升清水，靜置30分至二小時，俟線蟲自根部組織中游出，便可挑出鏡檢。筆者常用之方法略有不同；將根縱剖後，切成1公分之根段，以60網目之紗網包起，置於125毫升之三角瓶中，內注清水20毫升，於振盪器中正反方向搖動(每分鐘15次)，5至30分鐘後可倒其中液體於培養皿中鏡檢。此法有雜質少利於觀察及節省時間之優點。亦可以後述之染色法輔助檢查。

2. 半內寄生性(semi-endoparasitic)

(a) 固著性(sedentary)

半內寄生固著性線蟲，常見的如腎形線蟲(Rotylenchulus reniformis Linford & Oliveira,1940)及柑桔線蟲(Tylenchulus semipenetrans Cobb, 1913)。在土壤中之二齡幼蟲及雄蟲可依一般土壤線蟲分離法分離，而三齡、四齡及成熟雌蟲可切取根段直接於顯微鏡下觀察。若染色後，更方便檢視。

(b) 潛移性(migratory)

此類線蟲如螺旋線蟲(Rotylenchus Filipjev,1936及Helicotylenchus Steiner,1945)、環紋線蟲(Criconemella De Grisse & Loof,1965)和矮化線蟲(Tylenchorhynchus Cobb,1913)等，線蟲體前半部侵入寄主植物根部，地上部病徵出現初期，根圈土壤內可分離到龐大線蟲族群。若欲染色時，可將標本根段快速冷凍20分鐘後，置於染液中以微波爐急速加熱1分鐘，即將根段挑起置於培養皿清水中鏡檢；此法可避免緩慢加熱時線蟲自根部脫離之弊。

3. 外寄生性(ectoparasitic)

此類線蟲取食時，並未進入植物根內，通常具有較長口針。具毀滅性的如劍線蟲(Xiphinema Cobb,1913)、殘根線蟲(Trichodorus Cobb,1913)、針線蟲(Logidorus (Micoletzky,1922)Throne & Swanger,1936)、鞘線蟲(Hemicycliophora de Man,1921)及釘線蟲(Paratylenchus Micoletzky,1922)等。由於其多存在於根系外圍，分離線蟲時只能取栽培土壤或介質為之。

參考文獻：

- 1.黃炤雄、蔡雲鵬、林奕耀、杜金池、黃修斌。1972。臺灣植物寄生性線蟲。中研院植研所專刊第一號 66pp.
- 2.曾顯雄、顏志恒。1989。臺灣松材線蟲萎凋病之發生及防治。植物線蟲病害防治研討會專集 p 15-32。
- 3.Barker, K. R., Carter, C. C., and Sasser, J. N. 1985. An advance treatise on Meloidogyne Volume II : Methodology. Raleigh, North Carolina, Department of Plant Pathology, North Carolina state University & United states Agency for International Development. 223p.
- 4.West, J. A. 1957. Recommended changes in recovery techniques for burrowing nematode. Plant Dis. Rep. 41:600-602.

第三章 植物線蟲病害之田間診斷

目的：植物線蟲病害，尤其是根部感染者，甚易與土壤相關因素(物理、化學、生物)障害所引起之養份吸收不良、微量元素缺乏及水份供需失調等病徵相混淆。本實習旨在使學員自田間線蟲病害之觀察及診斷，了解其發生和環境之關係，進而探討其傳播因子。

方法：

A.病徵觀察：

1.根部線蟲病害：

地上部病徵：植株矮化、葉片黃化、葉片變小、果實大小及數量銳減、微量元素缺乏、提早老化、提早開花及萎凋等。

地下部病徵：根系結瘤、壞疽、髮狀、斷落及停止伸長。

2.地上部線蟲病害：

種子、球根、莖、葉部病徵：*Ditylenchus*、*Angurina*及*Aphelenchoides*三個屬的線蟲種類最常引起上述部位的病變。如由小麥腫癭線蟲(*Anguina tritici*)引起的麥粒褐黑腫大，莖線蟲(*Ditylenchus dipsaci*)造成莖部扭曲腫凸及葉片畸形。葉芽線蟲(*Aphelenchoides besseyi*)導致水稻葉尖白化、抽穗短小、穀粒減少及草莓芽苞萎縮、葉片殘破等病徵。

枝幹部位病徵：松材線蟲(*Bursaphelenchus xylophilus*)感染後的松樹有木質部褐化及松脂分泌漸少情形，繼之針葉黃化，終全株死亡。紅輪線蟲(*Rhadinaphelenchus cocophilus*)引致椰子結果極少，葉片黃化及枯死。基部樹幹橫切面上，有明顯紅色輪紋。(請參考表一)

B.田間發生

植物線蟲病害在田間的發生和其他植物病原引起之病害在栽培區中罹病株分佈不均，即使種苗攜帶病原線蟲者亦然。罹病田中作物之發病程度也有等級之分。田間線蟲病害之診斷須依邏輯學一事相、歸納、推理、演譯，四個步驟逐一進行。茲說明於后：

(一)事相：即田間線蟲病害在田間作物上病徵之「觀察」及整個栽培地區發病環境之綜合「了解」。

(二)歸納：由於作物線蟲病害之病徵易和其他因素所致者相混淆，得以「比較法」來作一歸納。例如本省常見的根瘤線蟲(*Meloidogyne* spp.)連作障害田，依0至4級不等之罹病株，挖起排列比較；自0級的健株至4級的嚴重病株，地上部高度、葉片顏色、數目及大小等差異有等級化之變化；地下部根系長度、數目、根瘤指數亦隨之變異。歸納結束，原因出於根瘤線蟲之危害。其他寄生方式之線蟲病害可比照辦理。

(三)推理：歸納之結果，須以科學化之推理來周延其診斷之準確性。例如罹根瘤線蟲病株根瘤上可以解剖出大量之雌成蟲。罹葉芽線蟲之草莓心苞中可以水浸法於培養皿中釋出線蟲，其數目且依病害等級而有規則化。如係不易判別之新線蟲病害、新寄主、兩種以上線蟲感染、植株病徵明顯但剛施用殺線蟲以致分離之線蟲數極少以

及外寄生性線蟲危害等情形下，可將原作物植株移植於溫室中，俟該病原線蟲族群數目提高，分離後，接種於健康之該作物苗株，依柯霍氏法則(Koch's Postulates)逐步證明之。

(四)演譯：田間診斷之演譯是實務經驗之源。例如導致田間罹病株病徵及根系壞疽，根尖紅褐化之線蟲病害為根腐線蟲(*Pratylenchus* spp.)及穿孔線蟲(*Radopholus* spp.)之類的內寄生潛移性線蟲(migratory endoparasitic nematode)。根系上黏附大量土壤顆粒，不易除去的為半內寄生性(Semi-endoparasitic)的柑桔線蟲(*Tylenchulus semipenetrans*)及腎形線蟲(*Rotylenchulus reniformis*)。根系上有圓形或檸檬形包囊的為包囊線蟲(*Heterodera* spp.)或黃金線蟲(*Globodera* sp.)。根系上結瘤的為根瘤線蟲(*Meloidogyne* spp.)、假根瘤線蟲(*Nacobbus* spp.)或鞘線蟲(*Hemicycliph* spp.)所致。根系停滯生長的多由外寄生性線蟲(ectoparasitic nematode)所引起。芽苞異常之線蟲病害則常是因葉芽線蟲或莖線蟲所感染。

參考文獻：

1. 蔡東纂、程永雄。臺灣花卉線蟲問題。1994。臺灣花卉病蟲害研討會專刊225-241。
2. 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。植會刊36:225-238。
3. Ayoub, S. M. 1980. Plant Nematology: An agricultural training aid (revised). Nema Aid Publications, Scaramento, CA. 195 pp.
4. Sasser, J. N. 1989. Plant-Parasitic Nematodes : The Farmer's Hidden Enemy. A Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology and the Consortium for Interational Crop Protection. 115 pp.

第四章 植物線蟲病害之傳播

目的：植物病原線蟲之傳播可分為短距離及長距離兩種情況。短距離傳播方式主要藉由灌溉水流、種苗、土壤、農機具及動物足跡。長距離傳播則多經由人為的植物繁殖體交流，尤其是海陸空交通方便，貿易往來頻繁的現代。嚴格而言，傳播方式僅是將該線蟲移往特定地區，該線蟲是否能成功的建立族群，危害作物，甚至造成經濟衝擊，才是研究線蟲傳播之目的。

方法：

A. 灌溉水流對根瘤線蟲傳播之作用

根瘤線蟲為雌雄異型，內寄生固著性植物病原線蟲，於其生活史中，唯一齡幼蟲及卵塊為傳播之齡期。本實習以引用灌溉水且根瘤線蟲病害嚴重的南投線葡萄專業區為研究對象。採巨峰葡萄罹根瘤線蟲根系一公手，攜回研究室後，以解剖刀擷取卵塊20個，個別置於加入3毫升蒸餾水之指形管中。由卵塊孵化出之二齡幼蟲亦置於20個指形管中，每管50隻。另取根瘤等級3以上根系3公分，切成小段，置入指形管中，加蒸餾水至完全淹蓋，此處理亦20重複。將上述3種處理放入每分鐘搖盪15次之20°C定溫水槽中，於第3、15、30、75及120天時分別取出接種於番茄苗根部。30天後，洗淨蕃茄根部，計算根瘤數目。因恐上述試驗設計所使用蒸餾水和田間水樣有所差異，故而另以葡萄園土浸出液取代蒸餾水，處理方式則一如上述。本試驗共6處理，20重複。

結果：結果顯示水中卵塊及斷根內線蟲在4個月後仍具有感染蕃茄之能力，幼蟲在水中一個月即死亡。

參考文獻：

1. 蔡東纂、林奕耀。1985。臺灣葡萄根瘤線蟲之發生及傳播。中國園藝31(2):94-104。
2. Kingsolver, C.H. Melching, J.S. and Bromfield, K.R. 1983. The threat of exotic plant pathogens to agriculture in the United states. *plant Dis* 67:595-600。
3. Sasser, J.N. 1977. Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *J. Nematol.* 9:26-29.

第五章 水稻種子葉芽線蟲檢疫

目的：由種子傳播之植物病原線蟲，如稻白尖病葉芽線蟲(*Aphelenchoides besseyi*)、花生根瘤線蟲(*Meloidogyne arenaria*)和葉芽線蟲(*A. arachidis*)、小麥腫癭線蟲(*Anguina tritici*)、豆莖線蟲(*Ditylenchus dipsaci*)及蔥莖線蟲(*D. dipsaci*)等。一般種子攜帶之線蟲可以水浸法於培養皿中分離之，此法以較大型種子如豆類種子及種莢為宜；然對細小如穀類、雜糧、蔥及部份花卉種子則有缺點。平常調查種子帶線蟲率及單一種子所帶線蟲數量是線蟲檢疫上兩大重要記錄。以直徑5公分及8公分之培養皿來進行單一種子線蟲分離，在顯微鏡下不易全面察看整個培養皿，且所須培養皿數量甚多，工作量大，效率又低。本實習以較新之雙面塑帶法克服上述之缺點。

方法：以0.1公分厚、2.5公分寬之雙面塑膠帶，剪成6公分長之片斷，再以直徑0.9公分之皮帶釘孔器等距離打3個洞。撕開一面之黏紙，貼於2.5公分寬、8.5公分長之載玻片上，用指頭均勻壓實，尤其是凹洞之圓周邊緣，注意不得有空隙，以免滲水。如此，在載玻片上即有三個直徑0.9公分之迷你培養皿了。載玻片上空留之2.5公分，即供作標記之用。將水稻種子以鑷子分開稻殼及種粒，一併置入上述所做之載玻片凹洞中，注入蒸餾水，30分鐘後即可於光學顯微鏡下直接鏡檢。(圖一)此方法每凹洞一粒種子，一片載玻片可連續檢驗三粒種子；以目鏡10倍，物鏡4倍之光學顯微鏡下恰可觀察一個凹洞，沒有線蟲因培養皿之移動而在水中分散難尋之虞；可縮短時間及提昇效率。此法亦可以乳酚溶液(lactophenol solution)代替蒸餾水，用以保持染色後或未染色之植物組織線蟲標本。將蓋玻片覆於凹洞上，再以指甲油封於蓋玻片四周，俟乾後置室溫下，可保存5年以上。

參考文獻：

- 1.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。
- 2.Coolen, W.A. & Herde, C.J. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent, state Agriculture Research Centre:77p.
- 3.West, J.A. 1957. Recommended changes in recovery techniques for burrowing nematode. Plant Disease Reporter 41:600-602.
- 4.Young, T.W. 1954. An incubation method for collecting migratory endoparasitic nematodes. Plant Disease Reporter 38:794-795.

第六章 植物病原線蟲寄生之植物組織染色

目的：植物病原線蟲所感染之植物組織或器官在保存時須經過準確檢查及固定，最好能經過染色過程，以便更能清楚的於植物組織中觀察其寄生部位。線蟲染色在研究線蟲生活史及侵入過程等生態研究上頗為重要，尤其在講究快速通關檢疫的國境出入關口，更可高效率的在短時間內完成檢驗。

方法：

A. 染液

根部染劑常用0.05% cotton blue(methyl blue)，植物組織染劑有人偏好使用0.05% acid fuchsin，或使用濃度較低之cotton blue。本實習則以0.08% cotton blue lactophenol solution 來做染色液。lactophenol solution之配方如下：

Phenol liquid	50ml
Lactic acid	50ml
Glycerol	100ml
Distilled water	50ml

因lactophenol solution中之phenol含有劇毒，Bridge等人以等量之glycerol、lactic acid及distilled water配成lactoglycerol solution 以取代之。

B. 加熱方式

一般染色時以凹玻片乘染劑，由底部火焰加熱至65°C左右，再將欲染之植物根部或組織放入，浸幾小時或隔夜後，直接於解剖顯微鏡下觀察；如清晰度未達理想程度，則再反覆處理。本實習之加熱方式係用置於密閉式排風機中之微波爐(microwave)，以中段火力加熱1至5分鐘。陶瓷淺鉢中盛放欲染植物樣品，袋入染劑後，迅即放入微波爐中加熱。染色後，夾出染色植物樣品置於plain lactophenol solution 中即可觀察。

C. 標本保存

染色時標本若太厚，宜切成薄片，以利染色及保存。保存時，如標本可壓放於蓋玻片及載玻片中，可滴以plain lactophenol solution，再以指甲油(nail vanish)塗封四周。若標本較厚可用凹載玻片或雙面塑膠帶凹洞法(第五章所述)，將標本封於注入plain lactophenol solution之凹洞中，覆上蓋玻片，同樣以指甲油封片。

參考文獻：

1. Bridge, J., Page, S. & Jordam, S. 1982. An improved method for staining nematodes in roots. Report of Rothamsted Experimental station for 1981, Part 1:171.
2. Esser, R.P. 1973. A four minute lactophenol fixation method for nematodes. Plant Dis. Rept. 57:1045-1046.
3. Franklin, M.T. & Goodey, J.B. 1949. A cotton blue lactophenol technique for mounting plant-parasitic nematodes. J. Helminthol. 23:175-178.