

山蘇花葉芽線蟲在臺灣之發生

游培琪¹ 蔡東纂^{1,2}

1 台中市 國立中興大學植物病理系

2 通訊作者：電子郵件 tttsay@mail.nchu.edu.tw，傳真：+886-4-22876712

接受日期：中華民國 93 年 1 月 23 日

摘要

游培琪、蔡東纂. 2003. 山蘇花葉芽線蟲在臺灣之發生. 植病會刊 13: 35-44.

文獻上記載 *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1891) Christie, 1932 可造成山蘇花葉斑病，然本省一直未發現此一病原線蟲及其引起之病害。民國 89 年在三峽地區山蘇花栽培園中，發現類似由線蟲造成之葉斑病病徵，而後在嘉義、烏日及東部地區也陸續發現相同病情。從病葉分離病原線蟲，鏡檢後初步鑑定為葉芽線蟲 *Aphelenchoides* spp.。本病原線蟲在真菌 *Alternaria citri* 上繁殖良好，生長溫度範圍為 8 - 32 °C，最適繁殖溫度則在 20 - 28 °C 之間，低於 4 °C 與高於 36 °C 的情況下，線蟲則無法存活。病原性測定之結果發現，分離自草莓的葉芽線蟲 *A. besseyi* 無法感染山蘇花，而從山蘇花上分離得到之葉芽線蟲則可。殘存試驗顯示，添加山蘇花葉片的處理中，病原線蟲的存活情形明顯優於未添加者，在三個月後仍可分離到少量線蟲。以光學顯微鏡測量病原線蟲各部位的比例長度，與 *A. besseyi* 測量值範圍上並無顯著差異。利用低溫場掃描式電子顯微鏡觀察病原線蟲之頭部型態（突起）、側區的側線數目（4 條）與尾部分岔數目（3 - 4），確定為 *A. besseyi*，而非文獻上記載引起山蘇花葉斑病之 *A. fragariae*。寄主範圍測試結果顯示，本病原線蟲可以成功的感染水稻、草莓、非洲堇、秋石斛，卻無法感染百合、秋海棠，與文獻上所記載 *A. besseyi* 的寄主有些許差異。其中值得注意的是，文獻記載 *A. fragariae* 於山蘇花上之寄生方式為內寄生，而本省感染草莓及水稻之 *A. besseyi* 在大部分之生活史中皆以外寄生方式危害植物，因此 *A. besseyi* 在本省能夠感染山蘇花不僅是一個新寄主之發現，其寄生行為之進化現象更具實質意義。本研究之結果初步朝演化的方向解釋其寄生行為的轉變，暫不將其歸類為一新的生物小種。

關鍵詞：葉芽線蟲、山蘇花、形態鑑定、生理小種

緒言

台灣氣候溫暖潮濕，非常適合蕨類的生長，其中山蘇花 (*Asplenium* spp.) 不僅在園藝栽培上為重要之觀賞作物，嫩芽嫩脆可食，此外尚可製酒、老葉可煮茶，用途相當廣泛⁽²⁾，為農政單位積極輔導的經濟作物。

山蘇花之線蟲病害在文獻上之記載為 *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1891) Christie, 1932 造成之山蘇花葉斑病⁽²³⁾，此線蟲在溫帶及熱帶地區的寄主包括 47 科超過 250 種植物，在草莓上造成嚴重的春季萎縮病 (spring crimp or dwarf crimp)，主要的寄主植物為山蘇花 (ferns)，將近一百種的山蘇花受到其危害⁽¹⁶⁾，然本省之前未曾發現此一病害。2000 年在三峽地區山蘇花栽培園中，發現類似由線蟲造成之葉斑病病徵，病斑出現在葉緣或從植株心部逐漸向上擴散，病斑擴展的方向多由中央主脈擴展至周圍葉肉組織。初期病徵為葉面出現水浸狀褐色斑點，病

斑隨時間擴大並且呈現深褐色，而後葉片乾枯死亡 (圖一 A)。罹病植株在田間位置呈隨機分佈，未見明顯的地理關係。而後在嘉義、烏日及東部地區也陸續傳出相同災情。由於本省之前尚未有 *A. fragariae* 危害作物的報導，因此本病害之病原線蟲有可能為外來引進之新病原，基於檢疫的考量，其分類地位上之鑑定工作迫在眉睫。

Aphelenchoides Fischer 1894，此屬線蟲有 197 種，其中有五至六種為重要之植物病原線蟲，稱之葉芽線蟲 (foliar, leaf and bud nematode)。葉芽線蟲分佈相當廣泛，通常以內寄生或外寄生方式在植物之葉、芽、花苞或葉鞘內取食生長點及幼嫩組織，並且兼食多種真菌菌絲⁽¹⁹⁾。葉芽線蟲在本省已知種有植物寄生性之 *A. besseyi* 與危害蘭花之 *A. bicaudatus* Imamura, 1931⁽³⁾，以及食菌性之 *A. composticola* Franklin, 1957⁽⁵⁾。文獻中並未記載有關 *A. besseyi* 能夠在山蘇花上寄生的現象，因此本病害之病原線蟲是否為台灣既存之葉芽線蟲 *A. besseyi*，則有待釐

清。本研究針對本省發現之山蘇花線蟲病害進行鑑定及生理生態等相關研究及藥劑防治試驗，以作為該線蟲研究之基礎。

材料方法

線蟲之分離與培養

將 2000 年三峽 (San-Shia) 與 2001 年嘉義 (Chia-Yi) 地區山蘇花栽培園中所採樣的罹病葉片病斑部位切碎置於無菌水中，待線蟲游出葉片組織後，以拉細的玻璃吸管在解剖顯微鏡下吸取 30 隻線蟲，依序置入孔雀綠 (malachite green) 1000 ppm 溶液處理 60 秒，以及鏈黴素 (streptomycin sulfate) 1000 ppm 溶液處理 60 分鐘，經過無菌水漂洗三次，最後注入長滿柑桔黑腐病病原真菌 *Alternaria citri* Ellis & Pierce emend. Bliss & Fawcett 菌絲之馬鈴薯洋菜培養基 (PDA) 斜面試管中，於 24 °C 的恆溫箱中進行繁殖，每月更新培養一次，作為本研究試驗用之蟲源。

山蘇花線蟲病害鑑定

將上述培養之葉芽線蟲，經改良式柏門氏漏斗分離法 (Modified Baermann funnel technique)⁽²²⁾ 收集 24 小時後，製成線蟲懸浮液，以玻璃吸管吸取 1000 隻二齡幼蟲置於指形管中備用。以消毒過之醫用注射針吸取指形管內之線蟲，緩緩注入健康之山蘇花葉片內，此試驗接種用之山蘇花植株包括台灣常見之南洋山蘇花 (*Asplenium australasicum* (J.Sn.) Hook.)、台灣山蘇花 (*Asplenium nidus* L.) 和山蘇花 (*Asplenium antiquum* Makino)。

觀察植株發病情形，待病徵出現後，將病斑部位切下置於無菌水中，利用解剖顯微鏡觀察是否有線蟲游出，於光學顯微鏡下，觀察線蟲之重要鑑定特徵並照相紀錄之。進行葉片組織染色，將切碎之山蘇花葉片浸於 cotton blue 溶液中，以微波爐加熱 1-2 分鐘，再以無菌水漂洗後，於解剖顯微鏡下觀察線蟲侵染現象。

線蟲對山蘇花之病原性測定：供試植株為自彰化田尾花市購得健康山蘇花苗 (*Asplenium nidus* cv. "Avis")，種植於泥炭土中，培養於溫室中備用。線蟲接種源分別為：分離自三峽 (San-Shia) 與嘉義 (Chia-Yi) 地區山蘇花罹病葉片內之線蟲，以下分別簡稱 As 及 Ac，以及分離自草莓上之葉芽線蟲 *Aphelenchoides besseyi*，簡稱 Ab。

不同接種方法之探討：1、葉部注射滲透法 (Leaf injection infiltration method)，以醫用注射針吸取 1000 隻線蟲緩緩注入山蘇花葉片內。2、葉部針刺傷口法 (Leaf pricking method)，以醫用注射針於葉部表皮刺三孔而不刺穿葉片，再以透明膠帶固定脫脂棉花包覆傷口，吸取

1000 隻線蟲注入傷口處，並保持傷口處濕潤狀態。3、無傷口接種法：仿 2 之方法，但不製造傷口。4、山蘇花心部接種：將試管培養之線蟲連同培養基洗出，直接覆蓋於健康山蘇花苗之心部，隔天以灌溉水將山蘇花心部之培養基沖掉。以試管培養之 *Alternaria citri* 經改良式柏門氏漏斗分離 24 小時後之菌液作為對照組接種源，觀察其病徵發展並照相紀錄之。

接種潛勢測定

收集大量培養之線蟲 As、Ac，以醫用注射針分別將每毫升含 0、10、100、500、1000 隻線蟲之懸浮液緩緩注入山蘇花葉片內，每一接種源濃度處理 10 片葉片，以草莓上分離之 *A. besseyi* (Ab) 作為對照組接種源，定期紀錄發病之葉片數，並將罹病葉片切碎置於無菌水中待線蟲游出，計算每葉片內之線蟲數量，試驗進行兩次。

病原線蟲的形態鑑定

(一) 病原線蟲之光學形態觀察與測量

以改良式柏門氏漏斗分離法收集試管培養之線蟲，隔水加熱將線蟲殺死後，以拉細之玻璃吸管吸取雌蟲及雄蟲各 50 隻，於光學顯微鏡下進行鏡檢，拍照紀錄其重要鑑定依據的部位，並以接目測微器 (ocular micrometer)，依據 de Man's formula⁽¹⁰⁾ 測量其範圍、平均值。

(二) 病原線蟲之掃描式電子顯微鏡形態觀察

以改良式柏門氏漏斗分離法收集培養之線蟲，利用低溫場放射掃描式電子顯微鏡 (JEOL JSM-6330F) 於加速電壓 2.8kV 下觀察線蟲體表之微細構造，並照相紀錄。其原理為利用低溫裝置，線蟲材料可不經化學固定而以浸泡液態氮急速低溫冷凍的方式維持在 -130 °C 的環境下觀察⁽⁴⁾。

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 As、Ac 與 Ab，以消毒過之玻璃吸管吸取 20 隻線蟲，分別注入長滿 *Alternaria citri* 菌絲之 PDA 斜面上，置於 4、8、12、16、20、24、28、30、32 及 36 °C 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，試驗進行兩次。

病原線蟲之殘存能力

供試土壤為經過蒸氣消毒之泥炭土，置於盆鉢中備用。殘存試驗分別作兩種處理，一為不添加任何物質，另一者添加 10 g (約兩葉) 山蘇花葉片之碎片。每處理接種 500 隻線蟲。接種後 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 週調查土壤中之線蟲數目，以了解植株殘體的存在是否影響線蟲的殘存情形。

寄主範圍測試

本試驗測試的植物種類為：草莓 *Fragaria glandiglora* Ehrh.、水稻 *Oryza sativa* L.、百合 *Lilium formosanum* A.、非洲堇 *Saintpaulia ionantha* H.、秋海棠 *Begonia semperflorens* L.、秋石斛 *Dendrobium phalaenopsis* Hort.。草莓來自大湖田間採收後之匍伏莖育成；水稻為台農 67 由種子育苗；百合採自埔里山區之野生種台灣百合；其餘供試植物由田尾購得。

接種方法：在草莓心部滴入線蟲懸浮液 (1000 隻以上)；水稻在育苗一週後接種，於葉鞘部位滴入線蟲懸浮液；百合則以注射針注入球莖及花苞內；非洲堇、秋海棠、秋石斛之接種方式均以注射針將線蟲懸浮液緩緩注入葉片內。接種後之植株置於溫室培養，每日觀察其病徵發展。

藥劑試驗

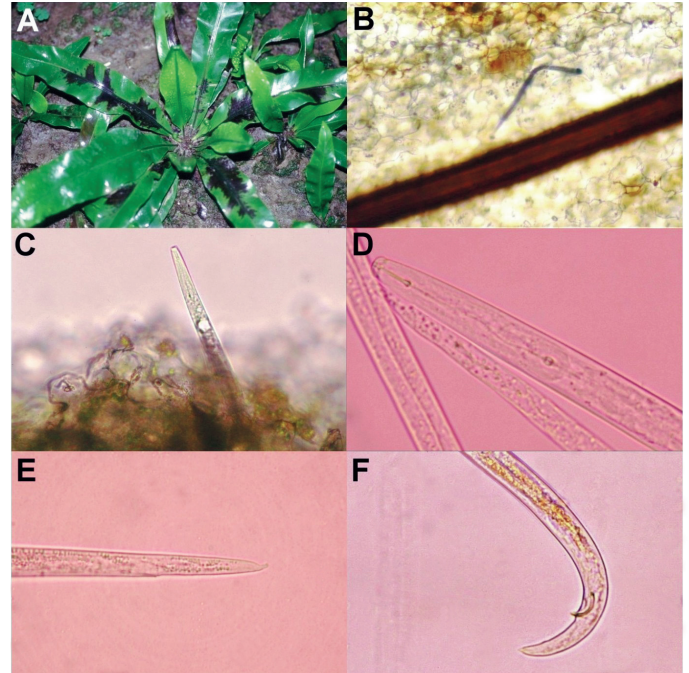
供試藥劑有歐殺滅 Oxamyl (杜邦) 24% 溶液、阿巴汀 Abamectin (瑪斯德) 2% 乳劑、芬滅松 Phenamiphos (惠光) 40% 乳劑、普伏松 Prophos (富農) 45% 乳劑，參考推薦濃度配置成不同稀釋濃度備用。吸取 Ab、Ac、As 二齡幼蟲，分別處理上述藥劑之不同稀釋濃度，在細胞培養盤 (TC-PLATE 24 WELL, CELLSTAR®) 內進行試驗，每一槽內含農藥溶液 2ml，線蟲 50 隻，加蓋防止水分蒸發。每處理 4 重覆，24 小時後紀錄線蟲之存活情形，並計算活蟲與死蟲的比例。

結 果

山蘇花線蟲病害鑑定

自山蘇花罹病葉片內所分離得到的線蟲，經過消毒後可在長滿 *Alternaria citri* 菌絲之 PDA 斜面試管中繁殖良好 (24°C)。分別將 As 與 Ac 接種至健康山蘇花葉片，兩週後開始出現水浸狀淺褐色病斑，之後病斑逐漸擴大並且呈不規則狀，隨後病斑逐漸轉為深褐色，終至整片葉片乾枯死亡，與田間所見之葉部病徵相同。此外，發現山蘇花葉片上之病斑受葉脈限制而發展，線蟲並無法跨越中間主脈擴展至另一半邊葉片，因此葉片常出現半側完全枯萎而另一側則依舊健康翠綠的現象。本試驗所接種用的山蘇花品種皆對 As 及 Ac 感病，病斑形態以及病斑開始出現之時間相同。

葉片在經過組織染色後，病斑處可見線蟲分佈其中，位置通常靠近主葉脈周圍 (圖一 B)。將葉片病斑部位及附近葉片組織切碎後置於無菌水中，經過 5-10 分鐘之後可見少量線蟲游出葉片組織 (圖一 C)。在光學顯微鏡下，可見其口針細、結球小，中部食道球大而明顯，雌蟲單卵巢，不具陰門蓋，雄蟲則具有玫瑰刺狀的交接刺，不具副



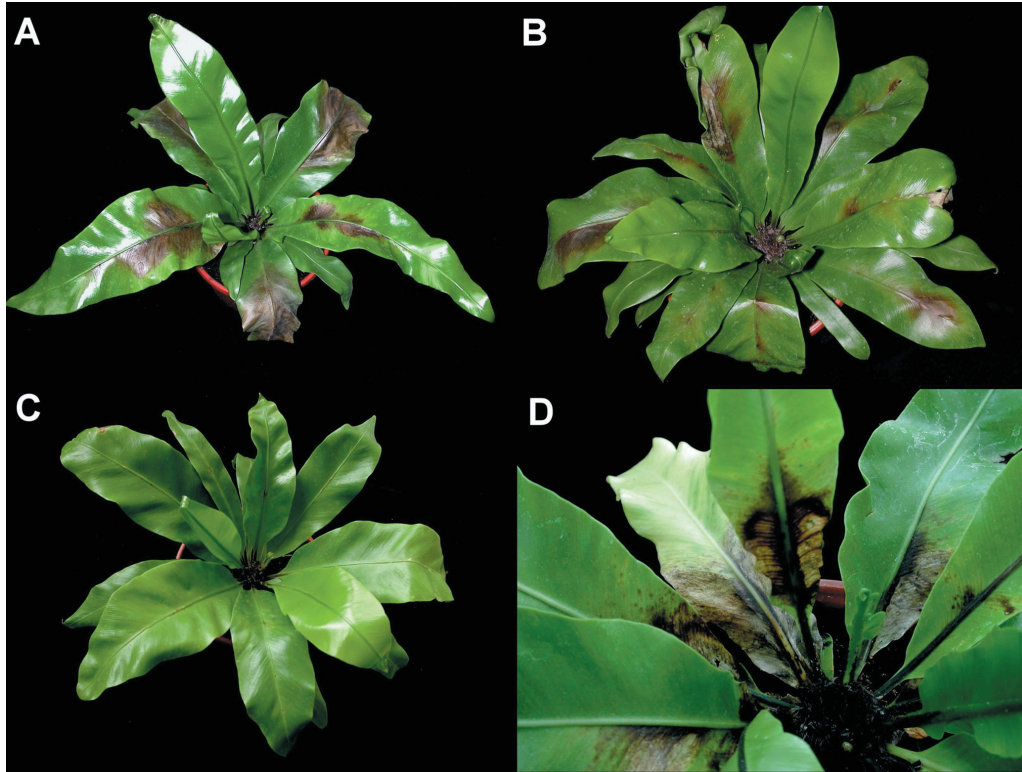
圖一、台灣山蘇花栽培園中葉芽線蟲病害之發生。A) 山蘇花葉芽線蟲病害，葉片上之黑褐色不規則病斑。B) 葉片病斑處染色後可見線蟲分佈其中；C) 線蟲游出葉片組織；D) 光學顯微鏡下山蘇花病原線蟲之頭部形態 (400x)；E) 雌蟲尾部形態 (400x)；F) 雄蟲尾部形態 (400x)。

Fig. 1. The nematode disease of fern in Taiwan. A) A diseased plant showing dark-brown necrosis on leaves. B) A nematode in diseased leaf tissue. The leaf was stained by cotton blue solution. C) A nematode migrated out of leaf tissue. D) Anterior portion of nematodes (400x); E) The tail of a female nematode (400x). F) The tail of a male nematode (400x).

刺與交接囊，尾部漸尖，初步鑑定為葉芽線蟲⁽²¹⁾ (圖一 D-F)。

試驗結果發現自草莓上分離的 *A. besseyi* 無法成功感染山蘇花 (圖二 C)，而從山蘇花上分離得到的線蟲 As 及 Ac 則可成功感染，並且在兩週後造成與田間相同之褐化病徵 (圖二 A、B)。不同接種方法之結果有明顯差異，其中以葉部注射為最佳。在表皮上製造傷口並以脫脂棉花保濕之接種方式，線蟲侵入感染的能力不佳，接種的成功率難以掌握，且病斑發展亦較注射針法緩慢，當線蟲侵入感染後，若將棉花移除，葉片則從傷口處迅速乾枯死亡，容易與線蟲造成之病徵混淆。同樣方法而不製造傷口的接種方式，線蟲則無法順利侵入並成功完成感染。植株心部之接種，可在兩週後發現山蘇花葉片靠近心部出現褐化現象 (圖二 D)。

以 *Alternaria citri* 菌液接種之對照組則無病徵出現，因此可摒除試管中隨線蟲被分離出的 *Alternaria citri* 造成山蘇花葉斑病之可能性。



圖二、接種山蘇花葉芽線蟲兩週後引起之病徵。
山蘇花接種 A)As、B)Ac 及 C)Ab 兩週後之病徵; D)山蘇花心部病徵。

Fig 2. Leaf symptoms of fern plants inoculated with foliar nematodes (*Aphelenchoides* spp.) for 2 weeks. Symptoms after 2 weeks inoculated by A)A fern plant inoculated with As; B) A fern plant inoculated with Ac and C) A fern plants inoculated with Ab (nematode isolated from strawberry) showing no visible symptoms; D) close-up view of a fern plant inoculated with As isolated from fern. Note brown necrotic lesions on the leaves.

表一、不同葉芽線蟲接種源濃度對山蘇花發病之影響

Table 1. Effect of source and concentration of foliar nematodes (*Aphelenchoides besseyi*) on incidence of fern leaf nematode disease

Nematode population per leaf		No. of diseased leaves / No. of nematodes per leaf					
		Weeks after inoculation					
		1	2	3	4	8	12
As ²	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	10	0/2	0/2	0/0	0/0	0/0	0/0
	100	0/6	0/2	1/4	1/1	1/0	1/0
	500	0/32	5/17	10/44	10/20	10/6	10/2
	1000	0/34	7/43	10/28	10/15	10/33	10/6
Ac ³	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	10	0/1	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0
	100	0/6	0/3	0/0	0/2	0/0	0/0
	500	0/24	3/6	8/21	10/45	10/11	10/3
	1000	0/26	8/27	10/38	10/13	10/7	10/19
Ab ⁴	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	10	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	100	0/2	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0
	500	0/6	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0
	1000	0/13	0/2	0/0	0/0	0/0	0/0

¹ Nematodes were injected into leaves of fern by the injection infiltration method in 1ml per leaf. There were 10 replicates (leaves) per treatment.

² As: *A. besseyi* isolated from fern at San-shia.

³ Ac: *A. besseyi* isolated from fern at Chia-yi.

⁴ Ab: *A. besseyi* isolated from strawberry at Da-Hu.

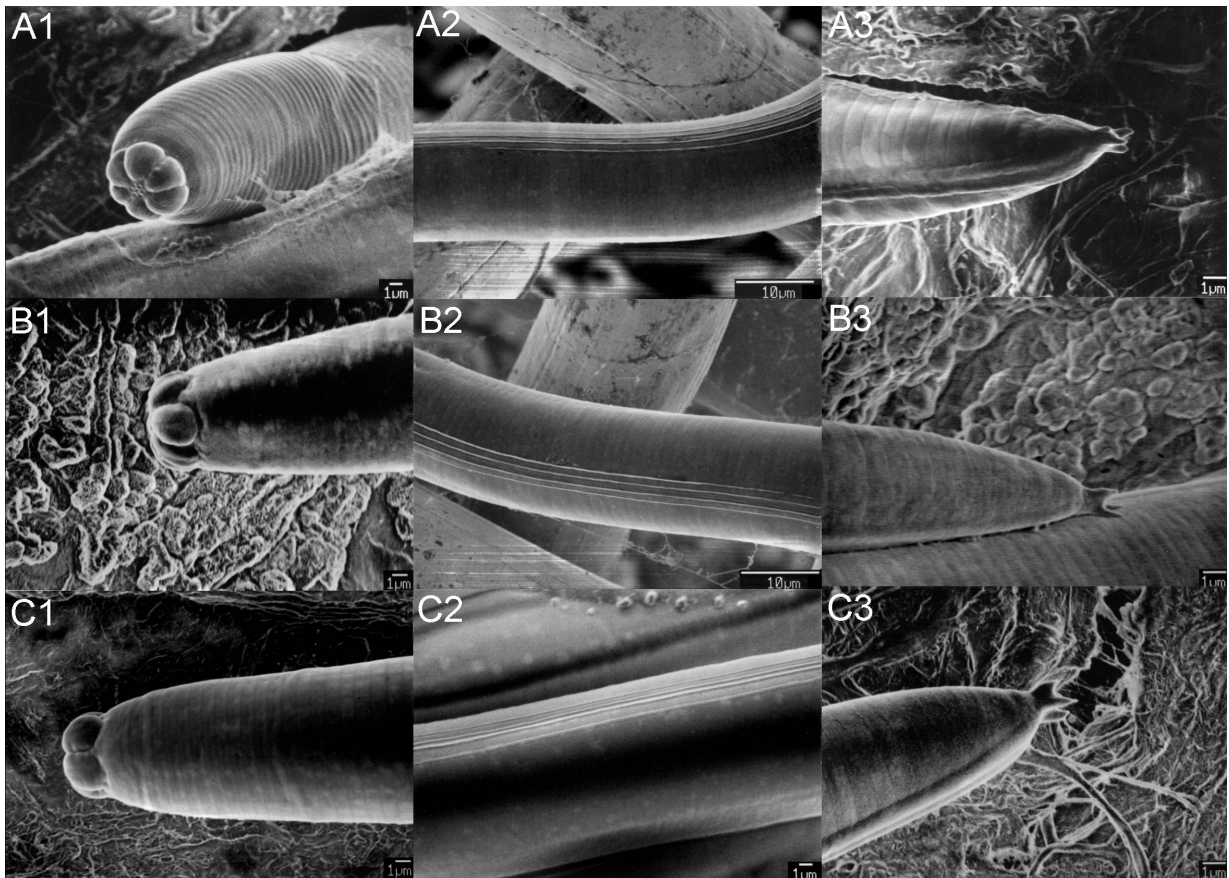
表二、葉芽線蟲依據 de Man's Formula 之形態測量值

Table 2. The body dimension of three populations of *Aphelenchoides* spp. (As, Ac and Ab) and on population of *A. besseyi*¹

Items	As		Ac		Ab		<i>Aphelenchoides besseyi</i>	
	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males
L(mm)	0.61-0.83	0.47-0.71	0.64-0.84	0.44-0.69	0.66-0.83	0.45-0.72	0.57-0.84	0.53-0.61
K(mm)	0.02	0.019	0.021	0.02	0.021	0.019	—	—
a	42.4-57.2	38.4-47.3	44.2-53.5	39.2-47.1	42.7-54.7	39.4-49.8	39-53	40.7-46.9
b	11.5-13.7	8.9-11.8	8.8-13.1	9.1-12.6	9.2-10.7	8.9-11.3	9.2-13.1	8.87-10.70
c	15.3-18.4	15.1-18.7	13.8-19.9	14.3-18.7	15.2-20.1	14.7-19.4	13.8-20.4	16-20
V(%)	65.5-71.0	—	67.2-70.1	—	66.9-72.5	—	68.7-73.6	—
T(%)	—	46.3-64.7	—	50.1-65.8	—	44.3-52.9	—	28-52
S1(mm)	—	0.012-0.018	—	0.016-0.021	—	0.014-0.020	—	0.018-0.021
S2(mm)	0.012-0.014	0.010-0.013	0.011-0.013	0.010-0.012	0.011-0.014	0.010-0.012	0.010-0.013	0.010-0.013

¹ Data are means of 50 nematodes measured by the de Man's Formula. As: nematode isolated from fern at San-Shia; Ac: nematode isolated from fern at Chia-Yi; Ab: nematode isolated from strawberry at Da-Hu; and the body dimension of *A. besseyi* measured by Fortuner in 1970⁽¹²⁾

² L = total body length; K = the maximum body width; a = total body length divided by the maximum body width; b = total body length divided by the distance from the lips to the base of the esophageal glands; c = total body length divided by the length of the tail, measured; from the anus to the tail tip (terminus); V = distance of the vulva from the anterior end divided by the body; length and then multiplied by 100 to yield a percentage. ; T = length of the testis as a percentage of body length; S1 = length of the spicule; S2 = length of the stylet.



圖三、以掃描式電子顯微鏡觀察線蟲之側區形態特徵。

Fig 3. SEM micrographs of nematodes. A) *Aphelenchoides besseyi* isolated from strawberry. B) A nematode isolated from fern in San-shia. C) A nematode isolated from fern in Chia-yi. A1, B1, C1: head region; A2, B2 and C2: lateral field; A3, B3 and C3: tail.

接種潛勢測定

不同接種源濃度的 As 及 Ac 對山蘇花葉芽線蟲病害發病之影響結果如表一所示，每毫升 500 隻線蟲以上之接

種源濃度始可成功感染山蘇花，在第二週之後，葉片上逐漸出現褐化病徵。第三週之後，山蘇花葉片全數罹病。對照組接種源 Ab 無法成功感染山蘇花造成病徵，且線蟲無法在葉片中存活超過三週。接種後 3-4 週，葉片內線蟲數

量有稍微增加之趨勢，而 2-3 個月後，線蟲數量則隨著葉片嚴重罹病導致乾枯死亡而大量減少。

病原線蟲的形態鑑定

(一) 病原線蟲之光學形態觀察與測量

依據 de Man's formula, As、Ac 與 Ab 的測量值(如：體長、最大體寬、體長/最大體寬、體長/頭部至食道與腸交接處、體長/尾長、雌蟲頭部至陰門長/雌蟲體長 x100%、雄蟲精巢長度/雄蟲體長 x100%、交接刺長及口針長)範圍上並無明顯差異(表二)，而文獻中記載 *Aphelenchoides* 屬線蟲的型態測量值範圍亦有許多重疊相似之處⁽¹²⁾，因此以光學型態測量值的方法並不容易區別出種間的差異。

(二) 病原線蟲之掃描式電子顯微鏡型態觀察

As、Ac 與 Ab 的主要的鑑定依據包括頭部型態(稍有突起)、側區的側線數目(4條)與尾部分岔數目(3-4個分叉)均一致(圖三)，因此依據形態可以確定其種的分類地位，三者皆為 *Aphelenchoides besseyi*。

溫度對本病原線蟲繁殖之影響

本病原線蟲在真菌 *Alternaria citri* 上繁殖良好，培養一週後發現 As、Ac 與 Ab 在 24°C 時線蟲族群密度均出現最大值。生長溫度範圍為 8- 32 °C，20-28°C 為較佳之生長適溫，在低於 4°C 與高於 36°C 的溫度條件下，此三種線蟲均無法存活(圖四)。在溫度 24°C 以上時，Ab 的繁殖能力則略優於 As 及 Ac，推測因其寄主來源不同而影響其生理上的些微差異。

病原線蟲之殘存能力

殘存試驗的結果發現，As 與 Ac 在不添加山蘇花葉片的情況下，土壤中的線蟲數量 1-3 週時急速降低，在四週後幾乎無法分離到線蟲。而添加山蘇花葉片的處理中，線蟲的存活情形明顯優於未添加者，在三個月後仍可分離到少量線蟲。Ab 的殘存試驗結果中，添加山蘇花葉片的處理，線蟲數量稍高於未添加者(約 4:3)，而兩種處理在三週後僅能分離出非常少量的線蟲(少於 13 隻)(表四)。

寄主範圍測試

As、Ac 與 Ab 均可成功感染水稻及草莓植株，並在三至四週後出現病徵；As 及 Ac 亦可感染山蘇花、非洲堇、秋石斛，而 Ab 則無法成功感染。兩週後罹病的山蘇花葉片上開始出現水浸狀斑點，而後轉為黑褐色，病斑部位之葉片組織並逐漸乾枯死亡。非洲堇罹病之後，一週內可見褐色斑點出現，初為褐色的針狀小點，而後病斑逐漸擴大呈不規則狀發展，葉片有壞疽腐爛現象，兩週後整葉

表三、不同種類葉芽線蟲之生長適溫

Table 3. Optimum growth temperature of four species of *Aphelenchoides* spp.

Species	Optimum temperature	Reference
<i>A. besseyi</i> ¹	23-30 °C	Huang <i>et al.</i> (1972) ⁽¹⁷⁾
<i>A. besseyi</i> ²	20-28 °C	王等 (1993) ⁽¹⁾
<i>A. besseyi</i> ³	20-28 °C	Authors (Yu and Tsay)
<i>A. composticola</i>	20 °C	Cayrol (1967) ⁽⁹⁾
<i>A. fragariae</i>	≤18 °C	Strümpel (1967) ⁽²⁴⁾
<i>A. ritzemabosi</i>	14-23 °C	Wallace (1960) ⁽²⁶⁾ ; French and Barraclough (1961) ⁽¹³⁾

¹ *A. besseyi* isolated from rice.

² *A. besseyi* isolated from strawberry.

³ *A. besseyi* isolated from fern.

表四、山蘇花葉芽線蟲之殘存能力

Table 4. Survive of foliar nematodes (*Aphelenchoides* spp.) in soil¹

Weeks after inoculation	As ²	Ac ²	Ab ²
	Number of foliar nematodes (Treatment: soil+leaf / soil only) ³		
1	119 ¹ /113	223/152	92/76
2	125/47	112/86	21/16
3	23/12	27/11	9/2
4	11/0	8/0	1/0
8	6/1	3/0	0/2
12	13/0	9/1	0/0
24	0/0	0/0	0/0

¹ In each treatment, 500 nematodes were dripped into soil in pot (200g soil per pot). Numbers in each pot were examined at 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 weeks after inoculation periodically.

² As: nematode isolated from fern in San-shia; Ac: nematode isolated from fern in Chia-yi; Ab: nematode isolated from strawberry in Da-Hu.

³ soil+leaf : soil with 10g fern leaf pieces; soil only : soil without fern leaf pieces.

表五、供試葉芽線蟲之寄主範圍

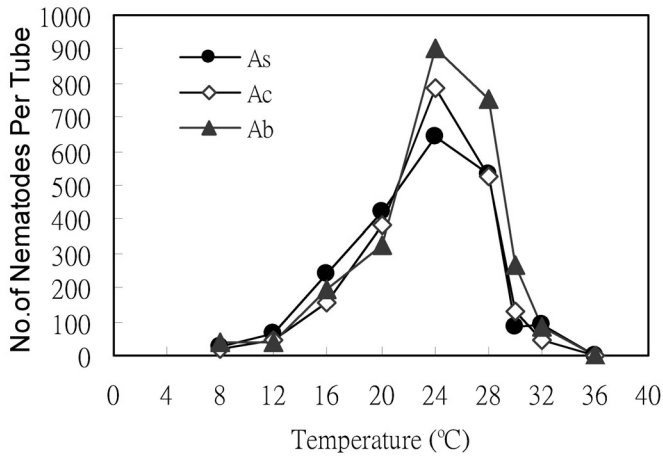
Table 5. Host range of foliar nematode

Name of plant ¹	Common name	Foliar nematode		
		As ²	Ac ²	Ab ²
<i>Asplenium nidus</i> L.	fern (台灣山蘇花)	+ ³	+	-
<i>Lilium formosanum</i> A.	Taiwan lily (台灣百合)	-	-	-
<i>Fragaria glandigloria</i> Ehrn.	strawberry (草莓)	+	+	+
<i>Oryza sativa</i> L.	rice (水稻)	+	+	+
<i>Saintpaulia ionantha</i> H.	African violet (非洲堇)	+	+	-
<i>Begonia semperflorens</i> L.	begonia (秋海棠)	-	-	-
<i>Dendrobium phalaenopsis</i> Hort.	bailey (秋石斛)	+	+	-

¹ Nematodes were dripped into the bud of strawberry and leaf sheath of rice, and were injected into leaves of Fern, African violet, Begonia, Bailey, and bulbs of Taiwan lily respectively.

² As: nematode isolated from fern in San-shia; Ac: nematode isolated from fern in Chia-yi; Ab: nematode isolated from strawberry in Da-Hu.

³ + : infection; - : non-infection



圖四、溫度對葉芽線蟲族群密度之影響 (試管培養)
Fig 4. Effect of temperature on the population of *Aphelenchoides besseyi*.

Twenty foliar nematodes were transferred onto slant culture of *Alternaria 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. As: nematode isolated from fern in San-shia; Ac: nematode isolated from fern in Chia-yi; Ab: nematode isolated from strawberry in Da-Hu.

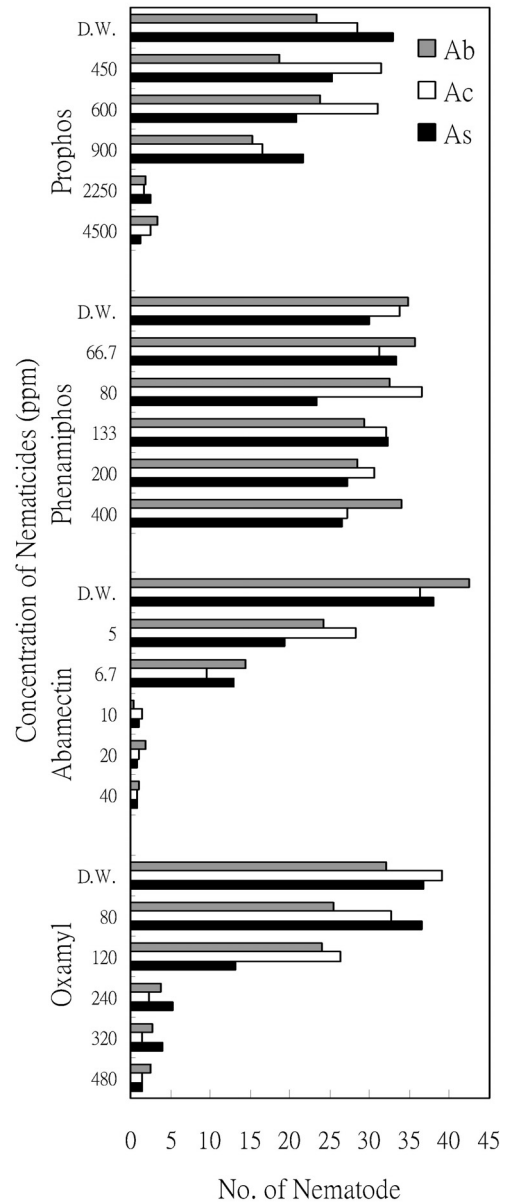
腐爛脫落。秋石斛約在兩週後出現水浸狀病斑，呈壞疽腐敗現象，罹病葉片漸轉為黃褐色，隨即脫落。本試驗中 As、Ac 與 Ab 均無法成功感染百合及秋海棠 (表五)。

藥劑試驗

As、Ac 與 Ab 分別處理不同稀釋濃度的四種供試藥劑 24 小時後，以無菌水漂洗三次，靜置 24 小時後觀察線蟲之存活情形發現多數線蟲仍呈靜止狀態，但並未死亡，以拉細之玻璃吸管輕觸蟲體，仍可發現其微弱的活動力。第三天觀察，多數麻痺的線蟲已恢復活力，處理藥劑者活動力明顯降低，此時計算活蟲與死蟲的數量，以無菌水處理之對照組線蟲存活率在 70-80%。歐殺滅 (Oxamyl)、阿巴汀 (Abamectin) 及普伏松 (Prophos) 在推薦濃度下均能夠有效抑制病原線蟲，活蟲數量低於 10%。芬滅松 (Phenamiphos) 則未能有效抑制線蟲，活蟲比例與對照組無差異。一週後再次觀察所有藥劑處理之線蟲，則大多數線蟲已死亡，無菌水對照組之存活率為 15% (圖五)。

討論

根據農委會中部辦公室市場的調查顯示，山蘇蕨葉每公斤價格約在新台幣 200 元左右，隨季節及市場需求而有變化。山蘇花罹本病害後，葉片上褐色病斑隨時間逐漸擴大至整片葉片，嚴重者造成葉片乾枯死亡，使植株喪失觀賞價值，嫩葉罹病導致無法採收作為蕨葉蔬菜，造成農民損失。



圖五、不同殺線蟲劑對葉芽線蟲存活率的影響
Fig 5. Effect of nematocides on the control of *Aphelenchoides besseyi*.

For each concentration of each nematocides, fifty nematodes were soaked in 2 ml nematocides for 24 hours, washed for three times with distilled water (D.W.), and counted the number of survival nematodes. As: nematodes isolated from fern in San-shia. Ac: nematodes isolated from fern in Chia-yi. Ab: nematodes isolated from strawberry in Da-Hu.

本病害之病斑依葉脈走向而發展，組織染色的結果亦發現線蟲的分佈位置通常靠近主葉脈周圍，推測葉芽線蟲感染山蘇花時，在葉片內隨著葉脈中的水分移行。從田間觀察發現栽培環境的溼度條件亦影響病斑的發展速度，乾燥情況下病斑的發展明顯較潮濕環境者慢，因此水分為山蘇花葉芽線蟲發病速度之重要影響因子。此外，葉片發病末期常出現半側完全枯萎而另一側卻依舊健康翠綠的現象，表示線蟲無法順利跨越中間主脈而感染另一半邊的葉

片，最後隨葉片乾枯而死亡，推測本病原線蟲在山蘇花葉片內主動的移行能力並不高。接種源潛勢的測試結果顯示，能成功侵入山蘇花葉片並順利存活的線蟲比例非常低，可能是大量線蟲同時在一定空間與食物源的競爭下所造成。

由於 *A. besseyi* 與 *A. fragariae* 兩者主要的形態差異在於口唇部、側區的側線數目及尾部分岔數，*A. besseyi* 頭部稍有突起而 *A. fragariae* 則否，前者側線數為 4，而後者為 2，*A. besseyi* 尾部有 3-4 個分叉，*A. fragariae* 尾部則不分叉⁽⁷⁾。病原線蟲的形態鑑定結果可以確定在本省危害山蘇花之葉芽線蟲為 *A. besseyi*，非文獻上記載引起山蘇花葉芽線蟲病害的 *A. fragariae*⁽²⁴⁾。

溫度試驗中之 As 與 Ac 生長溫度範圍與其最適宜繁殖溫度均與文獻中 *A. besseyi* 一致，而有別於 *Aphelenchoides* 的其他種植物寄生性線蟲，如 *A. composticola*、*A. fragariae* 及 *A. ritzemabosi* (表三)。

在管理良好的溫室栽培環境下，並未發現罹病葉片上之線蟲可以主動感染鄰近葉片的現象，因此本病害在田間的傳播途徑有可能是栽培園裡山蘇花種植過於密集，葉片相互磨擦及園中的潮濕環境，提供了病原線蟲良好的發病條件。農民在園中走動、修剪時造成的傷口，與栽培園中常出現的非洲大蝸牛爬行與啃食葉片造成之傷口，亦可成為線蟲傳播之途徑及侵入葉片的管道。葉芽線蟲的寄主範圍相當廣泛⁽²²⁾，畦溝雜草及園中其他作物亦可能成為葉芽線蟲之寄主，因此預防本病害之發生與散佈，田間衛生與管理為不可忽視的工作。藥劑試驗中，芬滅松 (Phenamiphos) 為滲透系統性殺線蟲劑，多施用於土壤中經根部吸收後向上移行，噴灑葉片則未能達到良好殺蟲效果，因此直接浸泡藥劑的觸殺效果不如其他觸殺性藥劑。然山蘇花之栽培除供觀賞外，亦為食用之蕨葉蔬菜，要除去葉片內之線蟲，農藥的使用上必須相當謹慎，若要施用於山蘇花植株上，則必須先行評估其藥害及殘留劑量方能安心使用。

文獻上並未有 *A. besseyi* 能夠感染山蘇花的記載⁽¹⁴⁾，因此在台灣發生此種感染現象的原因值得深入的探討。文獻記載 *A. fragariae* 於山蘇花上之寄生方式為內寄生⁽²³⁾，而本省感染草莓及水稻之 *A. besseyi* 在大部分之生活史中皆以外寄生方式危害植物⁽¹⁴⁾，因此 *A. besseyi* 在本省能夠感染山蘇花不僅是一個新寄主之發現，其寄生行為之進化現象更具實質意義。

儘管本研究中證實感染台灣山蘇花造成葉斑病之病原線蟲為 *A. besseyi*，自草莓上分離的 *A. besseyi* 卻無法成功感染山蘇花，其寄主測試結果雖大致相同，但仍有些許差異，推論其原因可能是線蟲需要一段時期的演化，改變其生理及取食特性以適應 (adaptation) 新的寄主⁽²⁰⁾。

生物常因地理來源及習性的不同，導致種內出現變異族群，而在形態、生理或生態上的表現有所差異⁽¹¹⁾，此種

變異的現象同樣發生在病原微生物上，稱之為生物小種 (biological race)，通常為寄主小種 (host race)，在形態上相同或僅有微小差異，生物學上則定義為取食特性 (food preference) 之差異⁽²⁵⁾。18 世紀末，線蟲學家在莖線蟲 *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 上發現不同寄主來源的線蟲表現出不同之寄主選擇性 (host preference)，並在病原性的表現上有所差異⁽²⁵⁾，這些經由長期演化而產生的種內變異族群包括生物或生理小種 (biological or physiological race)、生物型 (biotype)、病原型 (pathotype) 及生物品系 (biological strain) 等，然而這些名詞之定義在線蟲學界仍有諸多異議⁽²⁵⁾。植物寄生性線蟲之生物小種 (biological race) 因其種類、寄生方式、寄主範圍、作物耕作方式及地理分布情形而異⁽⁶⁾。儘管在許多線蟲種類上已有諸多報告記載其生理小種的出現，然而目前全球尚未有文獻記載有關於 *A. besseyi* 生物、生理小種或病原型的直接證據。因此本研究之結果僅保守朝演化的方向解釋其寄生行為的轉變，未將其歸類為一新的生物小種。

由於 *A. besseyi* 寄主範圍相當廣泛，難以傳統的寄主範圍區分法來鑑別屬內之小種。此外，在國外已有多篇報告利用分生技術做為根瘤線蟲及包囊線蟲的分類依據，利用限制酵素分析方法能夠鑑別至種的分類地位⁽¹⁵⁾，而利用 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 之技術已能鑑別至小種的分類地位⁽⁸⁾。有關葉芽線蟲以分生技術鑑定之報告儘區分至種之分類地位，1994 年 Ibrahim 等人以 SDS-PAGE 分析酵素以及脂酶的結果可以區分出此三個水稻寄生線蟲的種，*Aphelenchoides besseyi*、*A. nechaleos* 與 *A. paranechaleos*⁽¹⁸⁾。雖然葉芽線蟲的分生研究背景仍然相當缺乏，不過亦可嘗試以此方法來找出不同族群在分生特性上的差異，藉以輔助其他形態或生理特性上的鑑別。

謝辭

本文中形態鑑定部分，承霧峰農業試驗所石信德、謝廷芳先生，農業藥物毒物試驗所蘇秋竹與李祈益先生提供掃描式電子顯微鏡相關儀器及指導，特致謝忱。

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. 林仲剛. 1992. 台灣蕨類植物的認識與園藝應用. 國立自然科學博物館出版. 台中. 124 pp。
3. 林奕耀. 1982. 線蟲研究. 行政院科技顧問組植保聯繫協調小組報告. 319-339 pp。
4. 郭克忠、李祈益. 2000. 低溫場放射掃描式電子顯微鏡

- 在生物學上的應用. 科儀新知 21:60-65。
5. 黃焯雄、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。
 6. 蔡東纂. 1998. 植物寄生性線蟲之演變. 植病會刊 7:1-9。
 7. Allen, M.W. 1952. "Taxonomic status of the bud and leaf nematodes related to *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1891)." Proc. Helminth. Society of Washashington. 19: 108-120.
 8. Carpenter, A.S., Hiatt, E. E., Lewis, S. A. and Abbott, A. G. 1992. Genomic RFLP Analysis of *Meloidogyne arenaria* Race 2 Populations. J. Nematol. 24: 23-28.
 9. Cayral, J. C. 1967. Etude du cycle evolutif d'*Aphelenchoides composticola*. Nematologica 13: 23-32.
 10. de Man, J. G. 1884. Die einheimischen, frei in der reinen Erde und im süßsen Wsasser lebenden Nematoden. Tijdschr. Ned. Dierk. Ver. 5: 1-104.
 11. Docharme, E. P. and Birchfield, W. 1956. Physiologic races of burrowing nematode. Phytopathology 46: 615-616.
 12. Fortuner, R. 1970. On the morphology of *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 and *A. siddiqii* n.sp. (Nematoda: Aphelenchoidea). J. Helminthol. 44:141-152.
 13. French, N. and Barraclough, R. M. 1961. Observations on the reproduction of *Aphelenchoides ritzemabosi* (Schwartz). Nematologica. 6: 89-94.
 14. 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.
 15. Gárate, T., Robinsón, M. P., Chacón, M. R. and Parkhouse, R. M. E. 1991. Chracterization of Species and Races of the Genus *Meloidogyne* by DNA Restriction Enzyme Analysis. J. Nematol. 23:414-420.
 16. Goodey, J. B., Franklin, M. T., & Hooper, D. J., 1965. T. Goodey's The nematode parasites of plants catalogued under their hosts. Commonw. Agric. Bur.
 17. 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.
 18. 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. Journal of Nematology 26: 412-421.
 19. Ikonen, E. K. 2001. Population growth of two aphelenchid nematodes with six different fungi as a food source. *Nematology: International Journal of Fundamental & Applied Nematological Research*. 9-15 pp.
 20. Maggenti, A. R. 1987. Adaptive Biology of nematode Parasites. Pages 188-195 in: Veech, J. A., and Dickson, D. W. eds. Vistas on Nematology. A Commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologists. Society of Nematologists, Inc.
 21. Mai, W. F. and Lyon, H. H. 1975. Pictorial key to genera of plant-parastic nematodes. Fourth edition revised. Ithaca & London: Comstock Publishing Associates, Cornell Univ. Press. 15 pp.
 22. Malcolm, C. S. and Charles, W. A. 2000. Diagnosing plant diseases caused by nematodes. Chap. 2. Methods. 21 pp. Averte III. St. Paul, MN, APS Press.
 23. Siddiqi, M. R. 1975. *Aphelenchoides fragariae*. Descriptions of Plant-Parasitic Nematodes, Set 5, No. 74. Commonwealth Institute of Helminthology, St. Albans, England.
 24. Strümpel, H. 1967. Beobachtungen zur Lebensweise von *Aphelenchoides fragariae* in the Lorraine-Begonien. Nematologica. 13: 67-72.
 25. Sturhan, D. 1971. Biological race. Plant parasitic nematodes. Pages 51-72 in: Vol.2. Cytogenetics, Host Parasitic Interactions, and Physiology. Zuckerman, B. M., Mai, W. F. and Rohde, R. A. eds. Academic Press. New York.
 26. Wallace, H. R. 1960. Observations on the behavior of *Aphelenchoides ritzemabosi* in Chrysanthemum leaves. Nematologica. 5: 315-321.

ABSTRACT

Yu, P. C.¹ and Tsay, T. T.^{1,2} Occurrence of a foliar nematode disease of fern in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 13: 35-44. (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; ² Corresponding author, E-mail: tttsay@mail.nchu.edu.tw, Fax : +886-2-22876712)

Aphelenchoides fragariae (Ritzema Bos, 1891) Christie, 1932, was reported to be a pathogenic species of nematode, causing the disease on fern, but it was not found in Taiwan. In 2000, a new disease on fern was first found in gardens at Chia-Yi and by isolation and identification, it was proven to be a disease caused by foliar nematode --- *Aphelenchoides* spp. The nematode population was maintained by growing on *Alternaria citri*. The range of growth temperature for the nematode was 8 to 32 °C, with the optimal temperature range of 20 to 28 °C. Nematodes in diseased leaves on the ground could survive for three months. Results of morphological studies by scanning electron microscopy showed that the fern disease in Taiwan was caused by *Aphelenchoides besseyi*. The body dimension was similar among the three populations of *A. besseyi* collected from strawberry and fern plants in San-Shia and Chia-Yi, respectively. *A. besseyi* from fern plants was pathogenic on other hosts such as rice, strawberry, Africa violet and bailey, but it was non-pathogenic on lily and begonia. However, *A. besseyi* from strawberry was non-pathogenic on fern plants. Application of nematicides Oxamyl, Abamectin or Mocap was effective in reducing 10% of nematode population, but application of Phenamiphos was ineffective. This is the first report of the fern disease caused by *A. besseyi* in Taiwan. The occurrence of this disease in Taiwan might be the sign of adaptation during the nematode evolution process.

Key words: foliar nematode, fern, identification, biological race