

내부기생성선충 *Pratylenchus vulnus* 분리 효율 비교

허성찬¹, 박남숙², 전재용³, 전명승⁴, 강헌일^{5,6}, 최인수^{5,6*}

¹부산대학교 생명자원과학대학 식물생명과학과, 대학원생, ⁵교수, ²부산대학교 생명자원과학대학 생명산업융합연구원, 연구원, ⁶교수, ³농림축산검역본부 식물검역부, 연구관, ⁴농림축산검역본부 인천공항지역본부, 연구원

Comparison of Extraction Efficacy for Endoparasitic Nematodes *Pratylenchus vulnus* from Roots

Sungchan Huh¹, Namsook Park², Jaeyong Chun³, Myoungseung Jeon⁴, Heonil Kang^{5,6} and Insoo Choi^{5,6*}

¹Graduate School Student and ⁵Professor, Plant Bioscience, College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

²Researcher and ⁶Professor, Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

³Senior Researcher, Department of Plant Quarantine, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

⁴Researcher, Incheon International Airport Regional Office, Animal and Plant Quarantine Agency, Incheon 22382, Korea

Abstract - To speed up the extract of endoparasitic nematodes from roots, four extraction methods with or without root-grinding were compared; 1) immersion, 2) immersion + Air, 3) Oostenbrink dish, and 4) Mistifier. The experiments were conducted for nine days by using perilla roots infested with *Pratylenchus vulnus*. Root-lesion nematodes continuously extracted from perilla roots during the experiments and as much as 3-10% in 9th days. The total number of nematodes extracted from 2 g of perilla root in nine days were varied among methods (379-1,824 nematodes); the most nematodes were extracted by root grinding + immersion + air (1,824) and the root-grinding + mistifier method (1,349) ($p = 0.05$). In the first two days of extraction, root-grinding + mistifier extracted the most nematodes (725 nematodes), followed by root-grinding + immersion + Air (555 nematodes), and root-grinding + Oostenbrink dish (421 nematodes). Root-grinding effected as much as 16-108% more nematodes extraction when compared to without root-grinding ($p = 0.01$).

Key words – Endoparasitic nematode, Mistifier, Nematode extraction, Oostenbrink dish, Root-grinding method

서 언

뿌리썩이선충(*Pratylenchus* spp.)은 전 세계적으로 분포하고 있으며, 식물기생성선충 중에서 뿌리혹선충 다음으로 작물에 많은 피해를 주는 선충이다(CDFA, 2021). 뿌리썩이선충은 이동성 내부기생성선충으로 뿌리 내부에서 대부분의 생활사를 보내며, 주요 작물인 콩, 감자, 옥수수, 바나나, 밀 그리고 양배추 등을 포함한 350종 이상의 작물에 기생성을 가진다(Geraert, 2013; Qing *et al.*, 2019). 국내의 경우 최근 논과 밭 뿐만 아니라 논둑에서도 뿌리썩이선충이 발견되었으며, 이는 뿌리썩이선충

에 큰 피해를 입는 국내 주요 작물인 벼, 콩, 들깨 팔에서 높은 감염률을 나타내고 있다(Park *et al.*, 2022). 뿌리썩이선충의 피해는 농민의 경우 그 피해를 구분하기 힘들며, 뿌리썩이선충은 뿌리혹선충과 달리 뿌리에 혹이 생기지 않음으로 선충의 감염 여부를 확인하기 위해서는 뿌리로부터 뿌리썩이선충을 분리하여 현미경으로 검사하여야 한다.

내부기생성 선충의 분리방법은 직접 검사법, 깔데기법(Baermann, 1917), 깔데기법을 응용한 오스텐접시법(Oostenbrink dish)(Chawla and Prasad, 1975; Oostenbrink, 1954, 1960; Whitehead and Hemming, 1965), 뿌리 침지법(Tarjan, 1960; Young, 1954), 미스트장치(Seinhorst, 1950), 뿌리 파쇄+체법, 뿌리 파쇄+원심분리법(Coolen *et al.*, 1971; Seinhorst, 1988), 효소를 이용한 선충 분리법(Araya and Caswell-Chen,

*교신저자: E-mail ichoi@pusan.ac.kr

Tel. +82-55-350-5692

© 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1993; Viaene *et al.*, 2007) 등 다양하다.

Chapman (1957)은 물속에 공기를 공급하여 분리효율을 높이는 방법을 보고하였으며, Prot *et al.* (1993)은 뿌리를 믹서기로 파쇄 후 선충을 분리하면 선충 분리 효율이 높아진다고 하였고, Gowen and Edmunds (1973)는 깔데기법에 hydrogen peroxide와 파쇄법을 접목하였다. 내부기생성선충의 분리 효율은 분리방법, 분리기간, 표본의 양, 온도, 뿌리의 상태, 산소, 기주 종류 등 여러 가지 요인에 의하여 영향을 받으며(Hooper, 1986), 뿌리썩이선충은 분리방법에 따라 분리 19일째까지 뿌리로부터 계속 분리가 된다(Bhuiyan *et al.*, 2014).

매년 해외에서 국내로 재식용 식물인 묘목류, 구근류 등이 수천만 이상의 단위로 수입되며, 검역과정에서 검출되는 국내 미기록 뿌리썩이선충은 모두 규제대상이다. 재식용 수입식물 검역은 부패 등이 발생할 수 있는 생식물의 특수성과 통관 절차 등의 이유로 빠른 시간 내에 검역이 완료되어야 한다. 지금까지 뿌리썩이선충 분리 효율은 뿌리로부터 5일 이상 선충을 분리하여 분리효율을 판단하고 있으며, 초기 1~2일 이내의 분리 효율에 관한 연구는 적다. 따라서 본 연구는 내부기생성선충 분리에 가장 많이 사용되는 4가지 분리 방법을 서로 비교하고 여기에 뿌리파쇄법을 접목함으로써 그중에서 가장 활용성이 높으면서 초기에 선충이 높은 비율로 분리되는 방법을 찾고자 실시하였다.

재료 및 방법

뿌리썩이선충 채집

경상남도 밀양시 소재의 농가포장에서 뿌리썩이선충(*Pratylenchus vulnus*)에 자연적으로 감염된 들깨 뿌리를 채집하여 실험을 진행하였다. 채집된 뿌리는 물로 잘 세척하여 뿌리 이외의 이물질을 제거하였다. 실험에 사용될 뿌리의 무게 및 밀도를 같게 하고자 굵은 뿌리를 제외한 곁뿌리를 전지가위로 0.5 cm 길이로 잘게 절단하였다(Choi *et al.*, 2022). 절단한 뿌리는 모두 균일하게 혼합 후 그중 임의로 2 g을 취하여 선충 분리 실험에 사용하였으며, 실험은 3반복으로 진행하여 그 평균값을 산출하였다.

선충 분리 방법

선충분리는 1) 뿌리 침지 분리, 2) 뿌리 침지+산소공급 분리, 3) 오스텐접시 분리, 4) 미스트장치 등 4가지로 하였고, 여기에 각각 뿌리를 그냥 분리하는 방법과 뿌리를 파쇄하여 분리하는

방법을 추가하여 총 8처리로 하였다. 각 처리별로 24시간마다 선충을 분리하여 밀도를 조사하였으며, 선충을 9일간 분리하였다. 뿌리파쇄는 가정용 믹서기(CB100-KRCO, Shark ninja, Massachusetts)를 이용하였고, 뿌리 2 g에 물 40 ml를 추가하여 약 10초간 고속으로($\pm 12,000 \text{ rev min}^{-1}$) 파쇄하였다(Choi *et al.*, 2022).

뿌리 침지 분리법에서는 2리터 용량의 비이커에 물을 약 1 l를 넣고, 뿌리 2 g을 거름지(Kimtech KIMWIPES, 쌍용C&B, Korea)에 싸서 물통에 넣어 뿌리를 침지하였다. 뿌리 침지+산소공급 분리법의 경우 뿌리 침지는 전술한 뿌리 침지 분리법과 같이 준비하고, 여기에 공기 펌프(HIBLOW, HP-40, 0.03 kgf/m², air volume 40 l/min)를 이용하여 실험기간 동안 계속하여 물속에 산소를 공급하였다.

오스텐접시 분리법은 직경 15 cm 채반을 직경 19 cm 스테인레스 접시 위에 두고, 채반의 거름지 위에 뿌리 시료 2 g을 두어 물을 채운 후 선충이 밑으로 내려오도록 하는 방법으로 선충을 분리하였다.

미스트장치는 아크릴판을 사용하여 3층 구조로 제작되었으며(Fig. 2A), 분사노즐은 Sang-A사(Korea)의 LLDPE 튜브를 이용하였고, 노즐간 간격은 30 cm, 물 분사 양은 5분에 10초(9.5 ml/초/노즐)로 설정하였다. 분사노즐 밑에는 깔데기와 거름지를 두어 선충이 거름지를 통과할 수 있게 하였고, 그 아래층에는 플라스크를 두어 거름지를 통과한 선충이 모이게 하였다(Fig. 2B). 미스트 분사로 상층부의 깔데기에서는 선충이 지속적으로 아래로 내려오며, 실험자는 선충이 모여진 플라스크의 물을 매일 500 mesh 채로 걸러서 선충밀도를 조사하였다.

선충 조사

실험은 각 처리 간 3반복으로 수행하였으며, 총 9일간 조사하였다. 매일 각 처리마다 분리된 선충을 모아서 해부현미경(SZX2-ILLB, Olympus, Germany)으로 뿌리썩이선충의 밀도를 조사하였으며, 조사 후 각 처리에는 다시 물을 추가하였다.

시험성적 분석

각 처리별 선충 밀도 차이는 SAS GLM procedure와 Waller-Duncan k-ratio t test를 이용하여 분석하였다(SAS, Institute, Cary, NC; Helwig and Council, 1979). 각 일자별 선충 밀도의 백분율은 처리 중 가장 높은 밀도(1,824 마리)를 기준으로 하루에 추출한 선충 밀도의 비율로 계산하였다(들깨뿌리 2 g).

결 과

들깨 뿌리 2 g으로부터 9일간의 분리된 뿌리썩이선충 최종 밀도는 각 처리별로 379~1,824 마리로 처리간에 4.8배의 큰 차이가 있었다. 선충이 많이 분리된 처리는 뿌리 파쇄+침지+공기주입(1,824마리) 처리와 뿌리 파쇄+미스트장치(1,349마리)였고(p = 0.05), 가장 선충이 적게 분리된 처리는 뿌리 비파쇄+침지 처리로 379 마리였다(Table 1). 이 결과로 미루어 보아 뿌리썩이선충은 선충의 분리 방법에 따라 분리 효율에 큰 차이가 있다는 것을 알 수 있다.

이 경우 뿌리썩이선충은 들깨 뿌리로부터 9일까지 계속 분리되었으며, 1일째에 4~39%, 2일째에 10~28%, 3일째에 8~30%가 분리되었으며, 9일째에도 전체 선충의 3~10%가 분리되었다(Table 1, Fig. 1). 1일째 뿌리썩이선충이 가장 많이 분리된 처리는 뿌리 파쇄+미스트장치(528 마리, 39%)였고, 가장 적게 분리

된 처리는 비파쇄+오스텐접시법(32 마리, 4%), 비파쇄+침지+공기주입(48 마리, 5%), 비파쇄+미스트장치(53 마리, 5%)였으며, 분리된 선충의 차이는 16배로 큰 차이가 있었다(p = 0.05) (Table 1, Fig. 1). 2일째 뿌리썩이선충이 가장 많이 분리된 처리는 뿌리파쇄+오스텐접시법(272마리, 28%)이었고, 가장 적게 분리된 처리는 비파쇄+침지(37 마리, 10%)였다(p = 0.05) (Table 1, Fig. 1). 3일째 가장 많은 뿌리썩이선충이 분리된 처리는 뿌리 파쇄+침지+공기주입(544 마리, 30%) 처리였다 (Table 1).

사전 뿌리 처리 방법을 비교한 결과, 뿌리를 파쇄 후 분리한 방법이 파쇄하지 않고 분리한 방법보다 모든 분리방법에서 16~108%의 더 많은 수의 선충이 분리되었다(contrast analysis, p = 0.01) (Table 1, Fig. 1). 따라서 식물체 뿌리로부터 뿌리썩이선충을 효율적으로 분리하기 위해서는 뿌리를 믹서기로 파쇄한 후 분리하는 방법이 훨씬 분리 효율이 높다는 것을 알 수 있다

Table 1. Comparison of various methods for extraction of *Pratylenchus vulnus* from perilla roots.

Treatments ^z	Total number (%)	Number of <i>Pratylenchus vulnus</i> isolated in each day ^y (%)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
O-dish	- None	827 ab (100)	32 c (4)	117 bc (14)	181 b (22)	203 a (25)	75 ab (9)	75 (9)	48 ab (6)	43 ab (5)	53 (6)
	+ Grind	960 ab (100)	149 bc (16)	272 a (28)	101 b (11)	139 ab (14)	80 ab (8)	85 (9)	80 ab (8)	27 ab (3)	27 (3)
Beaker	- None	379 b (100)	91 bc (24)	37 c (10)	85 b (23)	32 b (8)	37 b (10)	43 (11)	11 b (3)	16 b (4)	27 (7)
	+ Grind	789 ab (100)	240 bc (30)	139 abc (18)	64 b (8)	85 ab (11)	59 ab (7)	69 (9)	16 ab (2)	59 ab (7)	59 (7)
Beaker +Air	- None	885 ab (100)	48 c (5)	96 bc (11)	176 b (20)	160 ab (18)	187 a (21)	112 (13)	37 ab (4)	32 ab (4)	37 (4)
	+ Grind	1,824 a (100)	331 ab (18)	224 ab (12)	544 a (30)	203 a (11)	187 a (10)	117 (6)	64 ab (4)	117 ab (6)	37 (2)
Mistifier	- None	1,005 ab (100)	53 c (5)	113 bc (11)	124 b (12)	155 ab (15)	128 ab (13)	117 (12)	59 ab (6)	155 a (15)	101 (10)
	+ Grind	1,349 a (100)	528 a (39)	197 ab (15)	128 b (9)	139 ab (10)	112 ab (8)	59 (4)	107 a (8)	27 ab (2)	53 (4)

Contrast analysis

Grind vs non-Grind ***

Data were average of three replications and nematodes were recovered every day from each treatment.

^zO-dish: Oostenbrink dish, Beaker: 2 liter beaker used to soak roots, Beaker+Air: Air (0.03 kgf/m³, air volume 40 L/min) provided in beaker, Mistifier: Built in lab to mist water 9.5 ml/sec/5 min, Grind: 2 g roots with 40 mL water were ground in home grinder for 10 seconds.

^yMeans followed by the same letter within column are not significantly different (P = 0.05) according to Waller-Duncan k-ratio t test. *** = significant at P < 0.001, respectively based on ANOVA.

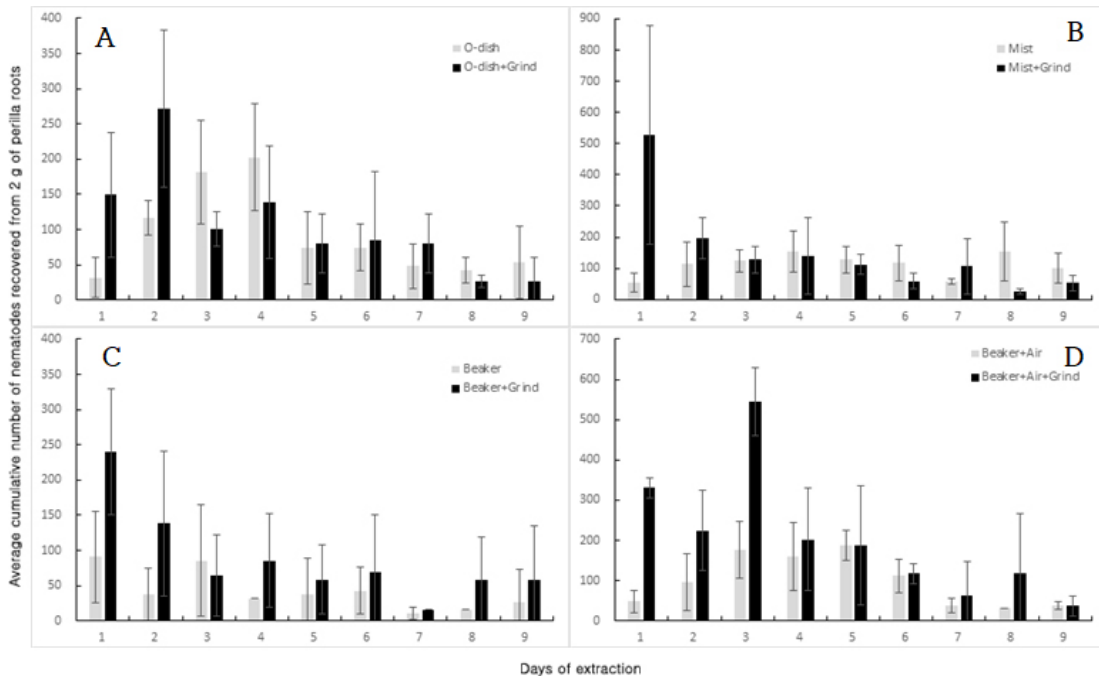


Fig. 1. Average cumulative numbers of *Pratylenchus vulnus* recovered from infected perilla roots with four extraction methods. A: O-dish (Oostenbrink dish); B: Mistifier; C: Beaker (2 liter beaker used to soak roots); D: Beaker+Air (Air provided in beaker); Grind: 2 g perilla roots with 40 mL water were ground in home grinder for 10 seconds. Each point represents the average of 3 replications.

Table 2. Comparison of percentages of extracted *Pratylenchus vulnus* from perilla roots.

Tretments ^z	By total numbers	Percent of <i>Prtylenchus vulnus</i> isolated in each day									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
O-dish	- None	45	2	6	10	11	4	4	3	2	3
	+ Grind	53	8	15	6	8	4	5	4	1	1
Beaker	- None	21	5	2	5	2	2	2	1	1	1
	+ Grind	43	13	8	4	5	3	4	1	3	3
Beaker+Air	- None	49	3	5	10	9	10	6	2	2	2
	+ Grind	100	18	12	30	11	10	6	4	6	2
Mistifier	- None	55	3	6	7	8	7	6	3	8	6
	+ Grind	74	29	11	7	8	6	3	6	1	3

Data were average of three replications and nematodes were recovered every day from each treatment.

^zO-dish: Oostenbrink dish, Beaker: 2 liter beaker used to soak roots, Beaker+Air: Air (0.03 kgf/m³, air volume 40 L/min) provided in beaker, Mistifier: Built in lab to mist water 9.5 mL/sec/5 min, Grind: 2 g roots with 40 mL water were ground in home grinder for 10 seconds.

(Table 1, Fig. 1).

이번 들깨 뿌리를 이용한 연구에서 1일차와 2일차의 합계에서 가장 많은 선충이 분리된 처리 순서는 뿌리 파쇄+미스트장치 (725 마리), 다음으로 뿌리 파쇄+침지+산소공급(555 마리), 뿌리 파쇄+오스텐접시법(421 마리) 순이었다. Table 2에서와 같

이 이번 처리 중 가장 높은 밀도(1,824마리)를 기준으로 각 처리 별 선충 밀도를 비율로 표시하였다. 1일차와 2일차의 합계에서 뿌리 파쇄+미스트장치(40%), 다음으로 뿌리 파쇄+침지+산소공급(30%), 뿌리 파쇄+오스텐접시법(23%), 뿌리 파쇄+침지 (21%) 순이었다.

고 찰

본 실험을 통해 1~2일차에 분리된 선충의 수가 뿌리를 파쇄하지 않는 방법보다 뿌리를 파쇄 후 분리한 방법에서 더 많이 나타난다는 것을 확인하였다. 이것은 뿌리를 믹서기로 파쇄했을 때 선충이 식물조직에서 더 빠져나오기 쉬워지기 때문으로 생각된다. 단, 뿌리를 파쇄하는 과정에서 선충이 피해를 입을 수 있으므로 시료의 종류와 내부기생선충의 길이에 따라서 시간의 조정이 필요하다. 이번 시험에서는 들깨 뿌리 2 g에 물 40 mL를 첨가하여 가정용 믹서기로 10초간, 파쇄하였는데 들깨 뿌리는 단단한 쪽에 속하며 뿌리의 상태(어린뿌리, 오래된 뿌리, 단단한 뿌리, 부드러운 뿌리 등)에 따라 파쇄 속도와 시간을 조정하여야 할 것이다. 예를 들어 수확이 끝난 시기의 벼 뿌리는 매우 부드럽고 약하고 벼 뿌리속의 뿌리썩이선충은 길이가 긴 편이므로(성충 = 2 mm) 가정용 믹서기로 10초간 파쇄하였을 때 선충이 손상하는 것으로 나타났다. 또한 뿌리의 상태나 단단함에 따라 믹서기의 속도를 조절해야 한다는 보고가 있으며, 긴 시간(120 sec) 뿌리를 파쇄하는 분리법보다 짧은 시간(15 sec) 뿌리를 파쇄하는 분리법이 분리되는 뿌리썩이선충(*Pratylenchus* spp.)의 수가 평균 0.53배의 차이로 파쇄시간이 길수록 분리되는 선충의 수가 줄어든다는 보고가 있어 선충을 추출하고자 하는 식물뿌리의 상태에 맞추어 10~20초 이내의 시간을 설정하여 파쇄를 진행하는 것이 뿌리 파쇄의 물리적 피해 때문에 발생하는 선충의 손상 정도를 최소화하고 파쇄된 뿌리에서 효율적으로 많은 수의 선충을 분리된다는 것을 시사한다(McSorley *et al.*, 1984; Van Bezooijen, 2006).

본 연구에서 매일 선충을 조사한 결과, 뿌리 파쇄한 후 미스트장치, 그 다음으로 뿌리 파쇄한 후 침지+산소공급에서 빠른 시간 내에서 많은 수의 선충이 분리되었다. 산소공급은 식물 내 부기생선충 분리에 중요한 요인으로, 실험이 진행되는 과정에서 산소공급의 일환으로 선충밀도를 조사한 후에 다시 새로운 물을 추가하였으므로 전체적으로 선충이 잘 분리되었을 것으로 사료되며 각 분리법의 산소공급 효율에 따라서 많은 수의 선충이 분리 되었다고 판단된다(Chapman, 1957). 따라서 미스트장치를 이용한 분리법(Fig. 2)은 산소공급이 용이하고, 식물체에서 생성된 독성물질 또한 제거되므로 단기간 분리뿐만 아니라 장기간 분리에서 다른 방법에 비하여 유리할 것으로 예상된다. 또한 식물 시료를 5일 이상 계속하여 분리할 경우, 오스텐접시는 매일 물을 교체해 주어야 하는 불편이 있는 반면에 미스트장치는 플라스크에 모인 선충만 모아주면 되므로 관리가 용이한 장점이 있는 것으로 나타났다.

수입식물검역에서 선충 검사는 생식물의 특성, 통관 절차 등의 특수성으로 신속한 결과 판정이 필요하다. 따라서 오랜 시간 동안 많은 밀도의 선충을 분리하는 것보다 짧은 시간 안에 선충을 효율적으로 분리하고 검역이 필요한 선충을 확인하는 것이 중요하다. 본 연구 결과 뿌리파쇄가 선충의 분리 효율을 높이는 것으로 나타났으므로 이를 적용하여 뿌리시료를 믹서기로 파쇄후 침지법, 오스텐접시법 혹은 미스트 장치로 선충을 분리하면 짧은 시간 내에 많은 밀도의 선충을 효율적으로 분리할 수 있을 것이다(Coolen *et al.*, 1971; Seinhorst, 1988). 그러나 검역시료의 경우 검사할 식물의 양이 1 kg 이상되는 경우도 있기 때문에 이처럼 많은 양을 모두 파쇄하는 것은 비효율적이다. 따라서 들

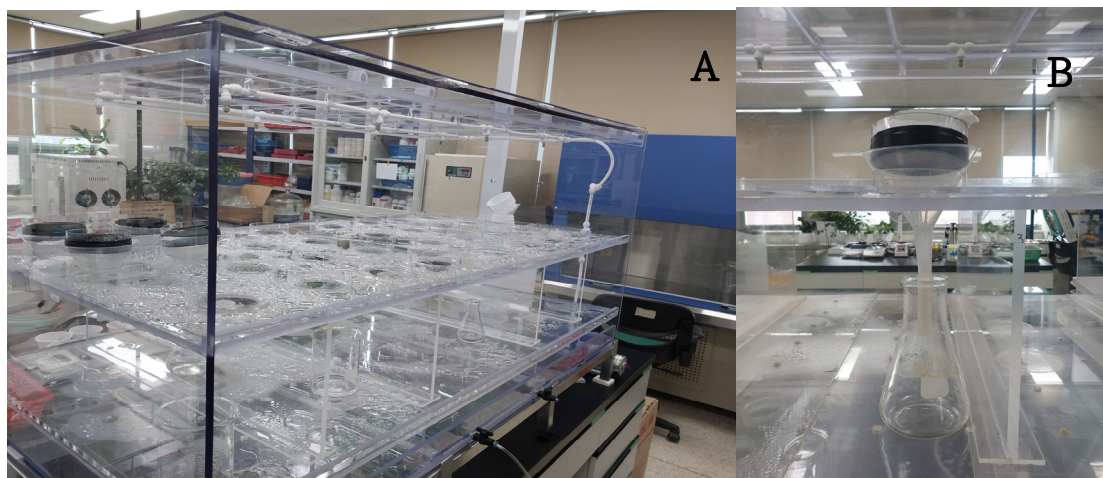


Fig. 2. Mistifier (A) and setup (B) at Nematode Extraction Assay Lab, Pusan National University (Choi *et al.*, 2022). A: Mistifier; B: funnel and flask for the separation of nematodes.

깨와 같은 단단한 뿌리를 가진 목본성 묘목류는 기존의 검역기법과 병행하여 뿌리가 썩은 부분을 일부를 채취하여 파쇄한 후 본 실험과 같은 방식의 미스트 장치를 이용한 깔대기법 혹은 침지, 오스텐접시법으로 내부기생선충을 분리하는 것이 효과적인 것으로 판단된다(Gowen and Edmunds, 1973; Prot *et al.*, 1993).

적 요

식물 뿌리로부터 내부기생성 선충을 단기간에 효율적으로 분리하기 위하여 1) 뿌리 침지 분리, 2) 뿌리 침지+산소공급 분리, 3) 오스텐접시 분리, 4) 미스트장치 등 4가지 분리방법과 뿌리 파쇄법을 접목하여 상호 비교하였다. 시험은 뿌리썩이선충 (*Pratylenchus vulnus*)에 감염된 들깨뿌리를 이용하였고, 9일간 선충을 분리하였다. 뿌리썩이선충은 들깨 뿌리로부터 9일까지 계속 분리되었으며, 9일째에도 전체 선충의 3~10%가 분리되었다. 들깨 뿌리 2g에서 9일간 분리된 뿌리썩이선충 최종 밀도는 379~1,824 마리로 처리 간에 큰 차이가 있었는데, 선충이 많이 분리된 처리는 뿌리 파쇄+침지+공기주입(1,824마리) 처리와 뿌리 파쇄+미스트장치(1,349 마리)였다($p = 0.05$). 2일째까지 뿌리썩이선충이 가장 많이 분리된 처리는 뿌리파쇄+미스트장치(725 마리), 다음으로 뿌리파쇄+침지+산소공급(555 마리), 뿌리파쇄+오스텐접시법(421 마리)이었다. 뿌리를 파쇄한 후 분리한 방법은 파쇄하지 않고 분리한 방법보다 모든 분리방법에서 16~108%까지 더 많은 수의 선충이 분리되었다($p = 0.01$).

사 사

This work was carried out with the support of “Cooperative research Program for Agriculture Science and Technology Department”, Rural Development Administration (project number RS-2023-00218522), Republic of Korea

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Araya, M. and E.P. Caswell-Chen. 1993. Enzymatic digestion of roots for the recovery of root-knot nematode develop-

mental stages. *J. of Nematol.* 25:590-595.

- Baermann, G. 1917. Ein einfache methode zur auffindung von ankylostomum (nematoden) larven in Erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Nederlandsch-Indië* 57:131-137 (in Hooper, 1986).
- Bhuiyan, S.A., B.J. Croft, G. Stirling, L.M. Meagher and E. Wong. 2014. Development of methods for screening sugarcane and *Erianthus* germplasm for resistance to plant-parasitic nematodes. *Proceedings of the Australian Society of Sugar-cane Technologists* 36:166-176.
- California Department of Food and Agriculture-Pest rating system(CDFA). 2021. <http://nemaplex.ucdavis.edu/Mangmnt/CDFA-Ratings.htm>.
- Chapman, R.A. 1957. The effects of aeration and temperature on the emergence of species of *Pratylenchus* from roots. *Plant Dis. Rep.* 41:836-841.
- Chawla, M.L. and S.K. Prasad. 1975. Techniques in nematology. II. Comparative efficiency of sampling tools and nematode extraction methods. *Indian J. of Nematol.* 4:115-123.
- Choi, I.S., J.K. Lee, B.Y. Park, H.R. Ko and S.K. Park. 2022. *Nematode Extraction Manual*. pp. 29-49 (in Korean).
- Coolen, W.A., G. Hendrickx and C.J. d'Herde. 1971. Method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue and its application in the testing of rose rootstocks for resistance to endoparasitic root nematodes. *Rijksstation voor Nematologie en Entomologie, Wetteren, Belgium.* W6:34.
- Geraert, E. 2013. The *Pratylenchidae* of the World. Identification of the Family *Pratylenchidae* (Nematoda: *Pratylenchidae*). *Academia Press, Tiel, Belgian.* p. 430.
- Gowen, S.R. and J.E. Edmunds. 1973. An evaluation of some simple extraction techniques and the use of hydrogen peroxide for estimating nematode populations in banana roots. *Plant Dis. Rep.* 57:678-681.
- Helwig, J.T. and K.A. Council. 1979. *SAS User's Guide*, 1979 edition. SAS Institute Inc., Cary, N. Carolina (USA). pp. 494.
- Hooper, D.J. 1986. Extraction of nematodes from plant material. *In* Southey, J.F. (ed.), *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK. pp. 51-58.
- McSorley, R., J.L. Parrado and W.H. Dankers. 1984. A quantitative comparison of some methods for the extraction of nematodes from roots. *Nematropica* 14:72-84.
- Oostenbrink, M. 1954. Een doelmatige methode voor het toetsen van aaltjesbestrijdingsmiddelen in grond met *Hoplolaimus*

- uniformis als proefdier. Mededelingen Landbouwhogeschool Gent 19:377-408 (in Hooper, 1986).
- Oostenbrink, M. 1960. The family Criconematidae. In Sasser, J.N. and W.R. Jenkins (eds.), Nematology. University of North Carolina Press, Chapel Hill. Chapel hill, N. Carolina (USA). pp. 196-205.
- Park, S.H., H.S. Je, N.S. Park, H.I. Kang and I.S. Choi. 2022. Plant-parasitic nematodes on the ridge of rice-field. Korean J. Plant Res. 35(1):23-28.
- Prot, J.C., E.B. Gergon and D.M. Matias. 1993. Influence of extraction procedures from root samples on the recovery and infectivity of *Pratylenchus zae* and *Hirschmanniella oryzae*. Nematologica Mediterranea 21:133-137.
- Qing, X., W. Bert, A. Gamliel, P. Bucki, S. Duvrinin, T. Alon, and S.B. Miyara. 2019. Phylogeography and molecular species delimitation of *Pratylenchus capsici* n. sp., a new root-lesion nematode in Israel on pepper (*Capsicum annuum*). Phytopathology 109(5):847-858.
- Seinhorst, J.W. 1950. De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev). Tijdschrift over Plantenziekten 56:289-348 (in Hooper, 1986).
- Seinhorst, J.W. 1988. The estimation of densities of nematode populations in soil and plants. Växtskyddsrapporter No. 51, Uppsala (SE).
- Tarjan, A.C. 1960. A comparison of polyethylene plastic bags and glass jars as incubation chambers for obtaining nematodes from roots. Plant Dis. Rep. 44:574-577.
- Van Bezooijen, J. 2006. Methods and techniques for nematology. pp. 112, <https://www.wur.nl/en/research-results/chair-groups/plant-sciences/laboratory-of-nematology.htm>
- Viaene, N., Mahieu, T. and de la Pena, E. 2007. Distribution of *Meloidogyne chitwoodi* in potato tubers and comparison of extraction methods. Nematology 9:143-150.
- Whitehead, A.G. and J.R. Hemming. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Ann. Appl. Biol. 55:25-38.
- Young, T.W. 1954. An incubation method for collecting migratory endo-parasitic nematodes. Plant Dis. Rep. 38:794-795.

(Received 2 December 2023 ; Revised 9 April 2024 ; Accepted 9 April 2024)