

## **Diagnostyka** **Diagnostic**

### ***Radopholus similis***

#### **Zakres**

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dotyczący *Radopholus similis*<sup>1</sup>.

#### **Zatwierdzenie i nowelizacja**

Zatwierdzony we wrześniu 2008 r.

#### **Wprowadzenie**

Korzeniaki, *Radopholus* spp., są migrującymi nicieniami endopasożytniczymi, które są szeroko rozprzestrzenione w wielu regionach w tropikach i subtropikach na całym świecie (Loof, 1991). Wywołują one uszkodzenia wielu gatunków roślin, przyczyniając się do powstawania, w trakcie żerowania, na ich korzeniach głębokich zranień (jam). *Radopholus* spp. są zaliczane do grupy 10 gatunków nicieni pasożytujących na roślinach, które wywołują na świecie najwięcej szkód (Sasser i Freckman, 1987). Znanych jest przynajmniej 250 roślin żywicielskich tych nicieni. Spowodowały one całkowite zniszczenie upraw czarnego pieprzu w Indonezji oraz wywołały bardzo duże szkody w nasadzeniach cytrusów i uprawach szklarniowych na terenie Florydy. Nadal są one poważnymi szkodnikami bananowców w różnych częściach świata i zostały zawleczone do europejskich szklarni wraz ze sprowadzanymi roślinami ozdobnymi, zwłaszcza *Anthurium*.

DuCharme i Birchfield (1956) uznali, że istnieją 2 fizjologiczne rasy *R. similis*: jedna rasa pasożytująca na bananowcach oraz wielu innych gatunkach roślin, lecz nie cytrusach, oraz druga rasa pasożytująca zarówno na bananowcach jak i cytrusach. Korzeniaki z rodzaju *Radopholus* przyczyniają się do rozprzestrzeniania się zamierania drzew cytrusowych tylko na Florydzie. Mimo braku wyraźnych różnic morfologicznych między obiema rasami, rasa cytrusowa została uznana jako bliźniaczy gatunek opisany pod nazwą *R. citrophilus* (Huettel i in., 1984) na podstawie przypuszczalnych różnic biochemicznych, fizjologicznych i kariotypu. Jakkolwiek, ostatnie badania oparte na materiale pochodzącym z różnych części świata wykazały, że zdolność do pasożytowania na cytrusach wynika z niewielkich różnic w genomie nicieni i nie uzasadnia wydzielenia odrębnego gatunku z uwagi na jego zdolność do pasożytowania na tych roślinach (Kaplan i Oppermann, 1997). Nie obserwuje się oddzielnego (odizolowanego) rozmnażania się nicieni pasożytujących i nie pasożytujących na cytrusach w związku z tym nie jest uzasadnione uznawanie statusu *R. citrophilus* jako odrębnego gatunku. (Kaplan i in., 1997; Valette i in., 1998; Elbadri i in., 1999). *R. citrophilus* ostatnio został uznany przez Valette i in., 1998 jako synonim *R. similis*. Dlatego nie ma potrzeby wyróżnienia rasy *R. similis* porażającej i nie porażającej cytrusy.

---

<sup>1</sup> Użycie w niniejszym Standardzie EPPPO nazw handlowych odczynników chemicznych lub marek sprzętu nie pociąga za sobą wykluczenia zastosowania innych odczynników i sprzętu, które także mogą być właściwe.

## Tożsamość

**Nazwa:** *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949

**Synonimy:**

*Tylenchus similis* Cobb,

*Tylenchus granulatus* Cobb, 1893

*Tylenchus acutocaudatus* Zimmerman, 1898

*Tylenchus biformis* Cobb, 1909

*Anguillulina similis* (Cobb, 1893) Goodey, 1932

*Rotylenchus similis* (Cobb, 1893) Filipjev, 1936

*Radopholus citrophilus* Huettel, Dickson & Kaplan, 1984

Istnieją też inne synonimy, lecz nie są obecnie stosowane (patrz Siddiqi, 2000).

**Stanowisko taksonomiczne:** Nematoda: Tylenchida<sup>2</sup>: Pratylenchidae

**Komputerowy kod EPPO:** RADOSI

**Kategoria fitosanitarna:** lista A1 EPPO: nr. 161 jako *R. similis* (atakujący *Citrus*), lista A2 EPPO nr. 126 jako *R. similis* (nie atakujący *Citrus*). Załączniki do Dyrektywy Rady 2000/29/WE z dnia 8 maja 2000 r. w sprawie środków ochronnych przed wprowadzaniem do Wspólnoty organizmów szkodliwych dla roślin lub produktów roślinnych i przed ich rozprzestrzenianiem się we Wspólnocie: II/A1 (jako *R. citrophilus*) II/A2 (jako *R. similis*).

## Wykrywanie

### Objawy

Porażone rośliny mają uszkodzony system korzeniowy (ryc.1). Na korzeniach znajdują się rozległe wgłębienia (jamy), kambium i floem mogą być całkowicie zniszczone, z wyjątkiem wypełnionych nicieniami przestrzeni oddzielających resztki tkanki naczyniowej i kory pierwotnej. Nad zniszczoną tkanką mogą pojawiać się zewnętrzne spękania korzeni. W wyniku bezpośredniej analizy pod mikroskopem stereoskopowym, przy powiększeniu 15 to 50x, korzeni umieszczonych w otwartej szalce Petriego wypełnionej wodą można zaobserwować objawy porażenia wywołane przez nicienie (jamy, przebarwienia). Porażone rośliny słabo rosną, ich liście są drobniejsze i wykazują zmiany zabarwienia. Porażone drzewa cytrusowe wytwarzają mniejszą liczbę małych liści o małych rozmiarach, a ponadto obserwuje się większą liczbę suchych pędów niż na drzewach zdrowych ze względu na obniżone pobieranie wody i substancji odżywczych. Sezonowy wzrost odrostów jest słaby, a zawiązywanie owoców niewielkie. W przypadku bananowców najbardziej widocznym objawem porażenia jest wywracanie się porażonych roślin, zwłaszcza gdy znajdują się na nich owoce („choroba wywracania się”, ang. “toppling-over disease”). Pobieranie do badań prób gleby i korzeni jest najlepszą metodą wykrycia obecności *R. similis*.

### Identyfikacja

Pozytywna identyfikacja oparta jest na analizie morfologicznej i morfometrycznej z użyciem mikroskopu z kontrastem fazowym.

---

<sup>2</sup> Ostatnie osiągnięcia w systematyce nicieni opierające się na danych morfologicznych i wynikach testów molekularnych wskazują na istnienie jednostki taksonomicznej "Tylenchomorpha" (De Ley i Blaxter, 2004).



Ryc.1. Uszkodzenia na *Maranta* sp. Po prawej zdrowa roślina. State Plant Pathology Institute (Dania).

## **Procedury ekstrakcji**

### ***Ekstrakcja z materiału roślinnego***

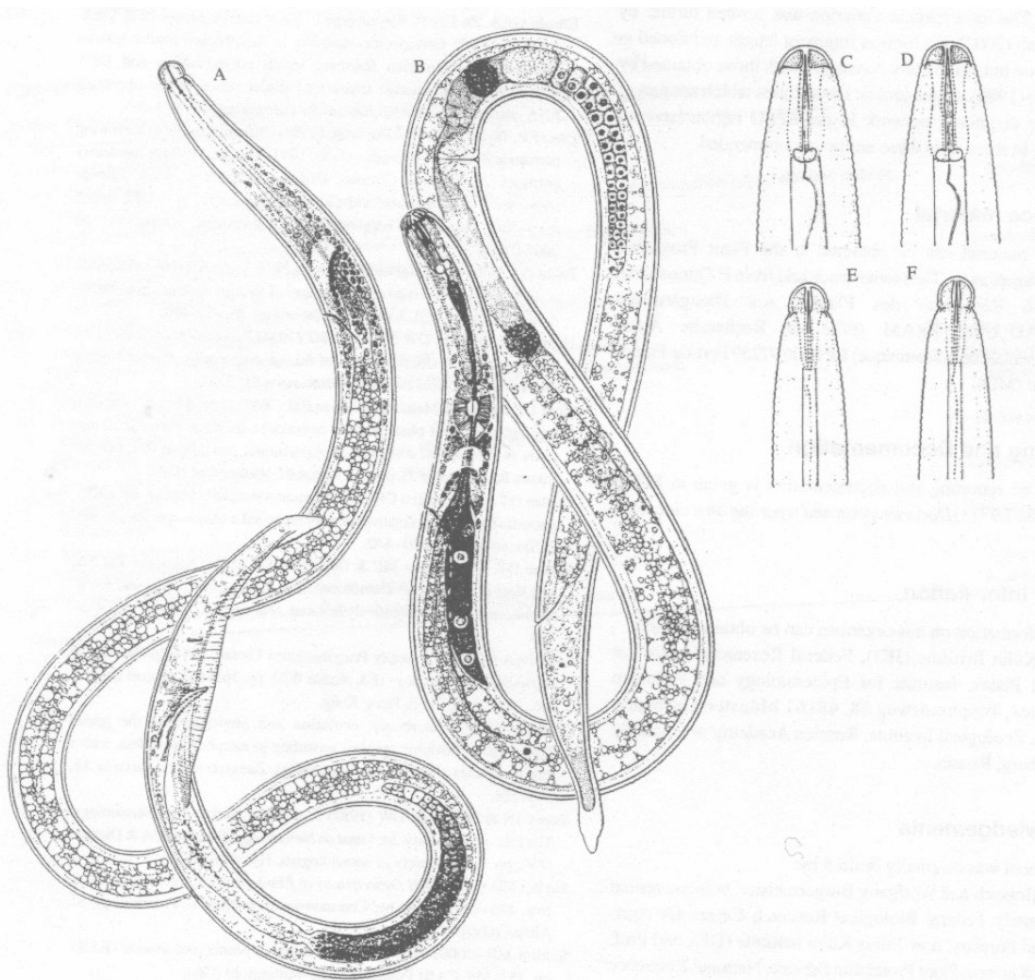
Metoda maceracji i cedzenia przez filtry lub metoda maceracji i odwirowywania (Southey, 1986) mogą być użyte do ekstrakcji nicieni z materiału roślinnego. Korzenie powinny być pocięte na małe kawałki, a duże (główne) korzenie pocięte wzdłużnie na „plasterki”. Korzenie pocięte wzdłużnie mogą także być umieszczone w wodzie znajdującej się w szalkach Petriego lejkach Baermanna, itp., w temperaturze 20-25°C. Minimalny czas ekstrakcji wynosi 24 godziny. Ekstrakcja może zostać wydłużona do 10 dni.

### ***Ekstrakcja z gleby***

Nicienie mogą być wyekstrahowane z gleby lub innego podłoża uprawowego z zastosowaniem metod wmywania (elutriacji) (Southey, 1986). Lejek Baermanna, metody Whiteheada oraz metoda przesiewana i odwirowywania mogą także znaleźć zastosowanie do ekstrakcji nicieni z rodzaju *Radopholus* z gleby.

## **Morfologia**

Osobniki *R. similis* to niewielkie nicienie (o długości poniżej 1 mm) z wydłużonym ogonem i wyraźnym dymorfizmem płciowym w odniesieniu do budowy przedniej części ciała (ryc. 2 C-F). Klucz do rodzajów należących do rodziny Pratylenchidae, opracowany na podstawie publikacji Loofa (1991) przedstawiono w Dodatku 1. Ryss (2003) opublikował klucz do identyfikacji nicieni z rodzaju *Radopholus*. Morfometryczną charakterystykę gatunku *R. similis* podano w tabeli 1. Do analizy nicieni konieczny jest mikroskop stereoskopowy z dobrym oświetleniem (dający powiększenie w zakresie od 10 do 100x).



Ryc. 2. *Radopholus similis*. (A) samiec, (B) samica, (C, D) głowa samicy, (E, F) głowa samca. Źródło: A, B: Siddiqi, 1985; C-F. Hunti in., 1990,

Tabela 1. Morfometryczna charakterystyka *R. similis* (wymiary w  $\mu\text{m}$ )

Cecha	Samica*	Samiec*
Długość ciała	510– 820 (655)	450–720 (590)
Długość sztyletu	16– 23 (18,5)	10– 16 (13,3)
Gonada samicy		
Przednia gałąź	112 – 297 (174)	
Tylna gałąź	103 – 269 (165)	
Średnica ciała na wysokości odbytu	13 – 24 (17,7)	11 – 20 (13,9)
Odległość między otworkiem wydalniczym a wierzchołkiem głowy (odległość od głowy)	59– 115 (88)	65 – 104 (86)
Długość spikul		13– 24 (19,3)
Długość gubernakulum		7 – 14 (10,6)
Wulwa %	50– 67 (57)	
a	20– 34 (27)	24– 43 (33)
b	6–10 (7,9)	5– 10 (7,6)
c	7– 13 (9,4)	6– 10 (8,3)

\*Źródło: Williams i Siddiqi, 1973; Esser i in., 1984; Elbadri i in., 1999.

### Samiec (ryc. 2 A, E i F)

Głowa w kształcie guzika, oddzielona wyraźną bruzdą od reszty ciała. W porównaniu z samicami, boczne wargi samca są zdecydowanie mniejsze. Na głowie nie obserwuje się występowania pierścieni. Szkielet głowy samca, jego sztylet, środkowe rozszerzenie przełyku i gruczołowa część przełyku są słabo rozwinięte. Występują cztery linie boczne. Wewnętrzne linie boczne są słabo rozwinięte. Torebka kopulacyjna dobrze rozwinięta, rozpoczyna się w odległości równej około jednej szerokości przed zakończeniem spikul, a kończy w odległości równej dwóch do trzech szerokości ciała przed zakończeniem ogona. Wodzydło (gubernaculum) z małymi parzystymi wyrostkami noszącymi nazwę titillae. Spikule łukowato wygięte po stronie grzbietowej.

### Samica (ryc. 2 B, C i D)

Głowa półkulista, rzadziej nieznacznie oddzielona od reszty ciała. Znajduje się na niej od trzech do sześciu pierścieni. Sztylet dobrze rozwinięty z zaokrąglonymi guzikami. Wulwa znajduje się poza środkiem długości ciała, niekiedy ze słabo zaznaczonymi wargami. Występują dwa funkcjonujące, podobnie rozwinięte jajniki, a każdy z nich zawiera kulistą spermatekę, często wypełnioną sperumą w formie pałeczek. Środkowe rozszerzenie przełyku dobrze rozwinięte, od wydłużonego do elipsowatego z wyraźnymi zastawkami. Na grzbietowej stronie ciała znajdują się trzy komórki gruczołowe. Ogon od wydłużonego do stożkowatego z wąsko zaokrąglonym końcem.

### Porównanie cech morfologicznym z innymi gatunkami

Cechy morfologiczne samic *R. similis* i podobnych gatunków zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 2..Cechy morfologiczne samic *R. similis* i pokrewnych gatunków.

Gatunek	Zakończenie ogona	Pierścieniowanie ogona	Spermateka	Głowa (region wargowy)	Pierścieniowanie głowy (regionu wargowego)
<i>R. similis</i>	wąskie	od delikatnego do całkowitego braku (ogon gładki)	o jednakowym rozmiarze na całej długości	oddzielona od reszty ciała	3-6
<i>R. clarus</i>	szerokie	wyraźne	o jednakowym rozmiarze na całej długości	ciągła z resztą ciała	4
<i>R. nativus</i>	szerokie	wyraźne	o jednakowym rozmiarze na całej długości (pusta)	niewielko oddzielona od reszty ciała	4
<i>R. magniglans</i>	szerokie	wyraźne	przednia część większa od tylnej	niewielko oddzielona od reszty ciała	2-3
<i>R. megadorus</i>	szerokie	delikatne	jednakowym rozmiarze na całej długości	ciągła z resztą ciała	brak pierścieniowania (głowa gładka)

## **Metody molekularne**

Metoda, którą opracował Fallas i in.(1996) oparta jest na amplifikacji fragmentu rybosomalnego DNA (rDNA), obejmującego dwa wewnętrzne przerywniki ulegające transkrypcji (ITS) i gen 5.8S. Polimorfizm długość fragmentów restrykcyjnych (RFLP) tego fragmentu rDNA wykorzystano do porównania 10 izolatów *R. similis* pochodzących z różnych regionów uprawy bananowców na świecie. Elbadri i in. (2002) poddali analizie wewnątrzgatunkową zmienność izolatów tego gatunku. Długość fragmentów restrykcyjnych wymienionych w tej pracy jest zupełnie odmienna od tej, którą uzyskał Fallas i in. (1996). Zważywszy na fakt, że laboratoria diagnostyczne wchodzące w skład Krajowych Organizacji Ochrony Roślin krajów z regionu EPPO nie mają żadnych doświadczeń w przeprowadzaniu tych testów, nie zaleca się ich stosowania.

## **Materiały odniesienia**

Materiały odniesienia można otrzymać z następujących źródeł:

Plant Protection Service, Wageningen, i od Patricka Queneherve UMR 186 Résistance des Plantes aux Bioagresseurs IRD\_CIRAD\_UM2 PRAM (Pôle de Recherche Agroenvironnementale de la Martinique) BP 8006 97259 Fort-de-France, Martynika.

## **Raport z badania**

Wytyczne dotyczące sprawozdań i dokumentacji został przedstawiony w standardzie EPPO PM7/77(1) „*Dokumentacja i raportowanie w diagnostyce*”

## **Informacje dodatkowe**

Dodatkowe informacje dotyczące opisanego organizmu można uzyskać z następujących źródeł:

Julius Kühn Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Toppheideweg 88, 48161 Münster, Niemcy, A. Y. Ryss, Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Rosja

## **Podziękowania**

Projekt niniejszego protokołu został pierwotnie sporządzony przez:

Helen Braasch i Wolfganga Burgermeistera, którzy są emerytowanymi pracownikami Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, obecnie Julius Kühn Institute (JKI), Niemcy i prof. dr. Gerrita Karssena, Plant Protection Service, National Reference Laboratory. PO BOX 9102, 6700 HC, Wageningen (Holandia)

## **Materiały źródłowe**

De Ley P, Blaxter M (2004). A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. W: *Nematology Monographs and Perspectives*. (Ed. Cook R, Hunt DJ), pp. 633-653, Leiden: E.J. Brill.

- DuCharme EP & Birchfield W (1956) Physiological races of the burrowing nematode. *Phytopathology* **46**, 615-616.
- Elbabri GAA, Geraert E, Moens M (1999) Morphological differences among *Radopholus similis* Cobb, 1893) Thorn, 1949 populations. *Russian Journal of Nematology* **7**, 139-153.
- Elbabri GAA, DeLey P, Wayenberge L, Vierstraete A., Moens M, Vanfieteren J (2002) Intraspecific variation in *Radopholus similis* isolates assessed with restriction fragments length polymorphism and DNA sequencing of internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA cistron. *International Journal for Parasitology* **32**, 199-205.
- Esser RP, Taylor AL, Holdeman QL (1984). Characterization of burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 for regulatory purposes. *Nematology Circular*, Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Service.; (113): 4 URL <http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/nema/nemacirc-no.html> (dostęp dnia 2007-07-10)
- Fallas GA, Hahn ML, Fargette M, Burrows PR, Sarah JL (1996) Molecular and biochemical diversity among isolates of *Radopholus* spp. from different areas of the world. *Journal of Nematology* **28**, 422-430
- Huettel RN, Dickson DW, Kaplan DT (1984) *Radopholus citrophilus* sp. n. (Nematoda), a sibling species of *Radopholus similis*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* **51**, 32-35.
- Hunt DJ, Luc M., Manzanilla-Lopez RH (2005) Identification, morphology and biology of plant parasitic nematodes. W: *Plant parasitic nematodes in Tropical and Subtropical Agriculture*, 2<sup>nd</sup> edition (Ed. Luc M., Sikora RA, Bridge J), pp. 11-52, CABI , Wallingford, Wielka Brytania.
- Kaplan DT, Oppermann CH (1997) Genome similarity implies that citrus-parasitic burrowing nematodes do not represent a unique species. *Journal of Nematology* **29**, 430-440.
- Kaplan DT, Vanderspool MC, Oppermann CH (1997) Sequence Tag Site and Host Range Assays Demonstrate that *Radopholus similis* and *R. citrophilus* are not reproductively isolated. *Journal of Nematology* **29**, 421-429.
- Loof PAA (1991) The family Pratylenchidae Thorne, 1949. Pp. 363-421. W: *Manual of agricultural nematology*. (Ed. Nickle WR) Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong.
- Ryss, A.Y. (2003). Taxonomy, evolution and phylogeny of the genus *Radopholus* (didelphic species) according to morphological data, with a key to species (Nematoda: Tylenchida). *Zoosystematica Rossica*, 11, 2, 243-256.
- Sasser JN & Freckman DW (1987) A world perspective on Nematology: The role of the society. pp. 7-14. W: *Vistas on Nematology*. (Ed. Veech JA i Dickson DW), pp. 7-14, Hyattsville (USA).
- Siddiqi MR (1985) *CIH descriptions of plant-parasitic nematodes*. Set 8, Nos. 106-120. (wydane przez: Commonwealth Institute of Parasitology, St. Albans, Wielka Brytania.).
- Siddiqi MR (2000) Tylenchida: parasites of plants and insects (Ed.2). Wallingford, UK: CABI Publishing Wielka Brytania.

- Southey JF (1986) Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Reference book 402. London. 202 pp.
- Valette C, Mountport D, Nicole M, Sarah JL & Baujard P (1998) Scanning electron microscopy study of two African populations of *Radopholus similis* (Nematoda: Pratylenchidae) and proposal of *R. citrophilus* as a junior synonym of *R. similis*. *Fundamental and Applied Nematology* **21**, 139-146.
- Williams KJO, Siddiqui MR (1973) *CIH Descriptions of Plant-Parasitic Nematodes* Set 2, No. 27 *Radopholus similis*. CAB International, Wallingford (Wielka Brytania).



## Dodatek 1

Dichotomiczny klucz do rodzajów nicieni z rodziny *Pratylenchidae* (opracowany przez Karsena w oparciu o publikację Loofa, (1991))

1.	Samice monoprodelficzne <sup>3</sup>	2
	Samice didelficzne <sup>4</sup>	6
2.	Młode samice są wolno żyjące i spotyka się je w glebie; ich gruczołowe rozszerzenie przełyku zachodzi na jelito po stronie grzbietowej; ciało nie wykazuje różnicowania pod względem średnicy; gonady krótkie; z czasem samice stają się osiadłe, nieruchome, zgrubiałe i powodują powstawanie wyrosli na korzeniach. U dojrzałych samic gonady w pełni rozwinięte, ciało robakowate, ma zdolność ruchu i w większości przypadków jest nieco zgrubiałe.	<i>Nacobbus</i> 3
3.	Przełyk nieznacznie obejmuje jelito po stronie brzusznej; region wargowy (głowa) niski, ogon samicy krótki, zaokrąglony na końcu. Przełyk nieznacznie obejmuje jelito po stronie brzusznej.	<i>Pratylenchus</i> 4
4.	Na liniach bocznych znajdują się trzy linie; ogon samicy jest prawie ścięty, region wargowy stożkowaty, guziki sztyletu przypominające kształtem kwiat tulipana. Na liniach bocznych znajdują się cztery (rzadziej trzy) linie; guziki sztyletu nie przypominają kształtem kwiatu tulipana.	<i>Hoplotylus</i> 5
5.	Region wargowy niski u obu płci; sztylet samca nie jest zredukowany; przełyk samca jest nieznacznie zredukowany. Region wargowy samicy spłaszczony, a u samca w kształcie guzika; sztylet i przełyk samca są silnie zredukowane.	<i>Apratylenchoides</i> <i>Radopholoides</i>
6.	Samica zgrubiała, przyjmując kielbaskowaty kształt ciała. Samica nie jest zgrubiała.	<i>Achlysiella</i> 7
7.	Długość ciała powyżej 1 mm; ogon bardzo długi, często z mukronem na końcu. Długość ciała poniżej 1 mm; ogon nie posiada na końcu mukrona	<i>Hirschmanniella</i> 8
8.	Gruczoły szyjne <sup>5</sup> obecne. Brak gruczołów szyjnych	<i>Pratylenchoides</i> 9
9.	Gruczołowa część przełyku obejmuje jelito po stronie brzusznej Gruczołowa część przełyku obejmuje jelito po stronie grzbietowej	<i>Zygotylenchus</i> 10
10.	Region wargowy niski u obu płci; sztylet samca nie jest zredukowany. Region wargowy samicy spłaszczony, a u samca w kształcie guzika; sztylet i przełyk samca są silnie zredukowane.	<i>Zygradus</i> <i>Radopholus</i>

<sup>3</sup> Rozwinięta tylko przednia gałąź układu rodoczego

<sup>4</sup> Rozwinięte obie gałęzie układu rozrodczego

<sup>5</sup> Organy czuciowe znajdujące się w okolicy przedniej obrączki nerwowej

<b>Tłumaczenie z jęz. angielskiego:</b>	<b>Sprawdził:</b>	<b>Zatwierdził:</b>
Witold Karnkowski (GIORiN CL)	Tomasz Konefał (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
16.09.2013		