

Protokół diagnostyczny wykrywania i identyfikacji *Globodera rostochiensis* i *Globodera pallida* (Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy)

Systematyka

Nazwa: *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923)

Nazwa polska: mątwik ziemniaczany

Synonimy: *Heterodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923)

Pozycja taksonomiczna: Nematoda, Tylenchida, Heteroderidae

Kategoria fitosanitarna: EPPO lista A2 nr 124 (A2 organizmy kwarantannowe, Aneks IIB)

Systematyka

Nazwa: *Globodera pallida* (Stone, 1973, Behrens, 1975)

Nazwa polska: mątwik agresywny

Synonimy: *Heterodera pallida* (Stone, 1973)

Pozycja taksonomiczna: Nematoda, Tylenchida, Heteroderidae

Kategoria fitosanitarna: EPPO lista A2 nr 124 (A2 organizmy kwarantannowe, Aneks IIB)

Opis gatunków

Mątwik ziemniaczany *Globodera rostochiensis* (Wollenweber 1923) i mątwik agresywny *Globodera pallida* (Stone 1973, Behrens 1975) należą do gatunków kosmopolitycznych żyjących zarówno w krajach klimatu umiarkowanego jak i w rejonach tropikalnych. Żywicielami obydwu gatunków nicieni są rośliny z rodziny psiankowatych tj. pomidor, ziemniak, bakłażan oraz inne, dziko żyjące gatunki roślin z rodzaju *Solanum* i *Lycopersicon*. Mątwiki tworzące cysty na korzeniach roślin psiankowatych są bezwzględnie endopasożytami, które mogą powodować karłowacenie roślin, zmniejszać plony, a czasami prowadzić do całkowitego nieurodzaju. PCN powoduje straty w wysokości około 9% całkowitej produkcji ziemniaków w Europie i uważany za jeden z najtrudniejszych do zwalczania szkodników upraw w umiarkowanych regionach świata.

Jako organizmy objęte kwarantanną roślin na arenie międzynarodowej, skuteczne metody izolacji cyst mątwika z porażonej gleby, identyfikacja gatunku jak również identyfikacja patotypu nicienia w obrębie gatunku mają kluczowe znaczenie dla skutecznego zwalczania oraz zapobiegania rozprzestrzenianiu się agrofagów.

Poniżej opisane zostały protokoły diagnostyczne izolacji cyst i identyfikacji gatunków oraz patotypów mątwika ziemniaczanego i mątwika agresywnego stosowane w Zakładzie Biologii Stosowanej IHAR-PIB w Radzikowie.

Opis patotypów

W obrębie obu gatunków mątwików z rodzaju *Globodera* wyróżnia się tzw. patotypy. Są to grupy mątwików charakteryzujące się wspólnymi genami wirulencji (lub awirulencji) i wyróżnione na podstawie zdolności (lub braku zdolności) namnażania się danej populacji na określonej roślinie żywicielskiej zwanej rośliną różnicującą. Na podstawie interakcji różnych populacji mątwika z różnymi roślinami różnicującymi wyodrębniono pięć patotypów mątwika ziemniaczanego – Ro1, Ro2, Ro3, Ro4 i Ro5 oraz trzy patotypy mątwika agresywnego – Pa1, Pa2 i Pa3.

Biologia mątwika ziemniaczanego i agresywnego

Mątwiki rozmnażają się płciowo i jak wiele innych nicieni tworzących cysty osobniki młodociane wykluwają się z jaj w wyniku stymulacji wydzielinami uwalnianymi przez korzenie roślin psiankowatych. Po wykluciu pojawiają się osobniki młodociane drugiego stadium (J2), które penetrują system korzeniowy rośliny żywiciela tuż za wierzchołkiem korzenia lub korzeniem bocznym poprzez nakłucie ścian komórkowych korzenia tzw. sztyletem. Nicienie migrują w przestrzeniach międzykomórkowych do perycyklu, gdzie tworzą strukturę nazywaną syncytium dostarczającą substancji odżywczych dla rozwijającego się do stadium dorosłego nicieni. Około 7 dni po wniknięciu do rośliny osobniki J2 przekształcają się w osobniki J3 i J4. Płeć u nicieni jest identyfikowana już w trzecim stadium rozwoju (J3) i jest determinowana przez warunki środowiskowe a przede wszystkim przez dostępność pokarmu. Przy ograniczonym rozroście syncytium i braku substancji odżywczych w cyklu życiowym nicieni powstaje więcej samców niż samic. Samce wydostają się z korzenia w celu zapłodnienia samic, których gonady w wyniku powiększania się rozrywają korę korzenia i ostatecznie wystają poza jego powierzchnię stając się widoczne na zewnątrz. Dalszy rozwój zarodków odbywa się w jajach aż do powstania osobników młodocianych drugiego stadium (J2). Na tym etapie pozostają uśpione, dopóki nie otrzymają odpowiedniego bodźca do wyklucia lub gdy warunki nie będą odpowiednie do aktywności. Dojrzałe samice obumierają, przekształcając się tworząc wokół jaj ochronną cystę zawierającą od 200 do 500 jaj i odpadają

od korzenia rośliny. W zależności od sprzyjających wylęgowi czynników zewnętrznych 1/3 larw inwazyjnych w cyście może być źródłem porażenia roślin jeszcze w tym samym sezonie wegetacyjnym. Cysty mogą przetrwać w glebie przez 20 lat lub dłużej (Perry, 1989).

Cykle życiowe mątwika ziemniaczanego i mątwika agresywnego są zasadniczo takie same. Różnicą jest jedynie temperatura progowa wykuwania osobników J2 z jaj i wynosi ona 10°C dla mątwika agresywnego i 15°C dla mątwika ziemniaczanego. We wszystkich temperaturach względne tempo wylęgania się *G. rostochiensis* jest wyższe niż w przypadku *G. pallida*, co sprzyja szybszemu „zadomowieniu się” mątwika ziemniaczanego w korzeniach i wykluczeniu mątwika agresywnego w sytuacji, gdy gatunki te konkurują w wyższych zagęszczeniach. W populacjach mieszanych wykluwaniu się osobników juvenilnych *G. pallida* mogą sprzyjać niskie temperatury gleby i początkowe zagęszczenie, które nie ograniczają wczesnego wzrostu korzeni, podczas gdy *G. rostochiensis* może dominować w stosunkowo cieplejszych glebach i przy dużym zagęszczeniu.

Objawy

Objawy na nadziemnych częściach roślin powstałe w wyniku żerowania mątwików tworzących cysty na ziemniaku nie są specyficzne i często pozostają nie wykryte. Objawy generalnie obejmują placowate występowanie w uprawie roślin, które słabo rosną, a ich liście czasami żółkną, więdną lub obumierają, bulwy są mniejsze, korzenie nadmiernie rozgałęziają się a gleba przylega do nich. Jakkolwiek, do powstawania takich objawów może przyczynić się wiele czynników. W takim przypadku rośliny powinny być wykopane, a ich korzenie poddane badaniu wizualnemu na obecność cyst i młodych samic, lub pobierana jest próbka gleby z przeznaczaniem do badań. Młode samice i cysty widoczne są gołym okiem jako drobne, białe, żółte lub brązowe „główki od szpilki” na powierzchni korzenia (**Fot. 1 i 2**). Wykrywanie nicieni poprzez wykopywanie roślin jest możliwe tylko przez krótki okres czasu nim samice dojrzeją i zmieniają się w cysty, gdyż w późniejszym okresie cysty mogą wypadać do gleby podczas pobierania materiału roślinnego, a ponadto jest ono czasochłonne. Dlatego najlepszym sposobem wykrycia obecności mątwików tworzących cysty na ziemniaku jest badanie laboratoryjne próbek gleby.

Protokoły diagnostyczne IHAR-PIB

1. Ekstrakcja cyst *Globodera rostochiensis* i *Globodera pallida* z gleby

Ekstrakcja cyst mątwika ziemniaczanego i agresywnego z gleby suszonej lub mokrej oparta jest na analizie bezpośredniej bazującej na wielkości i kształcie cyst oraz różnicy w gęstości cyst i cząstek glebowych.

Polega ona na:

- 1.1. suszeniu otrzymanych do analiz prób gleby pobranych z porażonego pola w temperaturze nie wyższej niż 25°C i wilgotności powietrza nie niższej niż 40%;
- 1.2. zagęszczaniu gleby pobranej z porażonego pola z wykorzystaniem wytrząsarki wibracyjnej (Eko-Lab) i zestawu sit laboratoryjnych o wielkości oczek: 250 µm, 500 µm, 850 µm, 900 µm, 1 mm, 2 mm (PN-ISO 3310-1:2000);
- 1.3. ze względu na wielkość cyst nicieni z rodzaju *Globodera spp.* odseparowanie i pozostawienie do dalszej ekstrakcji frakcji pozostałych po przesianiu gleby przez sita o wielkości oczek od 900 do 250 µm;
- 1.4. przesiewanie na mokro czterech frakcji gleby uzyskanej po zagęszczeniu (ppkt a i b) z wykorzystaniem automatycznego ekstraktora cyst (Mekku Erich Pollähne GmbH) oraz zebranie wypływających cyst i flotujących fragmentów gleby na sicie o wielkości oczek 250 µm;
- 1.5. wysuszenie frakcji zebranej na sicie o wielkości oczek 250 µm i manualna izolacja cyst pod mikroskopem stereoskopowym (Bresser Science ETD-101) o powiększeniu 40x;
- 1.6. wizualna ocena cyst w celu określenia zawartości – puste czy z żywą zawartością;
- 1.7. dalsza identyfikacja do gatunku i patotypu.

2. Identyfikacja do gatunku

a) Na podstawie cech morfologicznych

Identyfikacja mątwików z rodzaju *Globodera* do gatunku prowadzi się na podstawie kształtu i koloru cyst oraz budowy morfologicznej osobników drugiego stadium (J2).

Mątwik ziemniaczany i mątwik agresywny są gatunkami bardzo zbliżonymi do siebie pod względem budowy morfologicznej. Cysty *Globodera spp.* są gładkie, okrągłe z niewielką,

wystającą szyjką, bez stożka wulwalnego, o średnicy ok. 450 µm, posiadające brązowy oskórek pokryty zygzakowatymi fałdami, których liczba jest najistotniejszą różnicą morfologiczną obu gatunków. Młode cysty *G. rostochiensis* są koloru pomarańczowego natomiast *G. pallida* są białe. Dojrzewając, cysty obu gatunków brązowieją. Cechami różnicującymi w przypadku osobników młodocianych drugiego stadium (J2) są długość sztyletu i kształt guzków sztyletu. Dokładniejszą metodą identyfikacji do gatunku są analizy wykonywane przy pomocy metod molekularnych.

b) Za pomocą metod molekularnych

Z uwagi na podobieństwo morfologiczne między *G. rostochiensis* i *G. pallida* wykorzystuje się metody molekularne w celu odróżnienia obu gatunków.

Test Multiplex PCR (Bulman i Marshall, 1997).

Informacje ogólne:

- 2.1. test multiplex PCR może być użyty tylko w odniesieniu do identyfikacji mątwika ziemniaczanego i mątwika agresywnego;
- 2.2. matrycą do testu jest DNA wyizolowane z całej cysty;
- 2.3. metodyka została opracowana w odniesieniu do genu 18SRNA oraz rybosomalnego regionu ITS1;
- 2.4. w multiplex PCR stosuje się uniwersalny starter ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') oraz startery specyficzne dla gatunku *G. pallida* (PITSp4: 5'-ACAACAGCAATCGTCGAG-3') i *G. rostochiensis* (PITSr3; 5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3'). Produktem amplifikacji jest fragment o długości 265 pz charakterystyczny dla *G. pallida* i 434 pz dla *G. rostochinesis*.
- 2.5. amplifikacja DNA przebiega z udziałem polimerazy Taq DNA.

3. Identyfikacja do patotypu

Patotyp określa populację mątwików wykazującą różnice w wirulencji na zestawie genotypów i odmian ziemniaka zgodnie z procedurą Kort'a i wsp. (1977) oraz lokalnych/krajowych odmian ziemniaka używanych do rozróżniania wirulencji poszczególnych populacji nicieni (**Tab. 1**).

Informacje ogólne:

- 3.1. Materiałami odniesienia są rekomendowane populacje mątwika ziemniaczanego i agresywnego przedstawione w tabeli 1 (Tab.2);
- 3.2. Badanie żywotności jaj i osobników młodocianych;
- 3.3. Określenie żywotności przy użyciu testu biologicznego polegającego na:
 - a) przygotowaniu gleby w doniczkach o poj. 200 ml o odpowiedniej wilgotności;
 - b) wycięcie jednego, dobrze podkiełkowanego oczka z bulwy ziemniaka, o średnicy ok. 3 cm; i umieszczenie go w doniczce. Zimą i jesienią podkiełkowanie bulw ziemniaka przy użyciu tiomocznika i kwasu giberelinowego; do badań wykorzystuje się odmiany o skrajnym stopniu podatności (Tab. 3);
 - c) sztuczna inokulacja kiełków ziemniaka poprzez dodanie do gleby w doniczce określonej liczby cyst i osobników młodocianych. Cysty wykorzystane do biotestu powinny być poddane temp. +4°C przez okres 2-3 miesięcy;
 - d) prowadzenie uprawy przez okres ok. 2 miesięcy (w przypadku mątwika ziemniaczanego) i 2,5 miesiąca (w przypadku mątwika agresywnego) w temp. 16/22°C (noc/dzień) w osobnych komorach szklarniowych w celu zapobiegania kontaminacji populacji. Konieczne jest właściwe podlewanie doniczek w celu umożliwienia przemieszczania się osobników młodocianych mątwika w glebie oraz prowadzenie oprysków roślin ziemniaka;
 - e) po zakończeniu cyklu życiowego nicieni, obcina się łodygi ziemniaka i przeprowadza obserwację wizualną w celu stwierdzenia obecności nowo wytworzonych cyst na korzeniach ziemniaka;
 - f) bryłę ziemi wyjętą z doniczki i oplecioną korzeniami ziemniaka ogląda się pod mikroskopem stereoskopowym w celu zliczenia liczby nowo namnożonych cyst z każdej z 5 powierzchni bryły oraz porównaniu jej do liczby cyst użytych do sztucznej inokulacji;
 - g) w przypadku uzyskania 80% nowo namnożonych cyst uważa się populację za posiadającą potencjał infekcyjny.

Tabela 1. Identyfikacja patotypów mątwika ziemniaczanego i agresywnego wg Kort i wsp. (1977).

Genotypy	Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Pa1	Pa2	Pa3
Desiree	+	+	+	+	+	+	+	+
Maris Piper	-	+	+	-	+	+	+	+
S.kurtzianum	-	-	+	+	+	+	+	+
S.vernei 58.1642.4	-	-	-	+	+	+	+	+
S.vernei 62.33.3	-	-	-	-	+	-	-	+
S.vernei 65.346.19	-	-	-	-	-	+	+	+
S.multidissectum	+	+	+	+	+	-	+	+
Partner	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2. Populacje mątwika w kolekcji IHAR-PIB Radzików.

Gatunek	Patotyp	Nazwa populacji
Mątwik ziemniaczany (<i>Globodera rostochiensis</i>)	Ro1	Ecosee
	Ro2	-
	Ro3	-
	Ro4	-
	Ro5	Harmerz
Mątwik agresywny (<i>Globodera pallida</i>)	Pa1	Scottish
	Pa2	Kalle
	Pa3	Chavornay

Tabela 3. Skrajnie podatne odmiany ziemniaka stosowane jako kontrole pozytywne w bio-testach odporności.

Odmiana	Odporność na patotypy							
	Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Pa1	Pa2	Pa3
Adam	+	+	+	+	+	+	+	+
Bila	+	+	+	+	+	+	+	+
Desiree	+	+	+	+	+	+	+	+
Głada	+	+	+	+	+	+	+	+
lkar	+	+	+	+	+	+	+	+
Irys	+	+	+	+	+	+	+	+

+ podatność w stopniu 1 (bardzo wysoka)

Fot.1. Cysty mątwika ziemniaczanego.



Fot.2. Cysty mątwika agresywnego.

