

Újabb *Longidorus* fajok (Nematoda: Longidoridae) hazai előfordulása agrárterületeken

Feketéné Palkovics Ágnes¹, Krizbai László¹, Elekesné Kaminszky Mariann², Markóné Nagy Krisztina³

¹NÉBIH, Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság, Budapest

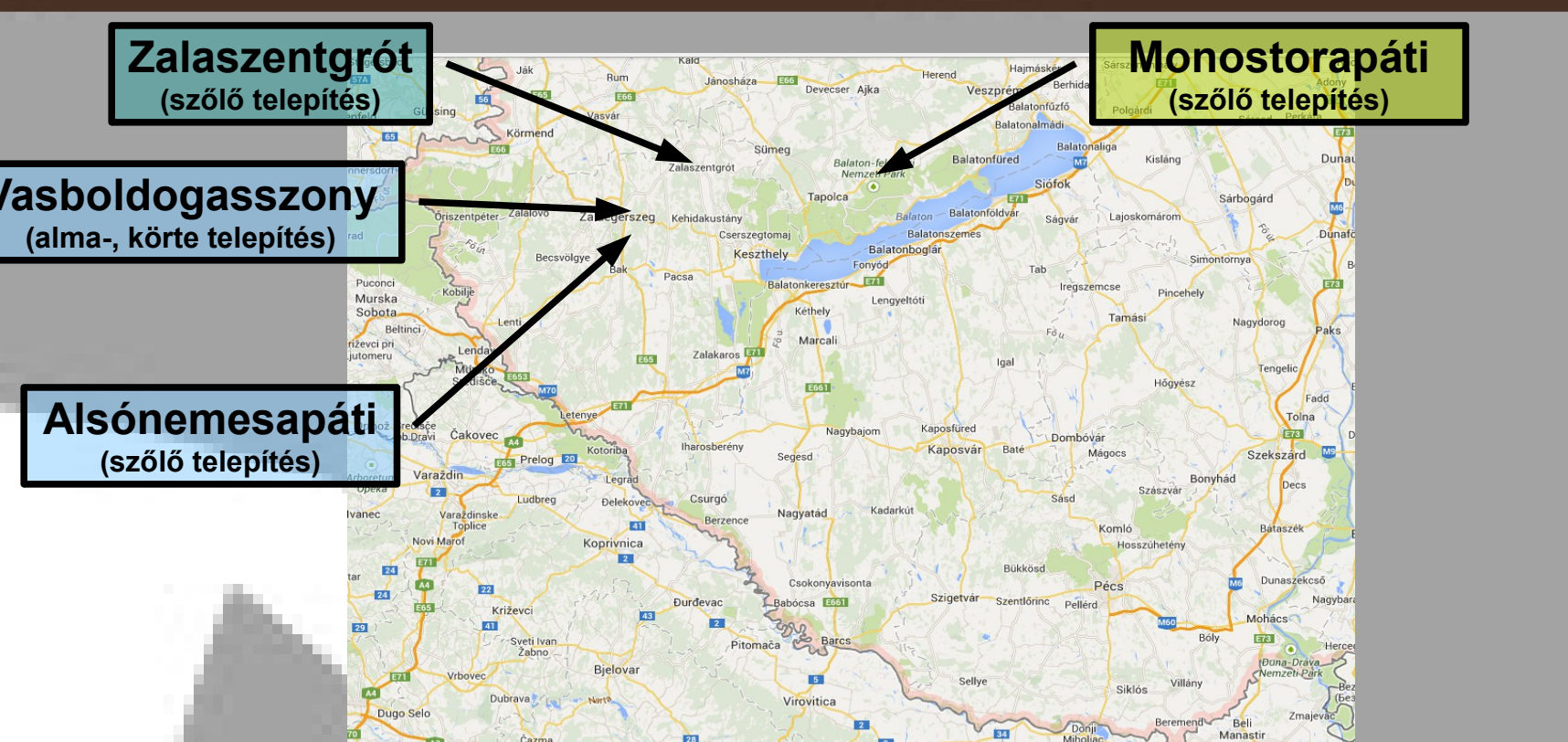
²Budapest, Hévízi út 4/b. 1033

³Veszprém Megyei Kormányhivatal, Növény- és Talajvédelmi Igazgatóság, Veszprém

Bevezetés

A Longidoridae család fajai az agrárterületek növényi kártevő fonálféreg faunájának jelentős tagjai. Külső élősködők, többek között különböző zöldsgfélek, fás szárú növények, számoeca és a krizantém gyökereit károsítják. Közvetlen kártételük mellett közvetett kártevőként is nyilvántartjuk őket, mivel több fajuk növényi vírusokat is terjeszt. A Longidoridae családba 8 nemet sorolunk, és azokat két alcsaládba csoportosítjuk. A Longidorinae alcsaládba tartozó *Longidorus* génsz hazai előfordulásával foglalkozó szakirodalom az Európában megtalált 73 fajtól eddig hét fajt említ (*Longidorus elongatus* (De Man, 1876), *L. attenuatus* (Hooper, 1961), *L. profundorum* (Hooper, 1966), *L. juglandicola* (Liskova, Robbins and Brown 1997), *L. goodey* (Hooper, 1961), *L. juvenilis* (Damasso, 1961), *L. distinctus* (Lamberti, Choleva and Agostinelli, 1983)). A fajok azonosítása elsősorban alaktani bélyegek vizsgálatán alapul, azonban a magas variabilitás különböző fajok számos karaktere között jelentős átfedéshez vezet. A morfológiai és molekuláris diagnosztikai módszerek kombinációja megoldást jelenthet a nemzetség fajainak azonosítására.

Célkitűzésünk volt, hogy morfológiai és genetikai vizsgálatokkal igazoljuk a *Longidorus* nem 3 újabb fajának hazai jelenlétét és ezzel hozzájáruljunk a génsz hazai fajok azonosításához.



1. ábra A 3 újabb *Longidorus* faj jelenlegi bizonyított magyarországi előfordulása. Jelmezárzat: *L. macrosoma* Hooper 1961, *L. leptoccephalus* Hooper 1961, *L. moesicus* Lamberti, Choleva and Agostinelli, 1983

Anyagok és módszerek

Fonálféreg kinyerése a talajból

Az NTAI Növény-egészségügyi és Molekuláris Biológiai Laboratórium a szőlő, gyümölcs és bogos szaporítóanyag teleptést megelőző, növényegészségügyi vizsgálatra beérkezett talajmintákban folyamatosan vizsgálja a Longidoridae családba tartozó vírusvektor fonálféreg fajok előfordulását. A minták gyűjtése 1 ha terület nagyság alatt 20, felette 40 almintavételi helyről, kétféle talajmélységből, 0-30 cm-es és 30-60 cm-es rétegéből történik.

A kinyerés menete: mintaként 4x50 cm talaj feloldogása történt Oostenbrink talajmosó készülékben (2. ábra). Az így kapott, még szennyezett fonálféreg szuszpenziót Baermann-tölcséres módszerrel tisztítottuk tovább. A futtatási idő 24 óra volt.

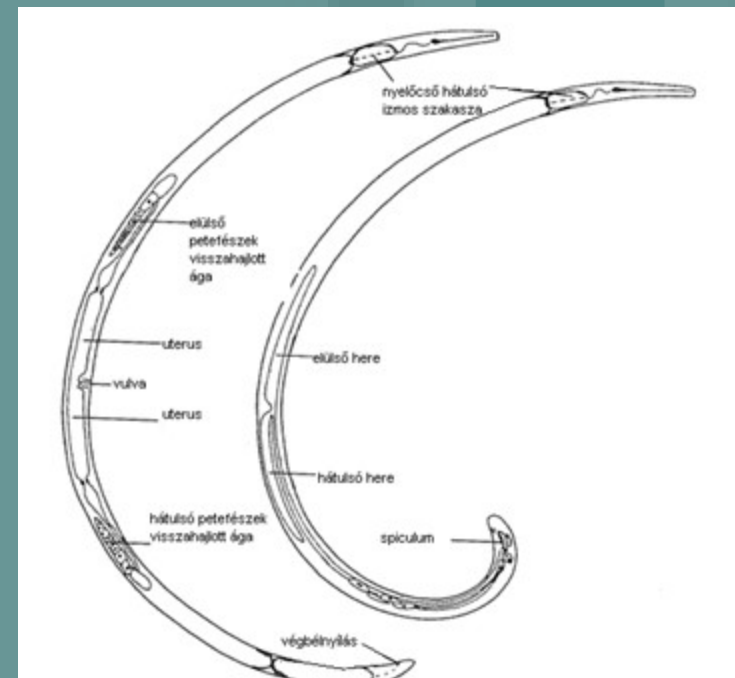


2. ábra Oostenbrink talajmosó készülék

Morfológiai vizsgálat

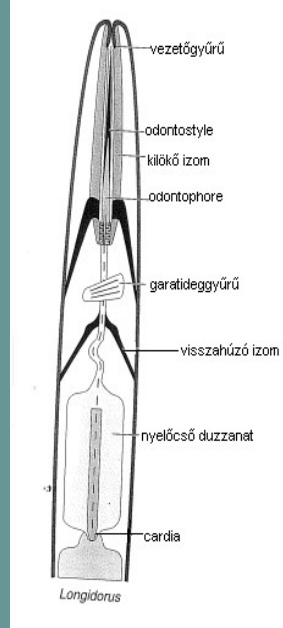
A morfológiai identifikációs vizsgálatához szükséges tartós preparátumok elkészítése a kinyert állatok előlése és fixálása (forró, 80-85°C-os FAA oldatban) (Hooper, 1970) után „lassú glicerines” módszerrel (Southy, 1970) történik.

A *Longidorus* génszba tartozó fajok nagy testű és igen karcsú állatok. A kutikula többnyire teljesen sima, vékony. A fejvég csak ritkán különül el a nyaktájéktól, az ajkak kevéssé fejlettek. Az oldalszerv viszonylag kicsiny, keheyszerű. A szájszurony rendkívül nyúlánk és karcsú, tüszzerű, elülső vége többnyire rendkívül finoman elkeskenyedik, gyakran kissé hajlott (4. ábra). A nyelőső elülső szakasza viszonylag igen vékony, visszahúzott szorony mellett rendszeren kissé összecsavardott, a hátulsó szakasz általában rövid, izmos. A kardia kicsiny kúp alakú. A praerectum jól látható. A nő ivarszerv – egyes eset kivételével – páros, szimmetrikus, a vulva ajkai kitüszülésként alakult. A speculumok vaszkosak, gyengén hajlottak. A fark általában rövid. A hímek ritkábbak a nöstényeknél, sok populációban teljesen hiányozhatnak is (3. ábra).



3. ábra *Longidorus* fajok, nöstény és hím (Taylor and Brown, 1997)

A fajok meghatározásához a következő alaktani bélyegeket nyújtanak alapot: a testhossz, a fej, illetve az ajkak alakja, az oldalszerv alakja, a szájszurony hossza és szerkezete, a vezetőgyűrű helyzete, a nő ivarkészülék felépítése, a vulva helyzete, a speculumok alakja és nagysága, a preanális szemölcsök száma, valamint a fark alakja, abszolút és viszonylagos (analízis átmérőben kifejezett) hossza.



4. ábra *Longidorus* fajok elülső testvége (Taylor and Brown, 1997)

A fajok elkülönítésére tradicionális alaktani bélyegeken alapuló politomikus határozókulcsot (Qi-Wen Chen, 1997) és az eredeti fajleírásokat használtuk. A preparátumok vizsgálata Leica DM LB2 kutatómikroszkóp alatt (N=800-1000), a morfológiai adatok felvétele Leica IM 50 képalábrító programmal került kivételre.

Boag, B., Brown, D. J. F., 1976: C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes, Set 6, No. 88

Brown, D. J. F.; Boag, B.; 1975: C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes, Set 5, 67, pp 4 pp.

Chen, Qi-Wen; Hooper, David, J.; Loof, Pieter, A. A.; Xu, Jianhua, 1997: A revised polytomous key for the identification of species of the genus *Longidorus* Micoletzky, 1922 (Nematoda: Dorylaimoidea). *Fundamental and Applied Nematology* 20(1): 15-28

De Ley P., Félix M. A., Frisse L. M., Nadler S. A., Sternberg P. W., & Thomas W. K. (1999): Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Ophiolaimidae). *Nematology*, 1, 591–612. doi:10.1163/156854199008559

Edgar R.C. (2004): MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5(1)

Hooper, D. J. (1970): Handling, fixing, staining, and mounting nematodes. Pp. 39–54In: J. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes* 5th ed. London: Her Majesty's Stationery Office.

Kimura M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.

Morfológiai vizsgálat eredményei

Longidorus leptoccephalus Hooper, 1961

A *L. leptoccephalus* hőmérvét határolva C alakot vesz fel, főleg a hátulsó testvég hajlik befelé. A fej lekerekített, jellegzetesen keskeny, nagyon kismértékben különül el a mögötte lévő testtájéktól. A vezetőgyűrű távolsága a fejtől fele, kétharmada a test szélességénél. Az oldalszerv szimmetrikusan helyezkednek el, nyíllás pőrüsszerű. Az odontostyle hosszú, keskeny, az odontophore kb. kétharmada. A vulva a test közepe táján nyíló haránt rés. A nő ivarszerv páros, visszahajló. A praerectum kb. 10-szer olyan hosszú, mint az analízis testátmérő, a rectum rövidebb, mint a testátmérő. A fark dorzálisan lekerekített, jellegzetesen kúpos, 1-1,4-szerese a testátmérőnek (1. táblázat; 5. ábra). Hímet nem találtunk.

Tulajdonságok	Vasboldogasszony (2012.03.27, 2000.04.)		Alsónemesapáti (2012.04.)		Boag & Brown C.I.H Set 6, (1976)
	n=1	n=1	n=7 min-max	átlag	
L (mm)	4,02	4,26	3,87-4,43	4,043	5,0 (3,5-6,3)
a (L/testátmérő)	97,54	100,35	103,110-57	104,725	107 (74-137)
b (L/nyelőső hossza)	10,25	11,30	11,94-12,75	11,96	13,4 (8-20)
c (L/farokhossz)	113,80	116,40	81,47-104,5	98,06	116 (75-154)
c' (farokhossz/analízis testátmérő)	1,24	1,12	1,33-1,9	1,55	-
V (a fejtől a vulvára terjedő szakasz hossza a testhossz százalékában kifejezve)	54,50	52,66	49,53-16	50,95	53 (45-59)
Odontostyle	62,50	75,00	62,5-75	65,6	68 (58-78)
Odontophore	-	-	32,5-45	41,25	50 (30-62)
ogr (vezetőgyűrű távolsága a fejtől)	30,00	30,00	25-27,5	26,5	29 (25-32)

1. táblázat *Longidorus leptoccephalus* határozó bélyegeinek morfometriája és a vizsgált egyedek morfometriks adatai

Longidorus moesicus Lamberti, Choleva et Agostinelli, 1983

Nagy testű, karcsú állat. Hőmérvét határolva a test többé-kevésbé C alakúra hajlik. A fejtől, az oldalszerv kismértékben aszimmetrikusan helyezkednek el. Az odontostyle és az odontophore hossza, illetve a vezetőgyűrű távolsága a fejtől a *Longidorus* nemzetségre jellemző méreteket mutat. A vulva keresztirányú rés, a test közepe táján nyílik. A nő ivarszerv páros, visszahajló. A praerectum 9-18-szor olyan hosszú, mint az analízis testátmérő. A fark kúpos, vége lekerekített, mindkét oldalán két kutikulapórus látható (2. táblázat; 6. ábra). Hímet nem találtunk.

Tulajdonságok	Monostorapáti (2012.05)	Lamberti, Choleva & Agostinelli (1983)
L (mm)	8,1	7,2 (6,4-8)
a (L/testátmérő)	100,62	120 (96-147)
b (L/nyelőső hossza)	14,1	15,8 (13,8-18,8)
c (L/farokhossz)	177,8	170 (146-186)
c' (farokhossz/analízis testátmérő)	0,86	1 (0,8-1,2)
V (a fejtől a vulvára terjedő szakasz hossza a testhossz százalékában kifejezve)	53,46	53 (50-54)
Odontostyle	117,5	115-124 (119)
Odontophore	61	59-66 (63)
ogr (vezetőgyűrű távolsága a fejtől)	38,75	41 (37-48)

2. táblázat *Longidorus moesicus* határozó bélyegeinek morfometriája és a vizsgált egyed morfometriks adatai

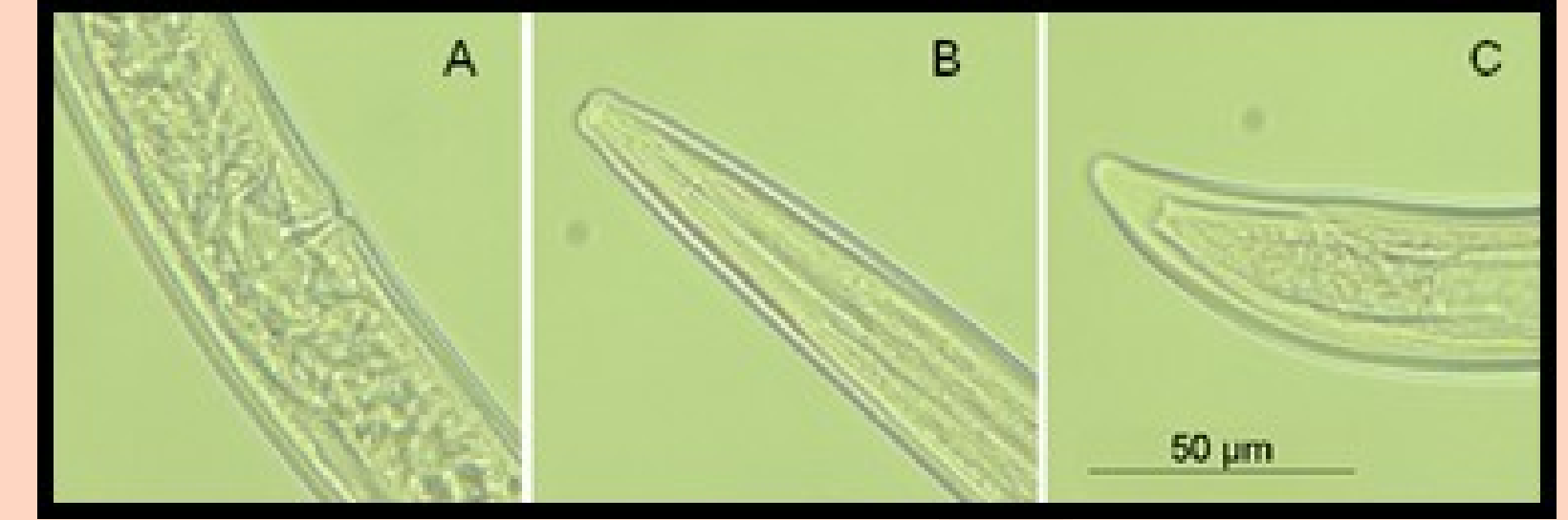
Longidorus macrosoma Hooper, 1961

Roppant nagy testű és feltűnően karcsú állat. A kutikula sima. A fej nem különül el, az ajkak laposak. Az oldalszerv kis pólussal nyílik. A praerectum 20-30-szor olyan hosszú, mint az analízis testátmérő. A vulva a test közepe táján nyílik, az ivarszerv páros és szimmetrikus. A fark félgömb alakú, rövidebb, mint az analízis szélesség, oldalain 2-3 kutikulapórus nyílik. Hatalmas teste, karcsúsága és farkalakja révén a nem többi fajtától jól megkülönböztethető (3. táblázat; 7. ábra). Hímet és lárvát nem találtunk.

Tulajdonságok	Zalaszentgrót 4236 hrsz. (1999.07)	Brown & Boag C.I.H Set 5, No. 67 (1975)
L (mm)	7,8	9,1 (6,8-12,0)
a (L/testátmérő)	110	92 (66-142)
b (L/nyelőső hossza)	14	15,0 (11,0-21,0)
c (L/farokhossz)	192,5	205 (148-290)
c' (farokhossz/analízis testátmérő)	0,7	-
V (a fejtől a vulvára terjedő szakasz hossza a testhossz százalékában kifejezve)	52,3	51 (41-59)
Odontostyle	135	133 (119-150)
Odontophore	72	74 (53-95)
ogr (vezetőgyűrű távolsága a fejtől)	45	41 (37-48)

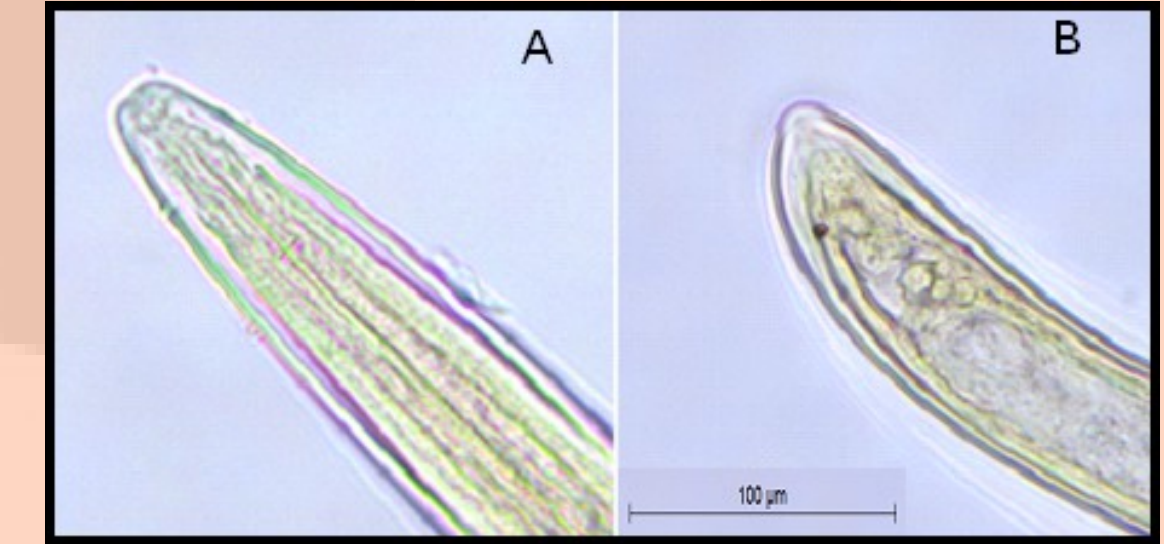
3. táblázat *Longidorus macrosoma* határozó bélyegeinek morfometriája és a vizsgált egyed morfometriks adatai

Az Alsónemesapátiból származó *L. leptoccephalus* morfológiai tulajdonságai és morfometriks adatai jól illeszkednek az alaktani bélyegeken alapuló politomikus határozókulcsban (Qi-Wen Chen, 1997) megadott értékekhez: A 45, B2, C3, D1, E3, F34, G2, H12, I1.



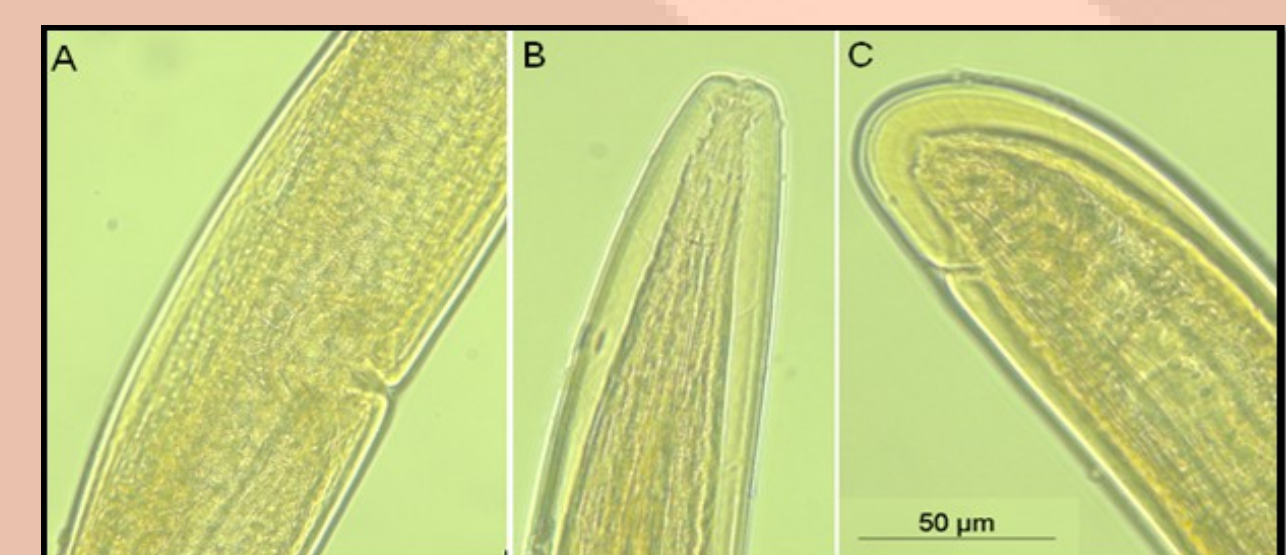
5. ábra *L. leptoccephalus* nöstény A: a női ivarmirigyek tájéka; B: elülső testvég; C: hátulsó testvég

Az egyed morfológiai tulajdonságai és morfometriks adatai jól illeszkednek az alaktani bélyegeken alapuló politomikus határozókulcsban (Qi-Wen Chen, 1997) megadott értékekhez: A5, B2, C3, D1, E3, F4, G3, H2, I1.



6. ábra *L. moesicus* lárvá A: elülső testvég; B: hátulsó testvég

A Zalaszentgrótról származó példány morfológiai tulajdonságai és morfometriks adatsora jól illeszkedik az alaktani bélyegeken alapuló politomikus határozókulcsban (Qi-Wen Chen, 1997) megadott értéksorhoz: A4, B4, C4, D3, E4, F4, G1, H1

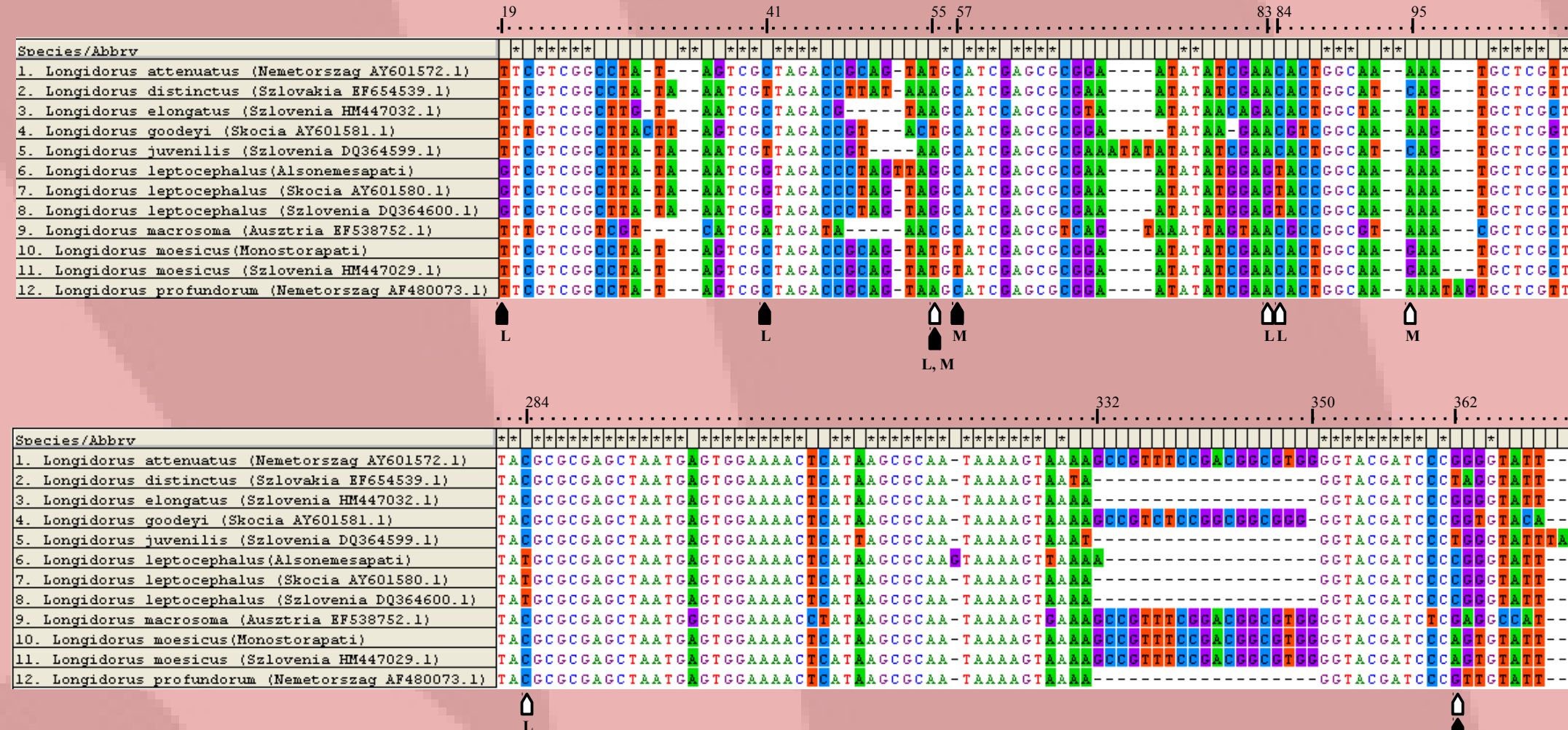


7. ábra *L. macrosoma* nöstény A: a női ivarmirigyek tájéka; B: elülső testvég; C: hátulsó testvég

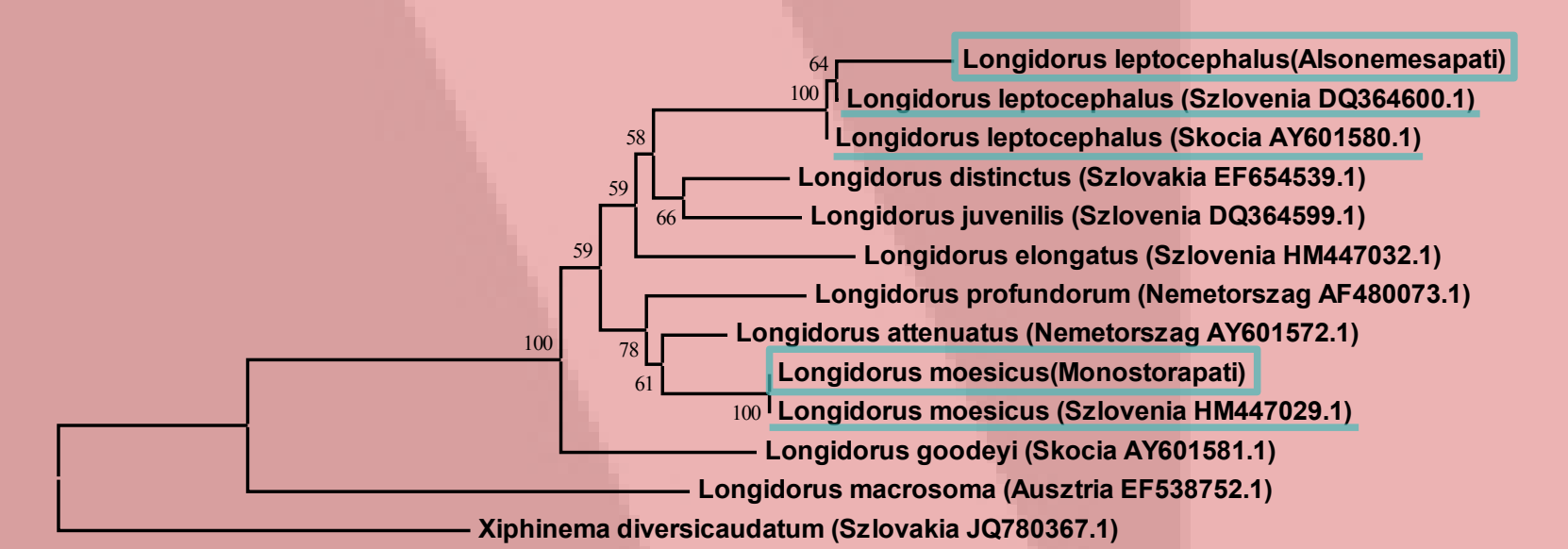
Genetikai vizsgálat eredményei

A *L. leptoccephalus* és *L. moesicus* egy-egy hazai példányából D2A-D3B primerpárral a rDNS 435bp hosszú szakaszát szaporítottuk fel. Filogenetikai elemzésünkhöz a két vizsgált faj európai populációinak NCBI GenBank-ben hozzáférhető összes ortológ szekvenciáját valamint a Magyarországon eddig igazoltan előforduló egyéb *Longidorus* fajok egy-egy európai egyedének ortológ szekvenciáját használtuk fel. Ezek többszörös illesztése után a 474 bp hosszú génszakaszon a *L. leptoccephalus* fajnál 10, a *L. moesicus* esetében 6 pozíciót találtunk amelyekben lejártott pontmutációknak (transzició/transzverzió) következtében a fenti fajok egyértelműen elkülöníthetőek az elemzésben résztvevő többi fajtól. A 332. pozíciótól a 350. pozícióig terjedő szakasz, illetve a 362. pozícióban kezdődő AGT bazisziplet jelenléte szintén csak a *L. moesicusra* jellemző (8. ábra).

A *L. leptoccephalus* és *L. moesicus* fajok esetében 3%-os volt a maximális intraspecifikus diverzitás. Mivel ez az érték jelentősen kisebb az általunk mért legalacsonyabb interspecifikus diverzitásnál (*L. moesicus* és *L. attenuatus* között 5% a szekvenciák eltérése/divergenciája), ezért vizsgálatunk alapján az Alsónemesapátiól gyűjtött példányt *L. leptoccephalusnak*, a Monostorapátiól gyűjtött pedig *L. moesicusnak* tekinthetjük (4. táblázat). Az Alsónemesapátiól gyűjtött *L. leptoccephalus* a többi európai populációból közös csoportot alkot, amely egyértelműen elkülöníthető (58%-os bootstrap támogatottsággal) a legközelebbi rokon faj, a *L. juvenilis* és a *L. distinctus* alkotja testvér csoporttól. A Monostorapátiól származó *L. moesicus* pedig a faj szlovéniai populációjával olyan közös ágon helyezkedik el, ami szintén egyértelműen elvág (61%-os bootstrap támogatottsággal) a legközelebbi rokon fajtól, a *L. attenuatustól* (9. ábra).



8. ábra 9 darab Magyarországon is előforduló *Longidorus* faj filogenetikai vizsgálatához felhasznált rDNS 288 D2-D3 régiójának illesztett szekvenciából kiemelt szakaszok. Jelmezárzat: L - *L. leptoccephalus* elkülönítésére alkalmas pozíció; M - *L. moesicus* elkülönítésére alkalmas pozíció; ▫ - transzició; ▨ - transzverzió



9. ábra A *L. leptoccephalus* és *L. moesicus* hazai populációinak filogenetikai kapcsolatai a génsz többi hazai fajtával (Neighbour-Joining módszer, K2+G nukleotid szubsztitúciós modell; Bootstrap ismétlések száma: 1000). Az NCBI GenBank-ből letöltött szekvenciák azonosító kódját a fajnevek után zárójelben feltüntetjük.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>L. attenuatus</i> (Nemtorazag AY601572.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
2. <i>L. distinctus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
3. <i>L. leptoccephalus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
4. <i>L. leptoccephalus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
5. <i>L. goodey</i> (Slovakia AY601581.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
6. <i>L. leptoccephalus</i> (Nemtorazag AF480073.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
7. <i>L. leptoccephalus</i> (Slovakia AY601572.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
8. <i>L. leptoccephalus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
9. <i>L. leptoccephalus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
10. <i>L. moesicus</i> (Monostorapáti)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
11. <i>L. moesicus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
12. <i>L. leptoccephalus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
13. <i>L. leptoccephalus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
14. <i>L. leptoccephalus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
15. <i>L. leptoccephalus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
16. <i>L. leptoccephalus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC
17. <i>L. leptoccephalus</i> (Slovakia EF54539.1)	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC

4. táblázat A filogenetikai vizsgálatban résztvevő példányok között a rDNS 288 D2-D3 régiójának elemzett szakasza alapján számított genetikai távolságok.

Következtetések

A morfológiai és genetikai elemzéseink eredményei megerősítették, hogy 2001-2013 között vizsgált hatóságai mintákban megtalálható volt a *L. leptoccephalus*, *L. macrosoma* és *L. moesicus*. A laboratóriumi vizsgálatok során azonosított három új faj közül a *Longidorus macrosoma* közvetve is károsít, a málna gyűrűs-foltos vírusának (RRSV) úgynevezett "angol törzsét" hordozza, ezért a 7/2010. (V.13.) FVM rendelet szerint cseresznye, málna, ribiszkefélek (*Ribes rubrum*), számoeca szaporítóanyag termesztésben tilalmazott vírusvektor fonálféreg.

További információk

A poszter anyagával, illetve a *Longidorus* nemzetség hazai helyzetével kapcsolatos további kérdéseket a következő címre várjuk: feketeneag@nebih.gov.hu. A NÉBIH Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság Növény-egészségügyi és Molekuláris Biológiai Laboratóriumának tevékenységéről további információk az alábbi linken érhetőek el: http://www.nebih.gov.hu/szakteruletek/szakteruletek/noveny_talajvedelmi_ig/szakteruletek/special/kkld

Kumari S. & Subbotin S.A. (2012): Characterization of *Longidorus helveticus* (Nematoda: Longidoridae) from the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology* 133, 923-933. doi:10.1007/s10680-012-9959-7

Lamberti F., Choleva B. and Agostinelli A., 1983. Longidoridae from Bulgaria (Nematoda, Dorylaimida) with description of three new species of Longidorus and two new species of Xiphinema. *Nematologia Mediterranea*, 11:49-72

SOUTHEY, J.F. (1986): Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, HMSO, London, 1-202.

Taylor, C. E., and D. J. F. Brown. 1997.