

NANO-MORFOLOGIJA *LAIMAPHELENCHUS BELGRADIENSIS* (NEMATODA: APHELENCHOIDIDAE) I KLJUČ ZA VRSTE RODA *LAIMAPHELENCHUS*

VIOLETA ORO, NENAD MILOVANOVIĆ, VIOLETA PETROVIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija

e-mail: viooro@yahoo.com

REZIME

Laimaphelenchus vrste su veoma sitne nematode, tako da se neki delovi njihovog tela mere nanometrima. Morfologija bazirana na anatomskim karakteristikama i merenjima pomoću optičkog mikroskopa je u prošlosti bila jedini način identifikacije i klasifikacije ovih organizama. U današnje vreme ovaj pristup je dopunjen nano-morfologijom uz pomoć scanning elektronske mikroskopije, kada se otkrivaju nepoznati morfološki detalji koji olakšavaju rad taksonomima. Nova vrsta roda *Laimaphelenchus* je skoro opisana. *Laimaphelenchus belgradiensis* je otkriven na crnom boru sa simptomima sličnim onima koje izaziva *Bursaphelenchus xylophilus*. Iako obe vrste pripadaju istoj familiji i slične su u morfološkom pogledu, ženke obe vrste poseduju vulvalni poklopac, i spikuli mužjaka su slični, one poseduju i značajne razlike. Osnovna morfološka karakteristika koja ih razlikuje je prisustvo pomoćnih organa na repu - tuberkula sa prstolikim proširenjima vidljivih samo uz pomoć scanning elektronskog mikroskopa. Uloga ovih tvorevina je u radu objašnjena i ključ za vrste je dat u ovom radu.

Ključne reči: *Laimaphelenchus belgradiensis*, nano-morfologija, tuberkule, prstolika proširenja

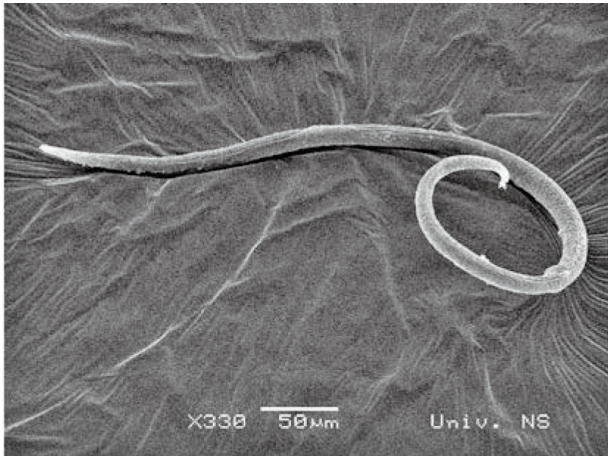
UVOD

Nematode roda *Laimaphelenchus* su veoma sitni organizmi. Neki delovi njihovog tela se mere nanometrima, tako da je identifikacija i klasifikacija ovakvih organizama kompleksan zadatak.

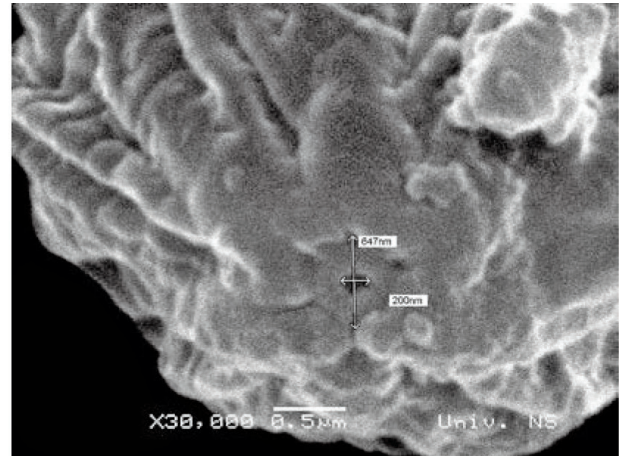
U prošlosti, glavni izvor identifikacije i klasifikacije je bila morfologija koja se zasnivala na anatomskim karakteristikama i merenjima. Danas, ovaj pristup se dopunjava "nano-morfologijom" koja se bazira na scanning elektronskoj mikroskopiji (SEM) i molekularnim podacima i filogeniji. *Laimaphelenchus belgradiensis* je skoro opisana vrsta (Oro, 2015). Ova nematoda je pronađena u Beogradu, na crnom boru (*Pinus nigra* Arnold) sa simptomima sličnim uvenuću borova koje izaziva karantinska vrsta *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner, 1934 (Nickle, 1981).

Iako obe vrste pripadaju istoj familiji i slične su u morfološkom pogledu, one poseduju i značajne razlike. *Bursaphelenchus xylophilus* je rasprostranjen u Aziji gde izaziva najveće štete i severnoj Americi, ali ga u Australiji nema ili se javlja sporadično kao u Africi. Ova karantinska vrsta je u Evropi utvđena

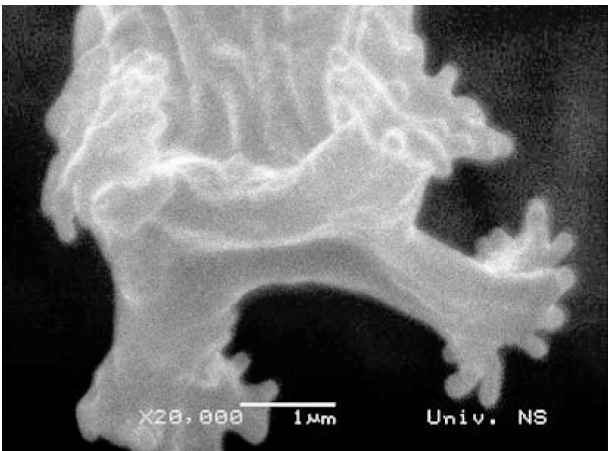
samo u Portugaliji i Španiji (EPPO, 2013). Vrste roda *Laimaphelenchus* su kosmopolitske i prisutne su na svim kontinentima, uključujući i Antarktiku (Peneva and Chipev, 1999). Mnoge *Bursaphelenchus* vrste su u prirodnoj asocijaciji sa insektima koji mogu biti njihovi vektori (poput *Monochamus* spp.) a nematode se mogu naći u sprovodnim sudovima četinara, dok su *Laimaphelenchus* vrste povezane sa mahovinama, lišajima i sličnim habitatima i nalaze se na kori, uglavnom bora. Ženke obe vrste poseduju vulvalni poklopac, osobinu koja nije karakteristična za druge Aphelenchidae a i spikuli mužjaka su slični. Osnovna morfološka karakteristika koja ih razlikuje je prisustvo pomoćnih organa na repu - tuberkula sa prstolikim proširenjima (projekcijama) kod roda *Laimaphelenchus*. Osobine koje izdvajaju *Laimaphelenchus belgradiensis* od ostalih sličnih vrsta su sledeće: anulirani cefalni region bez labijalnog diska, poligonalni medijalni bulbus, izdvojen vrh repa sa četiri tuberkule u kvadratnoj poziciji sa 10-12 prstolikih proširenja. Uloga tuberkula sa prstolikim proširenjima do sada, nije razjašnjena.



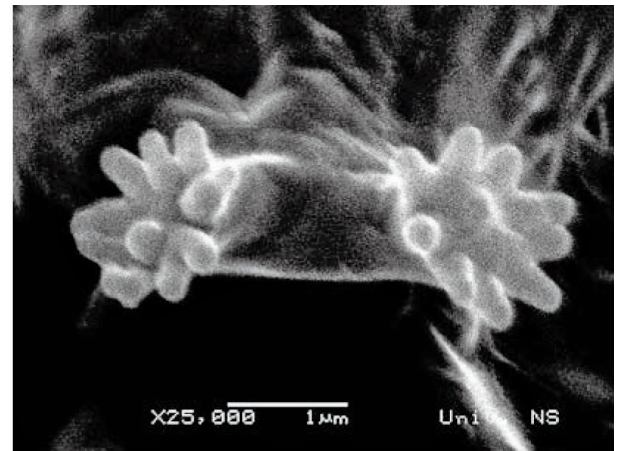
Sl. 1. *L. belgradiensis* habitus (SEM).
Fig. 1. *L. belgradiensis* habitus (SEM).



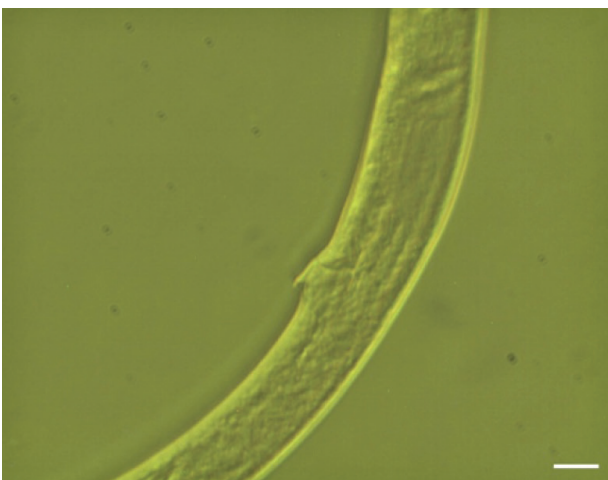
Sl. 2. Glava *L. belgradiensis* (SEM).
Fig. 2. *L. belgradiensis* head (SEM).



Sl. 3. *L. belgradiensis* rep (SEM).
Fig. 3. *L. belgradiensis* tail (SEM).



Sl. 4. Tuberkule i projekcije *L. belgradiensis* (SEM).
Fig. 4. Tubercles & projections of *L. belgradiensis* (SEM).



Sl. 5. Vulvalni region *L. belgradiensis* (10 μm).
Fig. 5. Vulval area of *L. belgradiensis* (10 μm).

MATERIJAL I METODE

Kora stabla i grančice crnog bora su sakupljene u plastičnim kesama i donete u Laboratoriju za nematologiju Instituta za zaštitu bilja. Parčići kore su isečeni na manje delove i potopljeni u vodu 24h. Posle 24h je pregledena suspenzija sa nematodama. Sledeći dan je postupak ponovljen. Sakupljene nematode iz suspenzije su fiksirane toplim FA 4:1 fiksativom i procesirane u glicerolu (Hooper, 1984). Za scanning elektronsku mikroskopiju (SEM) jedinke nematoda su isprane u seriji alkohola i sušene do kritične tačke (Shepherd & Clark, 1984). Dodatno su uparavane u vakuum uparivaču sa zlatom. SEM fotografije su napravljene uz pomoć Jeol JSM-6460 LV scanning elektronskog mikroskopa.

REZULTATI I DISKUSIJA

Morfološke karakteristike *Laimaphelenchus belgradiensis* su prethodno detaljno opisane (Oro, 2015). Veličina tela ovih nematoda je ispod 1mm (Sl. 1), kreće se od 737 do 940 μm . Visina glave je od 2–3 μm a širina 6–8 μm . Cefalni region je anuliran (prstenast), bez labijalnog diska sa šest spojenih usana. Na glavi se izdvajaju četiri cefalne papile i šest unutrašnjih papila (senzila) sensu Hooper and Clark (1980) koje okružuju usni otvor. Veličina usnog otvora i prečnika cefalnih papila je približno ista i iznosi 200 nm (Sl. 2). Veličina prečnika unutrašnjih papila je približno upola manja.

Dorzalna vulvalna usna koja formira poklopac ima na vrhu mali dodatak (Sl. 5) Morfološka karakteristika koja razlikuje rod *Laimaphelenchus* od ostalih rodova je prisustvo pomoćnih organa na repu - tuberkula sa prstolikim proširenjima (Sl. 3 i 4). Prstoliki dodaci su od 300–500 nm i mogu se jasno videti samo pri velikim uvećanjima scanning elektronske mikroskopije.

Ovi dodaci služe da prilikom ishrane, jedinke nematode se zakače za podlogu i izvijene u luku, cefalnim delom priđu do medijuma na kome se hrane, u ovom slučaju to su lišaji. Ovakav način ishrane im omogućava da u odnosu na druge ne-

matode ostanu na samom medijumu i imaju bolju kompetitornu sposobnost. Često delovi lišaja ostanu zakačeni na ovim nematodama i prilikom prepariranja. Ove nematode čija je veličina manja od 1mm sa delovima tela koji se mere nanometrima su za razliku od drugih kosmopolitske, uglavnom nalažene na četinarima i izuzetno otporne na isušivanje jer mogu da prežive u delovima biljnog tkiva više meseci. Do sada je utvrđeno 16 validnih vrsta: *L. australis* Zhao, Davis, Riley and Nobbs, 2006a; *L. belgradiensis* Oro, 2015; *L. cocuccii* Doucet, 1992; *L. deconincki* Elmiligy and Geraert, 1972; *L. heidelbergi* Zhao, Davis, Riley and Nobbs, 2007; *L. helicossoma* Peneva and Chipev, 1999; *L. pannocaudus* Massey, 1966; *L. patulus* Swart, 1997; *L. penardi* (Steiner 1914) Filipjev and Schuurmans Stekhoven, 1941; *L. pensobrinus* Massey, 1966; *L. phloesini* Massey, 1974; *L. persicus* Asghari, Pourjam, Heydari and Zhao, 2012; *L. preissii* Zhao, Davis, Riley and Nobbs, 2006b; *L. pini* Baujard, 1981; *L. simlaensis* Negi, Kalia, Walia and Bajaj, 2009 i *L. unituberculus* Bajaj and Walia, 2000. Ključ za identifikaciju ovih vrsta se zasniva na sledećim karakteristikama: prisustvu vulvalnog poklopca, broju incisura (lateralnih linija), broju tuberkula i projekcija odn. prstolikih proširenja na repu, dužini tela, dužini post-uterale kese (PUK) i prisustvu mužjaka.

Ključ za vrste roda *Laimaphelenchus*/Key to species of the genus *Laimaphelenchus*:

| | |
|---|---------------|
| 1. Vulvalni poklopac/Vulval flap: | |
| da/yes..... | 2 |
| ne/no..... | 9 |
| 2. Incisure/Incisures: | |
| 2..... | 3 |
| 3..... | 4 |
| 4..... | 7 |
| 3. Tuberkule/Tubercles: | |
| 4..... | pensobrinus |
| 1..... | helicossoma |
| 4. Mužjaci/Males: | |
| odsutni/absent..... | 5 |
| prisutni/present..... | penardi |
| 5. Vulva/Vulval shape: | |
| gornja usna bez malog dodatka/dorsal lip without small appendage..... | 6 |
| gornja usna sa malim dodatkom/dorsal lip with small appendage..... | belgradiensis |
| 6. PUK/PUS: | |
| 40–63 μm , kružni vaginalni mišići/round vaginal muscles..... | cocuccii |
| 36–42 μm , poligonalni vaginalni mišići/angular vaginal muscles..... | deconincki |
| 7. Tuberkule/Tubercles: | |
| 1..... | 8 |
| 4..... | persicus |

8. Projekcije/Projections:

| | |
|----------------|---------------|
| više/many..... | unituberculus |
| 3-5..... | simlaensis |
| 10..... | preissi |

9. Incisure/Incisures:

| | |
|--------|----|
| 3..... | 10 |
| 4..... | 11 |

10. Tuberkule/Tubercles:

| | |
|--------|-------------|
| 4..... | patulus |
| 1..... | heidelbergi |

11. Tuberkule/Tubercles:

| | |
|----------|-----------|
| 3-4..... | australis |
| 4..... | 12 |

12. Dužina tela/Body length:

| | |
|---------------------------|-------------|
| > 600 μm | pannocaudus |
| < 600 μm | 13 |

13. PUK/PUS:

| | |
|---|-----------|
| 18-20 μm , oocytes in a single row..... | pini |
| 28-50 μm , oocytes in multiple rows..... | phloesini |

ZAHVALNICA

Rad je pomognut sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, projekti TR 31018 i III 46007. Autori se posebno zahvaljuju M. Bokorovu iz Univerzitetskog centra za elektronsku mikroskopiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu za SEM fotografije.

LITERATURA

- Asghari, R., Pourjam, E., Heydari, R. and Zhao, Z. Q. (2012): *Laimaphelenchus persicus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from Iran. *Zootaxa*, 3325: 59–67.
- Bajaj, H. K. and Walia, K. K. (2000): A new species of *Laimaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Aphelenchina) from Kalesar forest, Haryana, India. *Indian Journal of Nematology*, 30: 88–90.
- Baujard, P. (1981): Revue taxonomic du genre *Laimaphelenchus* Fuchs, 1937 et description de *Laimaphelenchus pini* n. sp. *Revue de Nématologie*, 4: 75–92.
- Doucet, M. E. (1992): A new species of the genus *Laimaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nemata: Aphelenchina). *Fundamental and Applied Nematology*, 15: 1–6.
- Elmiligy, I. and Geraert, E. (1972): *Laimaphelenchus deconincki* n. sp. (Nematoda: Tylenchida). *Biologisch Jaarboek*, 39: 145–149.
- EPPO (2013): PM 7/4 (3) *Bursaphelenchus xylophilus*. *EPPO Bulletin*, 43: 105–118.
- Hooper, D. J. and Clark, S. A. (1980). Scanning electron micrographs of the head region of some species of Aphelenchoidea (Aphelenchina: Nematoda). *Nematologica*, 26, 47–56.
- Hooper, D. J. (1984): Handling, fixing, staining and mounting nematodes. In *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes* (ed. J.F. Southey) pp.59–80. (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK).

Massey, C. L. (1974): Biology and taxonomy of nematode parasites and associates of bark beetles in the United States. (US Department of Agriculture, Washington D.C.).

Negi, S., Kalia, D. C., Walia, K. K. and Bajaj, H. K. (2009): New Species of *Aphelenchoides* Fischer and *Laimaphelenchus* Fuchs (Nematoda: Aphelenchida) from pine twigs, Himachal Pradesh, India. Indian Journal of Nematology, 39: 192–197.

Oro, V. (2015): Description of *Laimaphelenchus belgradiensis* sp. nov. (Nematoda: Aphelenchoididae) and its phylogenetic and systematic position within Aphelenchoidoidea, European Journal of Plant Pathology, 142 (1): 13–23.

Peneva, V. and Chipev, N. (1999): *Laimaphelenchus helicosoma* (Maslen, 1979) n. comb. (Nematoda: Aphelenchida) from the Livingston Island (the Antarctic). Bulgarian Antarctic Research Life Science, 2: 57–61.

Shepherd, A. M. and Clark, S. A. (1984): Preparation of nematodes for electron microscopy. (In J.F. Southey (ed.), Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes (pp. 121–131) Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK).

Swart, A. (1997): Description of *Laimaphelenchus patulus* sp. n. (Nematoda: Aphelenchoididae) from *Pinus pinaster* Ait. in South Africa. African Plant Protection, 3: 23–28.

Zhao, Z. Q., Davies, K. A., Riley, I. T. and Nobbs, J. M. (2006a): *Laimaphelenchus australis* sp. nov. (Nematoda: Aphelenchina) from exotic pines, *Pinus radiata* and *P. pinaster* in Australia. Zootaxa, 1248: 35–44.

Zhao, Z. Q., Davies, K. A., Riley, I. T. and Nobbs, J. M. (2006b): *Laimaphelenchus preissii* sp. nov. (Nematoda: Aphelenchina) from native pine *Callitris preissii* in South Australia. Transactions of the Royal Society of South Australia, 130: 10–16.

Zhao, Z. Q., Davies, K. A., Riley, I. T. and Nobbs, J. M. (2007): *Laimaphelenchus heidelbergi* sp. nov. (Nematoda: Aphelenchina) from Victoria, Australia, and emendment of the diagnosis of the genus. Transactions of the Royal Society of South Australia, 131: 182–191.

(Primljeno: 02.03.2015.)

(Prihvaćeno: 23.03.2015.)

**NANO-MORPHOLOGY OF *LAIMAPHELENCHUS BELGRADIENSIS*
(NEMATODA: APHELENCHOIDIDAE) AND A KEY TO SPECIES
OF THE GENUS *LAIMAPHELENCHUS***

VIOLETA ORO, NENAD MILOVANOVIĆ, VIOLETA PETROVIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija
e-mail: viooro@yahoo.com

SUMMARY

Laimaphelenchus are very small nematodes, some parts of their body are measured in nanometers. In the past, the only way of identification and classification of these organisms were morphology based on anatomy and measurements. Nowadays, this approach is appended with nano-morphology with the help of scanning electron microscopy which reveal unknown morphological details facilitating the taxonomy work. A new species of the genus *Laimaphelenchus* is recently described. *Laimaphelenchus belgradiensis* is discovered on a black pine showing symptoms similar to those caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. Although both species belong to the same family and are similar in morphological sense, females of both species have the vulval flap and males have similar spicules, they possess significant differences. The main morphological difference is the presence of supplementary tail organs-tubercles with finger-like protrusions, visible only with scanning electron microscope. The role of the protrusions is explained and a key to species of the genus *Laimaphelenchus* is given in this paper.

Key words: *Laimaphelenchus belgradiensis*, nano-morphology, tubercles, finger-like protrusions

(Received: 02.03.2015.)

(Accepted: 23.03.2015.)