

Characterization of nematodes isolated from cockchafer *Melolontha* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs

Charakterystyka nicieni wyizolowanych z pędraków chrabąszcza *Melolontha* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae)

Anna Kreft¹, Waldemar Kazimierczak¹, Alicja Sierpińska², Henryk Skrzypek¹, Anna Skrabucha¹, Magdalena Dybała¹, Monika Dźwierzyńska¹

Summary

The main aim of the research was characterization of nematode species isolated from *Melolontha* sp. larvae. European cockchafer grubs were collected from the forest territory of Krasnystaw, Kozienice, Opoczno, Brzeziny, from areas with different light conditions, humidity and temperatures. The isolated nematodes were described based on light and scanning electron microscopy, supplemented with SSU rDNA (ribosomal deoxyribonucleic acid) sequence data.

The obtained results revealed that grubs were infected by the following nematode species: *Diplogasteroides magnus*, *Koerneria* sp. and *Rhabditis* sp. Most of the grubs infected by nematodes were collected on tree-covered areas, where the surface was shadowed and humidity was the highest.

Key words: *Diplogasteroides magnus*, *Koerneria* sp., *Rhabditis* sp., cockchafer

Streszczenie

Celem badań była charakterystyka nicieni porażających pędraki chrabąszcza *Melolontha* sp. w warunkach naturalnych. Pędraki chrabąszcza były zebrane na terenie nadleśnictw Krasnystaw, Kozienice, Opoczno i Brzeziny, na powierzchniach różniących się warunkami świetlnymi, wilgotnościowymi i temperaturowymi. Identyfikację gatunków przeprowadzono metodą sekwencjonowania fragmentów DNA (deoxyribonucleic acid) oraz metodami morfologicznymi przy zastosowaniu skaningowego mikroskopu elektro-nowego i mikroskopu optycznego z kontrastem interferencyjno-różnicowym.

Uzyskane wyniki wykazały, że pędraki były porażone przez *Diplogasteroides magnus* oraz *Koerneria* sp. i *Rhabditis* sp. Większość zainfekowanych przez nicienie pędraków została zebrana na powierzchniach zadrzewionych, czyli tam, gdzie powierzchnia gleby była dobrze ocieniona, a wilgotność najwyższa.

Słowa kluczowe: *Diplogasteroides magnus*, *Koerneria* sp., *Rhabditis* sp., *Melolontha* sp.

¹ Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Konstantynów 1F, 20-708 Lublin
kreft@kul.pl

² Instytut Badawczy Leśnictwa
Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

Wstęp / Introduction

Pędraki chrabąszcza *Melolontha* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae) są groźnymi szkodnikami rolniczymi, leśnymi oraz zieleni miejskiej. Dotychczas nie opracowano skutecznej i bezpiecznej dla środowiska metody zwalczania tego szkodnika, dlatego ważne są badania prowadzone w celu poznania naturalnych wrogów larw *Melolontha* sp.

Przeprowadzone badania miały na celu izolację i charakterystykę nicieni izolowanych z pędraków zebranych w terenie, występujących w różnych warunkach środowiskowych.

Materialy i metody / Materials and methods

Pędraki zebrano na terenie nadleśnictw: Krasnystaw, Kozienice, Opoczno i Brzeziny na pięciu typach powierzchni doświadczalnych w latach 2010 i 2011. W Nadleśnictwie Krasnystaw pędraki zebrano na uprawie nasiennej czereśni ptasiej.

W nadleśnictwach Kozienice, Opoczno i Brzeziny pędraki zebrano na powierzchniach o podobnym typie gleby (gleby rdzawe), składzie drzewostanowym (sosna i dąb) i udziale poszczególnych gatunków, różniących się warunkami świetlnymi, wilgotnościami i temperaturami: powierzchnie w drzewostanie o dużym zwarcie, powierzchnie w drzewostanie o zwarcu rozluźnionym, powierzchnie doświadczalne na niewielkich zrębach oraz powierzchnie doświadczalne na dużych zrębach.

Na każdej powierzchni doświadczalnej wykonano po 12 dołów próbných o rozmiarach: 1 m długości × 0,5 m szerokości × 0,5 m głębokości. Znalezione larwy chrabąszczy umieszczone pojedynczo w pojemnikach z glebą, po przewiezieniu do laboratorium przekładano do pojemników ze sterylizowanym piaskiem i marchwią. Hodowlę zebranych owadów prowadzono przez 6 tygodni, 2 razy w tygodniu oceniając ich zdrowotność. W niektórych martwych pędrakach stwierdzono występowanie nicieni, które izolowano, następnie namnażano i oznaczano metodami morfologicznymi, morfometrycznymi oraz molekularnymi.

Metody molekularne

Do identyfikacji gatunkowej wykorzystano sekwencję genu małej podjednostki rybosomalnego kwasu rybonukleinowego. Genomowe DNA (deoxyribonucleic acid) uzyskano z użyciem zestawu DNeasy Blood & Tissue Kit (firmy Qiagen). W łańcuchowej reakcji polimerazy (Polymerase Chain Reaction – PCR) z użyciem iProof™ High-Fidelity Master Mix zastosowano startery SSU 18A (5'-AAAGATTAAGCCATGCG-3') oraz SSU 26R (5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG-3') (Mayer i wsp. 2009) w celu amplifikacji fragmentu o wielkości 1 kb. Profil termiczny łańcuchowej reakcji polimerazy przedstawiał się następująco: reakcję zapoczątkowano wstępną denaturacją w 95°C przez 2 minuty, następnie przez 35 cykli powtarzano etapy: denaturacji DNA w 95°C

przez 15 sekund, przyłączenie starterów w 50°C przez 15 sekund oraz elongacji DNA w 72°C przez 2 minuty. Proces zakończył etap końcowej inkubacji w 72°C przez 7 minut (Mayer i wsp. 2007). Produkty reakcji PCR zostały oczyszczone z użyciem zestawu Clean-up (firmy A&A Biotechnology). Uzyskane w ten sposób DNA wykorzystano w reakcji PCR sekwencyjnego, produkty reakcji PCR zostały oczyszczone do sekwencjonowania i odczytano sekwencje w sekwencjonatorze kapilarnym. Uzyskane w ten sposób sekwencje były porównywane w bazie danych GenBank.

Metody mikroskopowe

Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM – Scanning Electron Microscope)

Próbki nicieni (larwy, samice i samce) do badań w skaningowym mikroskopie elektronowym zabito przez łagodne ogrzewanie w łaźni wodnej (3 min, 55°C). Nicienie utrwalano w 2% roztworze glutarodialdehydu (25% glutarodialdehyd rozcieńczony 0,1 M buforem kakodylowym, pH 7,2) przez dobę w temperaturze 4°C, po czym przepłukano 4-krotnie tym samym buforem i dotrwalano przez kolejną dobę 1% roztworem czterotlenku osmu (4% roztwór wodny OsO₄ rozcieńczony 0,1 M buforem kakodylowym, pH 7,2). Po wypłukaniu pozostałości OsO₄ tym samym buforem, próbki przeznaczone do badań odwodniono w serii rozcieńczeń alkoholu etylowego (10–99,8%, zmiany co 10 min), wymieniono alkohol na aceton (alkohol etylowy + aceton – 1:1, 3 zmiany czystego acetonu), a następnie wysuszono w punkcie krytycznym (Polaron Range CPD 7620) i napyłono około 20 nm warstwą stopu złota i palladu. Badanie nicieni obserwowano w skaningowym mikroskopie elektronowym LEO 1430 VP stosując napięcie przyspieszające 15 kV.

Mikroskop optyczny z kontrastem interferencyjno-różnicowym (DIC – Differential Interference Contrast)

Stadia rozwojowe nicieni przeznaczone do badań morfologicznych i morfometrycznych w mikroskopie świetlnym zabito w opisany wyżej sposób, po czym utrwalono w 2% roztworze formaliny handlowej rozcieńczonej roztworem Ringera. Po utrwaleniu (24–48 godzin w temperaturze pokojowej) próbki przepłukano 4-krotnie roztworem Ringera w celu usunięcia pozostałości utrwalacza, a następnie odwodniono, stosując zmodyfikowaną metodę Sienhorsta. Po odparowaniu alkoholu etylowego wykonano preparaty stałe, które obserwowano w kontraście Nomarsky'ego (Leica 5500B) (Lieven 2008; Giblin-Davis i wsp. 2009; Md i Irfan 2009). Wszystkie pomiary wykonano na utrwalonym materiale, wykorzystując pakiet oprogramowania LAS 3.7.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Badania morfologiczne i morfometryczne przeprowadzone za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) i mikroskopu optycznego z kontrastem interferencyjno-różnicowym (DIC) oraz identyfikacja gatunkowa metodą sekwencjonowania fragmentu DNA

wykazały, że izolowane nicienie z pędraków należą do gatunku *Diplogasteroides magnus* (Rhabditida: Diplogastrina) oraz do rodzaju *Koerneria* sp. (Rhabditida:

Diplogastridae) i *Rhabditis* sp. (Rhabditida: Rhabditidae) (tab. 1, rys. 1, 2).

Tabela 1. Morfometria (pomiary w μm) *D. magnus* i *Koerneria* sp.

Table 1. Morphometrics (measurements in μm) *D. magnus* and *Koerneria* sp.

Cecha Character	<i>Diplogasteroides magnus</i> (N = 10)			<i>Koerneria</i> sp. (N = 10)		
	♀	♂	larwa przetrwalnikowa dauer juvenile	♀	♂	larwa przetrwalnikowa dauer juvenile
Długość ciała (L) Body length	1406,7	1133,3	416,2	884,3	790,9	509,1
Maksymalna średnica ciała (MBW) Maximal body diameter	83,7	56,1	19,6	50,9	49,1	23,5
Długość trzonu (C) Corpus length	147,0	129,2	64,1	97,7	90,3	63,4
Długość gardzieli (P) Pharynx length	233,8	209,1	110,5	164,9	153,3	104,5
Otwór wydalniczy (EP) Distance anterior end – cervical (extretory) pore	205,9	190,9	90,7	134,3	133,8	98,7
Obrączka nerwowa (NR) Distance anterior end – nerve ring	177,8	157,8	74,2	119,8	108,1	75,1
Długość ogona (T) Tail length	142,5	109,6	73,5	122,4	68,6	59,7
Średnica ciała na wysokości odbytu (ABD) Anal body diameter	38,6	38,4	12,7	26,6	30,1	14,2
Szpara sromowa (V%) Vulva (% distance and to anus)	51,3	–	–	52,8	–	–
Długość szczecinek kopulacyjnych (SpL) Spicule length	–	59,1	–	–	49,1	–
Długość wodzidła (GuL) Gubernaculum length	–	25,2	–	–	26,6	–
A	16,9	20,3	21,2	17,4	16,5	21,7
B	6,0	5,5	3,8	5,4	5,2	4,9
C	10,0	10,4	5,7	7,3	11,6	8,8

W Nadleśnictwie Krasnystaw z pędraków zebranych w 2010 r. na uprawie nasiennej czereśni ptasiej wyizolowano z dwóch pędraków nicienie *Rhabditis* sp.

Najwięcej pędraków (osiemnaście) porażonych nicieniami zebrano na powierzchniach w Nadleśnictwie Kozienice:

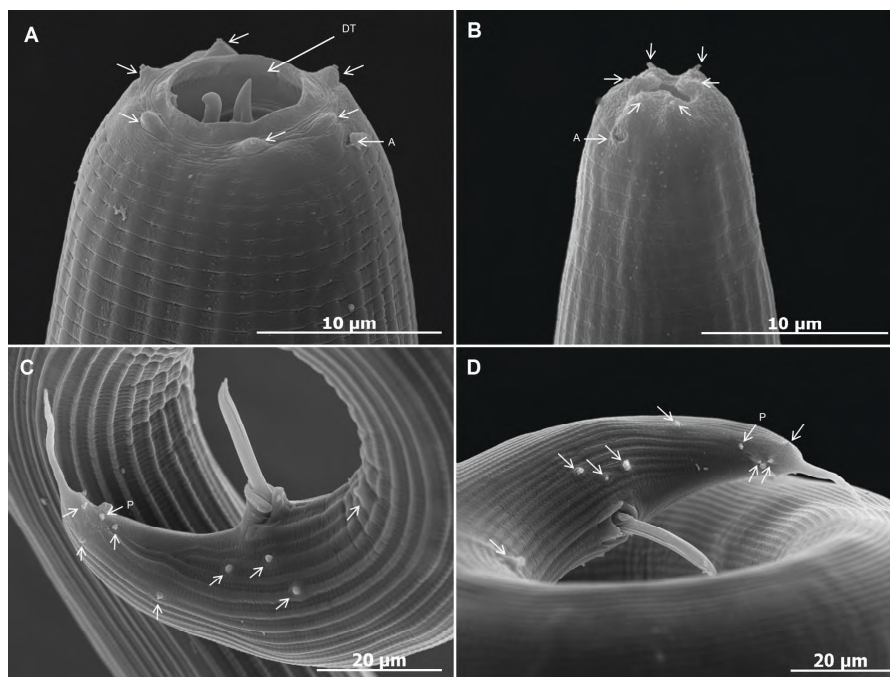
- na siedlisku lasu mieszanego świeżego z głównym gatunkiem lasotwórczym sosna (pierwsze piętro drzewostanu) i dąb (drugie piętro) zebrano cztery pędraki zainfekowane *D. magnus* i siedem zainfekowanych *Koerneria* sp.,
- na siedlisku lasu mieszanego świeżego z głównym gatunkiem lasotwórczym dąb, sosna i modrzew zebrano trzy pędraki zainfekowane *D. magnus* i cztery zainfekowane *Koerneria* sp.

Z pędraków zebranych w Nadleśnictwie Opoczno, na siedlisku boru świeżego oraz boru mieszanego świeżego z głównym gatunkiem lasotwórczym sosną z domieszką brzozy, buka i dębu z 11 pędraków wyizolowano nicienie *D. magnus*.

Z pędraków zebranych w Nadleśnictwie Brzeziny na siedlisku lasu mieszanego świeżego z głównym gatunkiem lasotwórczym sosny (pierwsze piętro drzewostanu) i dębu (drugie piętro) wyizolowano z dwóch pędraków nicienie *D. magnus*.

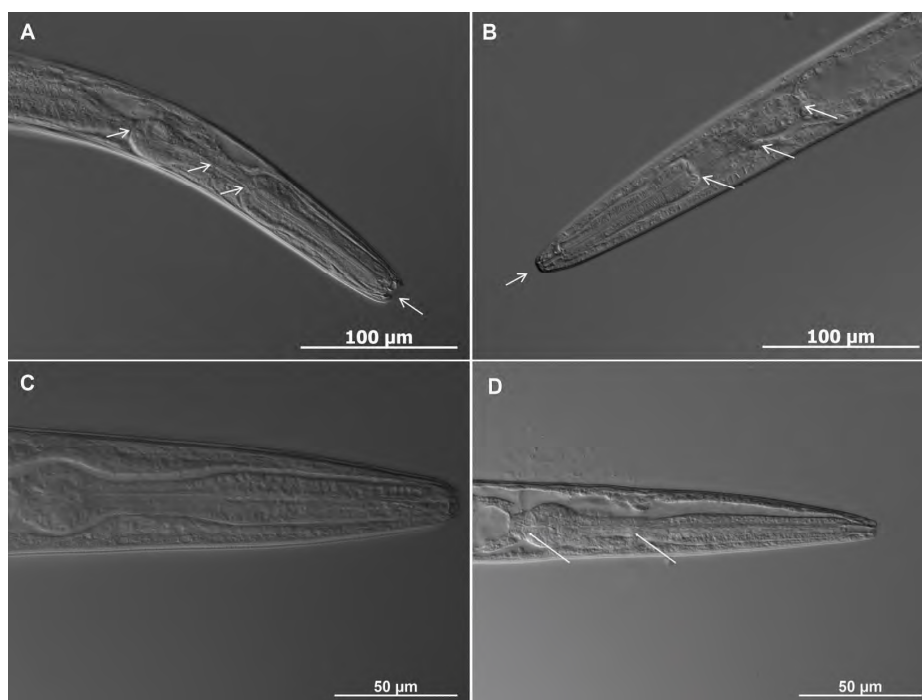
Najmniej nicieni występowało na powierzchniach dużych zrębów zupełnych. Spośród czterech typów powierzchni, na których prowadzono badania, na dużych zrębach było największe nasłonecznienie powierzchni gleby i najniższa wilgotność. Większość zainfekowanych przez nicienie pędraków została zebrana na powierzchniach zadrzewionych, czyli tam, gdzie powierzchnia gleby była dobrze ocieniona, a wilgotność najwyższa.

D. magnus został wyizolowany z pędraków oraz chrząszczy *Melolontha* sp. w południowych Niemczech (Kiontke i wsp. 2001; Manegold i Kiontke 2007) oraz z *Melolontha melolontha* w okolicach Tübingen w Niemczech (Mayer i wsp. 2009). *Koerneria* sp. zostały wyizolowane z *M. melolontha* w okolicach Usedom w Niemczech (Mayer i wsp. 2009). *Rhabditis* sp. został wyizo-



Rys. 1. A – *Koerneria* sp. – przedni odcinek ciała samicy (SEM); strzałki – brodawki wargowe, A – otwory amfidiów, DT – sztylety; B – *Diplogasteroides magnus* – przedni odcinek ciała samicy (SEM); strzałki – brodawki wargowe, A – otwory amfidiów; C – *Koerneria* sp. – tylny odcinek ciała samca (SEM); strzałki – brodawki płciowe, P – otwory fasmidów; D – *Diplogasteroides magnus* – tylny odcinek ciała samca (SEM); strzałki – brodawki płciowe, P – otwory fasmidów. Podziałki: jak na mikro-fotografiach

Fig. 1. A – *Koerneria* sp. – anterior end of the female (SEM); arrows – labial papillae, A – amphid's opening, DT – dental teeth; B – *Diplogasteroides magnus* – anterior end of the female (SEM); arrows – labial papillae, A – amphid's opening; C – *Koerneria* sp. – posterior end of the male (SEM); arrows – genital papillae, P – phasmid's opening; D – *Diplogasteroides magnus* – posterior end of the male (SEM); arrows – genital papillae, P – phasmid's opening. Scale bars: as on images



Rys. 2. A – *Koerneria* sp. – przedni odcinek ciała samca (DIC); B – *Diplogasterorides magnus* – przedni odcinek ciała samca (DIC); C – *Rhabditis* – przedni odcinek ciała samicy (DIC); D – przedni odcinek ciała larwy przetrwalnikowej (DIC). Podziałki: jak na mikro-fotografiach

Fig. 2. A – *Koerneria* sp. – anterior end of the male (DIC); B – *Diplogasterorides magnus* – anterior end of the male (DIC); C – *Rhabditis* – anterior end of the female (DIC); D – anterior end of the DJ (DIC). Scale bars: as on images

lowany z *Geotrupes stercorosus* (Scarabaeidae) (Mowlavi i wsp. 2009). Przytoczone prace wskazują, że wyizolowane nicienie tworzą częste związki z żukowatymi.

3. Najwięcej pędraków, z których wyizolowano nicienie zebrano w Nadleśnictwie Kozienice (18), a najmniej w Nadleśnictwie Brzeziny oraz w Nadleśnictwie Krasnystaw.

Wnioski / Conclusions

1. Większość zainfekowanych przez nicienie pędraków została zebrana na powierzchniach zadrzewionych, czyli tam, gdzie powierzchnia gleby była dobrze ocieniona, a wilgotność najwyższa.
2. Najmniej pędraków zainfekowanych przez nicienie zebrano na powierzchniach dużych zrębów zupełnych oraz na plantacji nasiennej.

Podziękowania / Acknowledgement

Materiały zbierano podczas realizacji grantu rozwojowego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju: „Bezpieczne dla środowiska metody ochrony ekosystemów leśnych zagrożonych przez chrabąszcze *Melolontha* spp.”, nr umowy z IBL: 12-0096-10/2010.

Literatura / References

- Giblin-Davis M.R., Ye W., Kanzaki N., Williams D., Morris K., Thomas W.K. 2006. Stomal ultrastructure, molecular phylogeny, and description of *Parasitodiplogaster laevigata* n. sp. (Nematoda: Diplogastridae), a parasite of fig wasps. *J. Nematol.* 38 (1): 137–149.
- Kiontke K., Manegold A., Sudhaus W. 2001. Redescription of *Diplogasteroides nasuensis* Takaki, 1941 and D. Magnus Völk, 1950 (Nematoda: Diplogastrina) associated with Scarabaeidae (Coleoptera). *Nematology* 3: 817–832.
- Lieven A.F. 2008. *Koerneria sudhausi* n. sp. (Nematoda: Diplogastridae); a hermaphroditic diplogastrid with an egg shell formed by zygote and uterine components. *Nematology* 1: 27–45.
- Manegold A., Kiontke K. 2001. The association of two *Diplogasteroides* species (Secernentea: Diplogastrina) and cockchafer (Melolontha spp., Scarabaeidae). *Nematology* 3 (6): 603–606.
- Mayer W., Herrmann M., Sommer R. 2007. Phylogeny of the nematode genus *Pristionchus* and implications for biodiversity, biogeography and the evolution of hermaphroditism. *BMC Evolutionary Biology* 7: 104–117.
- Mayer W., Herrmann M., Sommer R. 2009. Molecular phylogeny of beetle associated diplogastrid nematodes suggests host switching rather than nematode-beetle coevolution. *BMC Evolutionary Biology* 9: 212–223.
- Md M., Irfan A. 2009. Nematodes of the order Rhabditida from India. Description of *Diplogasteroides uriceus* sp. n. and *Rhabditidoides papillatus* sp. n. (Diplogastrina). *Nematology* 11: 541–550.
- Mowlavi G., Mikaeili E., Mobedi I., Kia E., Masoomi L., Vatandoost H. 2009. A survey of dung beetles infected with larval nematodes with particular note on *Copris lunaris* beetles as a vector for *Gongylonema* sp. in Iran. *Korean J. Parasitol.* 47 (1): 13–17.