

Reproductive competitiveness of the pine wood nematode *Bursaphelenchus mucronatus* and Polish populations of *B. xylophilus* develop in a common environment (*in vitro*)

Konkurencyjność reprodukcyjna *Bursaphelenchus mucronatus* i *B. xylophilus* we wspólnym środowisku rozwoju (*in vitro*)

Anna Filipiak

Summary

The objective of this study was to examine the reproductive competitiveness of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and a series of Polish populations of *B. mucronatus* (isolates: Mdz-01, NTo-01 i Wro-01) developing together in a common environment (*in vitro*).

The experiments did not show superiority of any of these nematodes. Both *B. xylophilus*, and *B. mucronatus* were able to dominate the second species. However, based on the analysis of the obtained results it could be stated that the females of *B. xylophilus* had a higher percentage share than the females of *B. mucronatus*.

Interestingly, it was also found that the offspring populations obtained from the cultures of *B. xylophilus* and *B. mucronatus* reared together were significantly greater as compared to the populations of each species reared separately. However, mechanisms of this phenomenon still remain unclear.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*, Polish populations of *B. mucronatus*, reproductive competitiveness

Streszczenie

Celem badań było określenie konkurencyjności reprodukcyjnej izolowanych z sosny, rodzimych populacji nieszkodliwego nicienia *Bursaphelenchus mucronatus*, w bezpośrednim kontakcie z kwarantannowym gatunkiem *B. xylophilus* we wspólnym środowisku rozwoju w warunkach *in vitro*.

W badaniach wykorzystano trzy lokalne populacje gatunku *B. mucronatus*: Mdz-01, NTo-01 i Wro-01 pochodzące, odpowiednio z drzewostanów nadleśnictw Międzychód, Nowy Tomyśl i Wronki oraz jeden izolat „China” kwarantannowego gatunku *B. xylophilus*.

Przeprowadzone doświadczenia nie wykazały przewagi żadnego z tych nicieni. Zarówno *B. xylophilus*, jak i *B. mucronatus* zdolne były do zdominowania drugiego gatunku. Na podstawie analizy wyników można jednak było stwierdzić, że samice *B. xylophilus* miały wyższy udział procentowy w porównaniu z samicami *B. mucronatus*. Stwierdzono ponadto, że liczebność populacji *B. xylophilus* oraz *B. mucronatus* rozwijających się na tym samym podłożu była większa, niż kiedy każdy z tych gatunków rozwijał się oddzielnie.

Słowa kluczowe: *Bursaphelenchus xylophilus*, polskie populacje *B. mucronatus*, konkurencyjność reprodukcyjna

Institut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Biologicznych Metod
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
A.Filipiak@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Kwarantanny niciel *Bursaphelenchus xylophilus* [(Steiner i Buhner 1934), Nickle 1970] jest sprawcą choroby wędnięcia sosny, dewastującą od ponad 100 lat drzewostany sosnowe na kontynencie azjatyckim (Japonia, Korea, Tajwan, Chiny), a od 1999 roku również w Europie (Portugalia, Hiszpania) (Mota i wsp. 1999).

Istniejące dane literaturowe wskazują, że w przypadku opanowania nowych terenów *B. xylophilus* wypiera z wspólnych środowisk rodzime populacje nieszkodliwego gatunku *B. mucronatus* (Mamiya i Enda 1979). Tak stało się w wielu rejonach Japonii, w których *B. xylophilus* doprowadził do masowego wymarcia sosen. Wcześniejsze badania wykazywały jednak, że relacje te uzależnione są często od specyficznych właściwości poszczególnych, konkurujących populacji (Kishi 1995; Burgermeister i Braasch 2003; Vincent i wsp. 2008; Cheng i wsp. 2009).

Dotychczasowe badania laboratoryjne przeprowadzane nad gatunkiem *B. mucronatus* wykazały, że w warunkach *in vitro* niciel ten rozwija się w takich samych przedziałach temperaturowych, jak kwarantanny szkodnik *B. xylophilus*. Optymalne warunki dla rozwoju *B. xylophilus* to obszary, w których średnia temperatura najcieplejszego miesiąca w roku wynosi od 25 do 30°C. Pełny cykl rozwojowy tego szkodnika w temperaturze 25°C trwa od 4 do 5 dni, w 15°C – 12 dni, w 20°C – 6 dni, a w 30°C – 3 dni (Tan i wsp. 2005; Wang i wsp. 2005).

W środowisku naturalnym *B. xylophilus* i *B. mucronatus* odżywiają się strzępkami rozwijających się w tym środowisku grzybów siniznowych, jak *Ophiostoma* spp. i niektórych innych gatunków (Maehara i Futai 2000; Maehara i wsp. 2006; Sriwati i wsp. 2007). W laboratoryjnych hodowlach *in vitro* natomiast najczęściej wykorzystywany jest *Botrytis cinerea* (Mota i wsp. 1999).

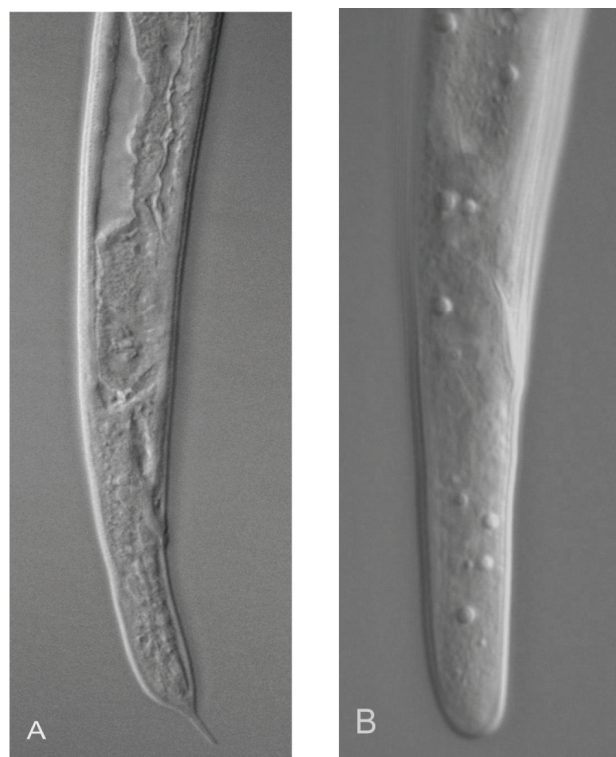
Celem podjętych badań było określenie konkurencyjności izolowanych z sosny, rodzimych populacji nieszkodliwego nicienia *B. mucronatus* w bezpośrednim kontakcie z kwarantannym gatunkiem *B. xylophilus* we wspólnym środowisku rozwoju w warunkach *in vitro*.

Materiały i metody / Materials and methods

W badaniach wykorzystano trzy lokalne populacje nicieni z gatunku *B. mucronatus*: Mdz-01, NTo-01 i Wro-01 pochodzące, odpowiednio z drzewostanów nadleśnictw Międzychód, Nowy Tomyśl i Wronki oraz jeden izolat „China” kwarantannego gatunku *B. xylophilus*, uzyskany z kolekcji Instytutu Juliusa Kühna – Federalnego Centrum Badań Roślin Uprawnych (Julius Kühn Institute Federal Research Centre for Cultivated Plants – JKI) w Braunschweig (Niemcy) (zezwoleń MRiRW na import dla celów badawczych).

Badania dotyczące konkurencyjności reprodukcyjnej między populacjami *B. mucronatus* i *B. xylophilus*, występującymi równocześnie w tym samym środowisku, prowadzone były *in vitro* w płytkach Petriego o średnicy 7 cm na podłożu PDA (Potato Dextrose Agar) lub Malt Agar przerośniętym grzybnia *B. cinerea*. Do każdej płytki hodowlanej wprowadzano równocześnie jednakową liczbę

osobników obydwóch gatunków (tj. po 50 osobników z każdego gatunku, 25 samic i 25 samców). W kontroli na każde podłoże wprowadzano po 100 osobników tylko jednego z badanych gatunków (50 samic i 50 samców). Każdy wariant doświadczenia realizowano w 10 powtórzeniach. Nicienie utrzymywano na podłożu w temperaturze $24 \pm 1^\circ\text{C}$ przez okres 10 dni, co określano jako jeden cykl hodowli nicieni *in vitro*. Po upływie tego czasu, liczono wszystkie nicienie. Następnie losowo pobierano 100 samic i oznaczano ich gatunek. Osobniki z ogonem zakończonym charakterystycznym wyrostkiem (tzw. mukron) klasyfikowano jako należące do gatunku *B. mucronatus* (rys. 1A), natomiast osobniki z ogonem szeroko zaokrąglonym, jako *B. xylophilus* (samice izolatu „China” mają szeroko zaokrąglony koniec ogona) (rys. 1B). Po zakończeniu obserwacji, z ekstrahowanej populacji pobierano losowo pipetą Pasteura 100 osobników, które przenoszono na nowe podłoże z grzybem *B. cinerea*, a po upływie 10 dni powtarzano wszystkie czynności, jak w poprzednim cyklu hodowlanym. Udział procentowy gatunków oceniano w każdym wariancie eksperymentu przez 3 kolejne cykle hodowlane w celu ustalenia tendencji zachodzących zmian, w zwiększonym udziale osobników badanych gatunków: *B. xylophilus* lub *B. mucronatus*.



Rys. 1. Kształt ogona samicy: A – *B. mucronatus*, B – *B. xylophilus*

Fig. 1. Tail of the female: A – *B. mucronatus*, B – *B. xylophilus*

Wyniki przeprowadzonych badań poddane zostały analizie statystycznej biorąc pod uwagę dwie cechy: proporcje udziału fenotypów *B. xylophilus* w porównaniu do *B. mucronatus* oraz średnią liczbę nicieni uzyskiwanych w poszczególnych cyklach rozwojowych.

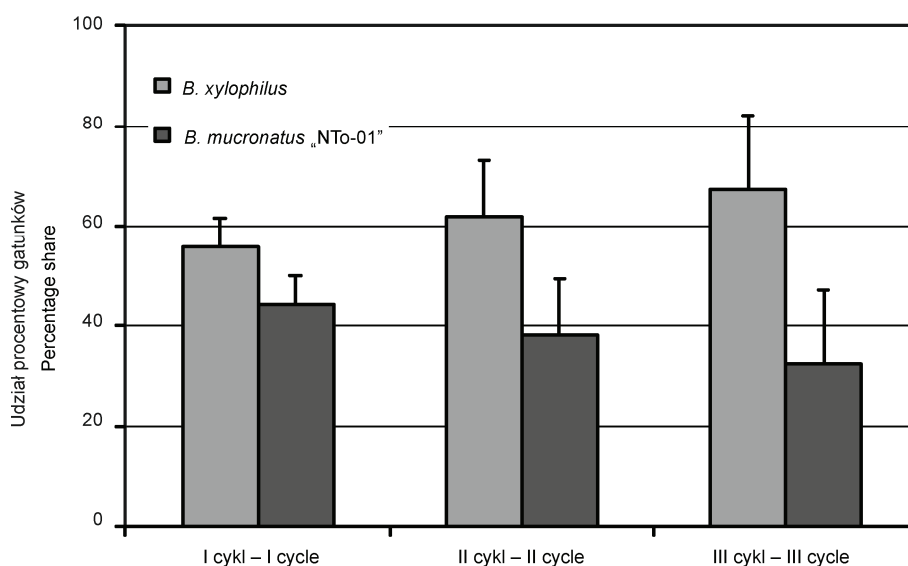
Udział procentowy *B. xylophilus* i trzech badanych populacji *B. mucronatus* w poszczególnych cyklach rozwojowych poddane zostały analizie wariancji, którą przeprowadzono na danych przekształconych według stopni Blissa. Istotność różnic badano przy zastosowaniu testu Tukeya przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Biorąc pod uwagę średnią liczbę nicieni uzyskanych w poszczególnych cyklach rozwojowych, dla I cyklu wykonano analizę wariancji, natomiast dla II i III analizę kowariancji przy zmiennej towarzyszącej, będącej liczbą nicieni uzyskanych w I cyklu badań, przy czym dla II i III cyklu wyznaczono średnie poprawione liczby nicieni.

Przeprowadzono również analizę regresji prostoliniowej średniej liczby uzyskanych nicieni w I i III cyklu hodowli przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Dla wszystkich trzech cykli badań zastosowano test Tukeya przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

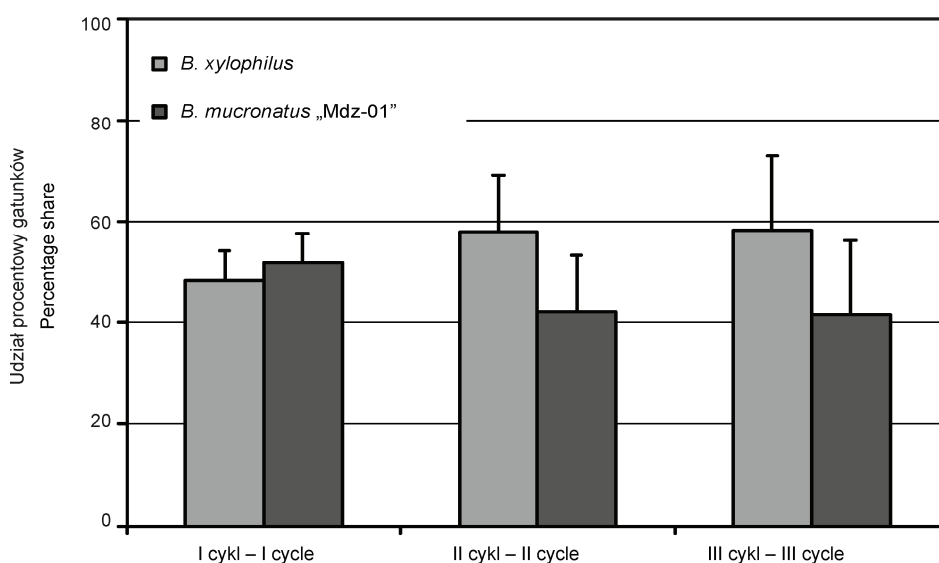
Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Przeprowadzone badania wykazały, że w czasie jednego cyklu hodowli *in vitro* (10 dni w temperaturze $24 \pm 1^\circ\text{C}$), nicienie rozwijały zwykle dwa pokolenia.



Rys. 2. Udział procentowy gatunków: *B. xylophilus* oraz *B. mucronatus* „NT0-01” w poszczególnych cyklach hodowli *in vitro* (średnia + błąd standardowy SE)

Fig. 2. Percentage share of *B. xylophilus* and *B. mucronatus* „NT0-01” in the individual cycles of cultures *in vitro* (mean + standard error SE)



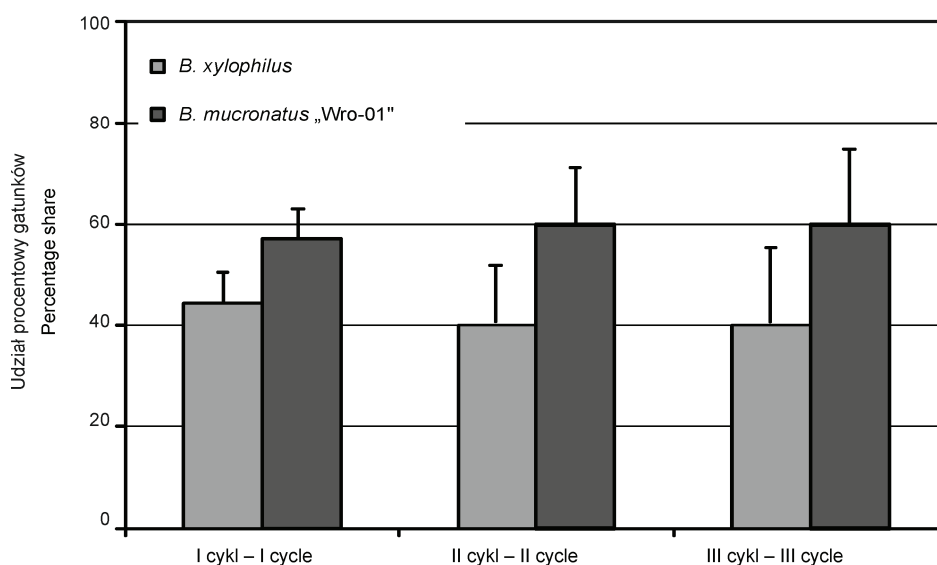
Rys. 3. Udział procentowy gatunków: *B. xylophilus* oraz *B. mucronatus* „Mdz-01” w poszczególnych cyklach hodowli *in vitro* (średnia + błąd standardowy SE)

Fig. 3. Percentage share of *B. xylophilus* and *B. mucronatus* „Mdz-01” in the individual cycles of cultures *in vitro* (mean + standard error SE)

Na podstawie analizy wyników można stwierdzić, że to *B. xylophilus* w większej liczbie powtórzeń wypierał *B. mucronatus*. Największą dominację *B. xylophilus* wykazał w stosunku do izolatu NTo-01. Po zakończeniu III-cyklowej hodowli nicieni tej kombinacji, średni udział gatunku *B. xylophilus* wynosił 67,5% (rys. 2). Populacja Mdz-01 była nieco bardziej konkurencyjna. Na końcu doświadczenia średni udział *B. xylophilus* wyniósł tutaj 58,4% (rys. 3). Jedyną populacją *B. mucronatus*, która zdołała zdominować *B. xylophilus* była Wro-01. Na końcu doświadczenia średni udział *B. xylophilus* wyniósł tylko 40% (rys. 4). Przeprowadzone badania wykazały, że dominacja osiągnięta w pierwszym cyklu hodowlanym utrzymywała się już do końca doświadczenia, bez względu

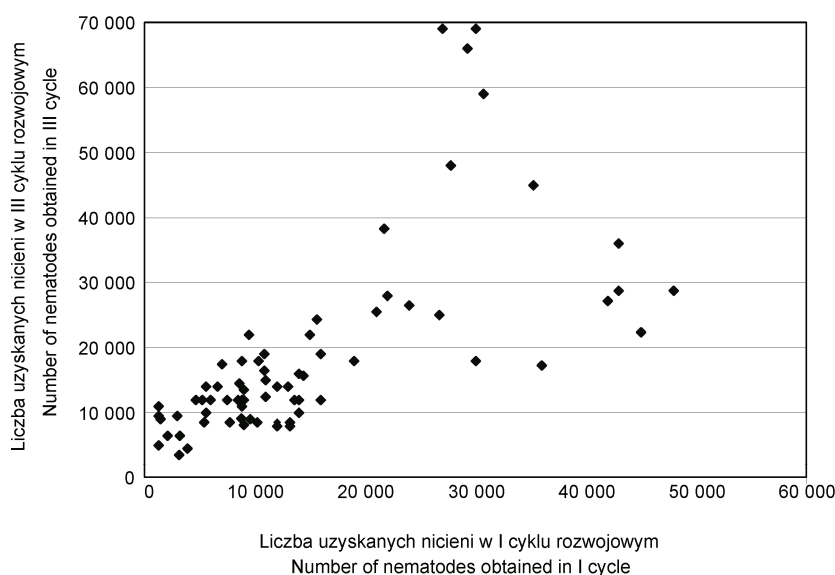
na to, którego gatunku to dotyczyło. Wyjątek stanowił wariant *B. xylophilus* + *B. mucronatus* (Mdz-01), gdzie po I cyklu hodowli stwierdzono niewielką przewagę udziału gatunku *B. mucronatus* (rys. 3).

Przeprowadzona analiza regresji dla ogólnej średniej liczby nicieni nowego pokolenia, uzyskanych w kolejnych cyklach hodowli *in vitro* populacji mieszanych, wykazała istotność związku związku prostoliniowego. Liczba nicieni uzyskanych w II oraz w III cyklu była wysoce istotnie skorelowana z liczbą nicieni uzyskanych w I cyklu. Wykazano ponadto wysoce istotny związek między liczbą nicieni uzyskanych w I i III cyklu hodowli *in vitro* (współczynnik determinacji wyniósł 44%) (rys. 5).



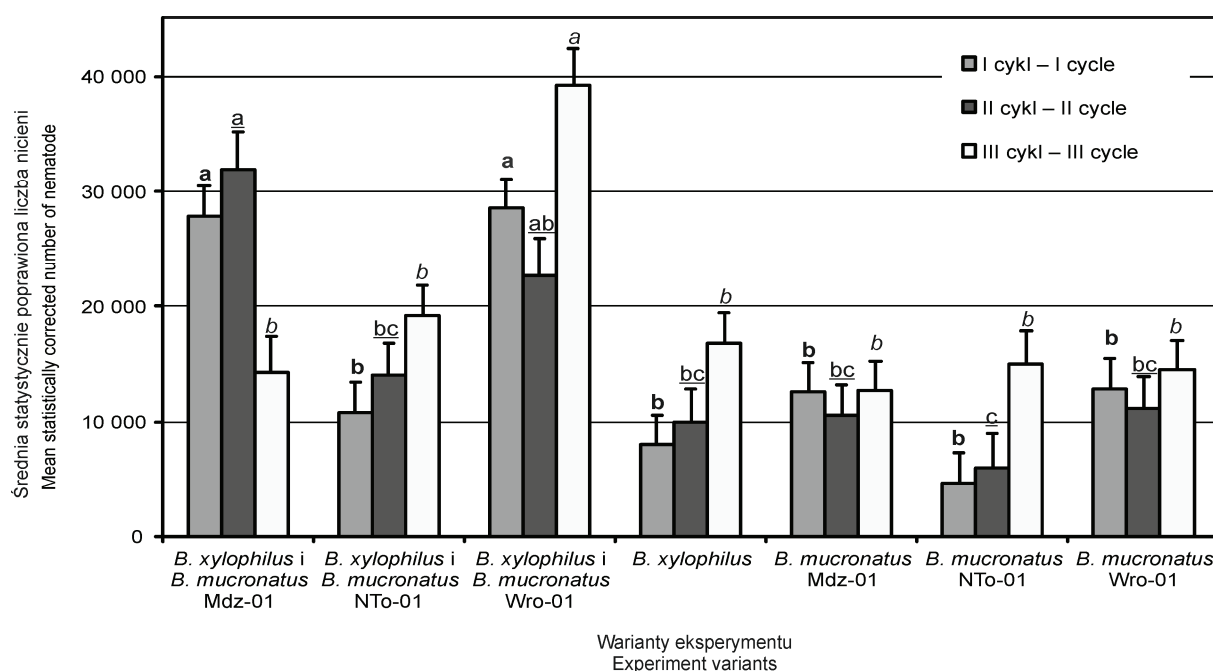
Rys. 4. Udział procentowy gatunków: *B. xylophilus* oraz *B. mucronatus* „Wro-01” w poszczególnych cyklach hodowli *in vitro* (średnia + błąd standardowy SE)

Fig. 4. Percentage share of *B. xylophilus* and *B. mucronatus* „Wro-01” in the individual cycles of cultures *in vitro* (mean + SE) (mean + standard error SE)



Rys. 5. Średnia liczba uzyskanych nicieni w I i III cyklu hodowli *in vitro*

Fig. 5. Mean number of nematodes obtained in I and III cycle of cultures *in vitro*



Rys. 6. Liczba nicieni uzyskanych w poszczególnych cyklach prowadzonych badań (średnia poprawiona + SE). Istotność różnic na podstawie testu Tukeya ($\alpha = 0,05$), gdzie:

a, b – średnie dla I cyklu opisane z co najmniej jedną taką samą literą nie różnią się istotnie,

a, b, c – średnie dla II cyklu opisane z co najmniej jedną taką samą literą nie różnią się istotnie,

a, b – średnie dla III cyklu opisane z co najmniej jedną taką samą literą nie różnią się istotnie

Fig. 6. The number of nematodes obtained in the individual cycles of cultures of the study (mean corrected + SE). The significance of differences based on Tukey's test ($\alpha = 0.05$), where:

a, b – means for the I cycle described with at least one the same letter are not significantly different,

a, b, c – means for the II cycle described with at least one the same letter are not significantly different,

a, b – means for the III cycle described with at least one the same letter are not significantly different

Stwierdzono również, że istotnie więcej osobników uzyskiwano w wariantach, w których na podłoże wprowadzano równocześnie gatunek *B. xylophilus* oraz *B. mucronatus*, niż gdy wprowadzano tylko jeden gatunek (kontrola) (rys. 6). Najwięcej nicieni w I cyklu uzyskano w wariantach *B. xylophilus* + *B. mucronatus* (Wro-01) oraz *B. xylophilus* + *B. mucronatus* (Mdz-01) (odpowiednio 28 545 i 27 836 osobników), niż w wariantach *B. xylophilus* + *B. mucronatus* (NTo-01) (odpowiednio 10 812,5 osobników). W II cyklu również najwięcej nicieni uzyskano w tych samych wariantach (odpowiednio 22 699 oraz 31 981 osobników), przy czym wariant *B. xylophilus* + *B. mucronatus* (Mdz-01) istotnie różnił się od wszystkich pozostałych. W III cyklu hodowli wariant *B. xylophilus* + *B. mucronatus* (Wro-01) był istotnie liczniejszy od wszystkich innych wariantów (39 216 osobników). Liczby nicieni uzyskanych dla tych samych wariantów w poszczególnych cyklach się różniły wyraźnie pomiędzy sobą.

Przeprowadzone badania dotyczące zdolności konkurencji o przestrzeń i pokarm pomiędzy *B. mucronatus* i *B. xylophilus* wykazały, że w poszczególnych powtórzeniach doświadczenia każdy z badanych nicieni mógł ograniczyć lub częściowo wyprzeć populację drugiego gatunku. Na podstawie uzyskanych wyników nie można

było jednak jednoznacznie stwierdzić, który z tych gatunków był uniwersalnie dominujący.

Wykonana analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w udziale poszczególnych gatunków w kolejnych pokoleniach mieszanych populacji między *B. xylophilus* oraz *B. mucronatus* dla wszystkich trzech badanych populacji. Tym samym nie stwierdzono większej konkurencyjności którejkolwiek z badanych populacji.

Uzyskane dotychczas wyniki wskazują, że zdolność skutecznego konkurencji o przestrzeń i pokarm kwarantannowego gatunku *B. xylophilus* z nieszkodliwym, rodzimym *B. mucronatus* może być uzależniona od indywidualnych cech poszczególnych populacji tego ostatniego gatunku (Vincent i wsp. 2008; Cheng i wsp. 2009). Obecność w środowisku populacji *B. mucronatus* może częściowo ograniczać rozwój populacji *B. xylophilus*. Zjawisko to miałoby największe znaczenie na terenach, gdzie naturalne występowanie populacji *B. mucronatus* mogłoby ograniczać skuteczność procesu zadowolenia się *B. xylophilus* w drzewostanie, w przypadku jego zawleczenia na nowe obszary. Poszczególne populacje *B. mucronatus* wykazują jednak różną skuteczność w tym zakresie. Niejasne do tej pory są przyczyny istotnej przewagi liczebności nowego pokolenia populacji mieszanych w porównaniu do populacji jednogatunkowych (kontroli).

Wnioski / Conclusions

1. Wyniki przeprowadzonych badań dotyczących zdolności konkutowania o przestrzeń i pokarm pomiędzy nicielami *B. mucronatus* i *B. xylophilus* nie wykazały jednoznacznej przewagi żadnego z badanych gatunków.
2. Na podstawie analizy wyników można jednak stwierdzić, że w większej liczbie powtórzeń to *B. xylophilus* wypierał *B. mucronatus*.
3. Wykazano, że jedyną populacją *B. mucronatus*, która w większości powtórzeń zdołała zdominować *B. xylophilus* była Wro-01.
4. Stwierdzono, że istotnie więcej osobników uzyskiwano w kombinacjach, kiedy na podłoże wprowadzano równocześnie gatunek *B. xylophilus* oraz *B. mucronatus* niż, gdy wprowadzano tylko jeden gatunek (kontrola).

Literatura / References

- Burgermeister W., Braasch H. 2003. Molecular evidence for *Bursaphelenchus xylophilus* x *B. mucronatus* hybridisation under experimental conditions. p. 145–153. In: The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (M. Mota, P. Vieira, eds). Proc. International Workshop. University of Évora, Portugal, August 20–22, 2001. Nematology Monographs and Perspectives (E.J. Brill, ed.). Volume 1. Leiden, The Netherlands, 291 pp.
- Cheng X.-Y., Xie P.-Z., Cheng F.-X. 2009. Competitive displacement of the native species *Bursaphelenchus mucronatus* by an alien species *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchida: Aphelenchoididae): a case of successful invasion. Biol. Invasions 11: 205–213.
- Kishi Y. 1995. The Pine Wood Nematode and the Japanese Pine Sawyer. Forest Pest in Japan. No. 1. Thomas Company Limited, Tokyo, Japan, 302 pp.
- Maehara N., Futai K. 2000. Population changes of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), on fungi growing in pine-branch segments. Appl. Entomol. Zool. 35: 413–417.
- Maehara N., Tsuda K., Yamasaki M., Shirakikawa S., Futai K. 2006. Effect of fungus inoculation on the number of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) carried by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). Nematology 8: 59–67.
- Mamiya Y., Enda N. 1979. *Bursaphelenchus mucronatus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and its biology and pathogenicity to pine trees. Nematologica 25: 353–361.
- Mota M.M., Braasch H., Bravo M.A., Penas A.C., Burgermeister W., Metge K., Sousa E. 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. Nematology 1 (7–8): 727–734.
- Nickle W.R. 1970. A taxonomic review of the genera of the Aphelenchoidea (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). J. Nematol. 2: 375–392.
- Sriwati R., Takemoto S., Futai K. 2007. Cohabitation of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and fungal species in pine trees inoculated with *B. xylophilus*. Nematology 9: 77–86.
- Steiner G., Buhner E.M. 1934. *Aphelenchoides xylophilus* n. sp., a nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. J. Agric. Res. 48: 949–951.
- Tan J., Ye J., Wu X., Zhu Y., Li Y. 2005. A study on disease development and early diagnosis of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, infection of Japanese black pine. Nematology 7: 481–485.
- Vincent B., Altemayer V., Roux-Morabito G., Naves P., Sousa E., Lieutier F. 2008. Competitive interaction between *Bursaphelenchus xylophilus* and the closely related species *Bursaphelenchus mucronatus*. Nematology 1: 219–230.
- Wang Y., Yamada T., Sakaue D., Suzuki K. 2005. Variations on the life history parameters and their influence on rate of population increase of different pathogenic isolates of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Nematology 7 (3): 459–467.