

**WYSTĄPIENIE MĄTWIKA AGRESYWNEGO
GLOBODERA PALLIDA (STONE, 1973) BEHRENS, 1975
(NEMATODA: HETERODERIDAE)
W DWÓCH PRZESYŁKACH ZIEMNIAKÓW JADALNYCH
SPROWADZONYCH DO POLSKI Z CYPRU**

WITOLD KARNKOWSKI¹, RENATA DOBOSZ², AGATA KACZMAREK³,
ALEKSANDRA OBRĘPALSKA-STĘPŁOWSKA², DOROTA KIERZEK²

¹ Główny Inspektorat Ochrony Roślin i Nasiennictwa
Centralne Laboratorium
Żwirki i Wigury 73, 87-100 Toruń
w.karnkowski@piorin.gov.pl

² Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

³ Scottish Crop Research Institute
Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, Scotland, Wielka Brytania

I. WSTĘP

Mątwik agresywny, *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens 1975 jest groźnym szkodnikiem ziemniaka podlegającym obowiązkowi zwalczania na mocy rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 21 lutego 2008 r. w sprawie zapobiegania wprowadzaniu i rozprzestrzenianiu się organizmów kwarantannowych (Dz.U. Nr 46, poz. 272, ze zm.). Mątwik agresywny może być wprowadzony do Polski wraz z roślinami, produktami roślinnymi i przedmiotami pochodzącymi z krajów, w których nicień ten występuje. Konieczne jest zatem podejmowanie przez Państwową Inspekcję Ochrony Roślin i Nasiennictwa działań kontrolnych w celu zapobiegania przeniknięciu tego agrofaga do Polski wraz z towarami znajdującymi się w obrocie międzynarodowym.

II. MATERIAŁ I METODY

Cysty *Globodera* spp. wyizolowano, w marcu i kwietniu 2010 roku, z prób gleby osypanej z dwóch partii ziemniaków jadalnych pochodzących z Cypru. Do ekstrakcji cyst użyto automatycznego ekstraktora cyst firmy MEKU. W obu próbach stwierdzono obecność około 100 sztuk cyst, spośród których po około 50 sztuk przeznaczono do identyfikacji przy użyciu metody mikroskopowej (morfologiczno-metrycznej), a następnie poddano testom molekularnym w Centralnym Laboratorium Głównego Inspek-

toratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa w Toruniu. Identyfikacja nicieni przy użyciu metody mikroskopowej obejmowała analizę cech morfologicznych cyst i znajdujących się w nich osobników młodocianych J_z , a przeprowadzono ją z wykorzystaniem publikacji Brzeskiego (1998). Do identyfikacji cyst wyizolowanych z gleby osypanej z pierwszej partii ziemniaków (próbna FF/136/10) użyto następnie testów PCR (polymerase chain reaction) według Bulmana i Marshalla (1997), według Zouhara i wsp. (2000) oraz testu PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) według Thiéry i Mugniéry (1996), natomiast do identyfikacji cyst wyizolowanych z gleby osypanej z drugiej partii ziemniaków (próbna FF/285/10) – testu PCR według Bulmana i Marshalla (1997) oraz testu PCR-RFLP według Thiéry i Mugniéry (1996). Do analiz przy użyciu metod molekularnych przeznaczono osobniki młodociane J_z znajdujące się w cystach. Kolejny etap badań obejmował przeprowadzenie w Międzyzakładowej Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu, sekwencjonowania produktów PCR specyficznych dla *G. pallida* oraz analizy porównawczej z zastosowaniem narzędzia BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) w bazie Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (National Center for Biotechnology Information – NCBI).

III. WYNIKI I DYSKUSJA

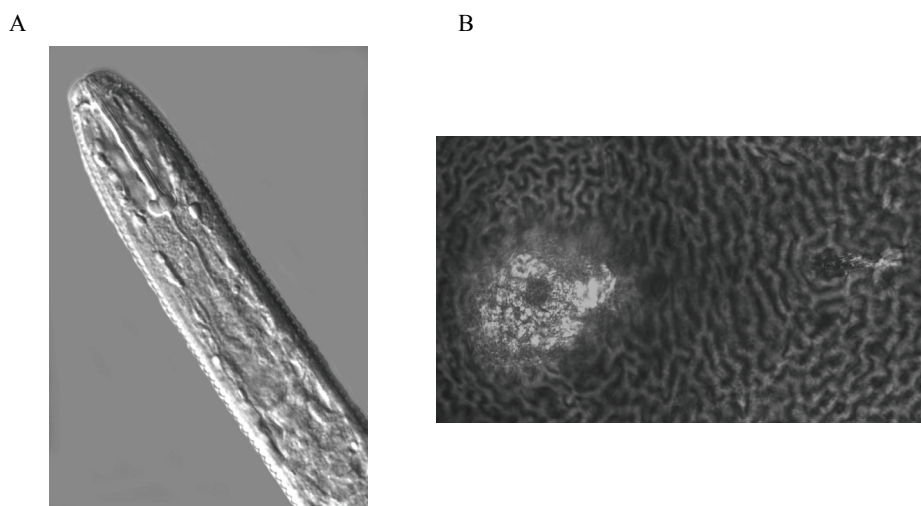
Cysty wyizolowane z obu prób gleby zidentyfikowano metodą morfologiczno-metryczną, jako posiadające cechy morfologiczne dwóch gatunków mątwików – mątwika ziemniaczanego *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich 1959 i mątwika agresywnego – *G. pallida* (tab. 1, rys. 1). Badania przy użyciu wcześniej opracowanych testów molekularnych (PCR oraz PCR-RFLP) potwierdziły występowanie obu wyżej wymienionych gatunków nicieni w badanych próbkach. Przeprowadzone sekwencjonowanie DNA uzyskanego w amplifikacji PCR (rys. 2) oraz jego analiza porównawcza wskazały obecność w badanych próbach osobników o 89% poziomie identyczności z sekwencjami *G. pallida* zdeponowanymi w Banku Genów Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI), a także mniej licznych o około 95% identyczności z sekwencjami tego gatunku nicienia. Pozwoliło to uznać, że badane DNA należy do tego gatunku *G. pallida*. Wyniki badań wskazują, że ziemniaki znajdujące się w obrocie międzynarodowym mogą stanowić istotną drogę przenikania mątwików tworzących cysty na ziemniaku, w tym mątwika agresywnego. Bardzo istotne jest kontynuowanie przez jednostki organizacyjne Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa działań w celu zapobiegania przenikaniu tych nicieni do naszego kraju wraz z przesyłkami materiału roślinnego obcego pochodzenia.

Interesujące jest podobieństwo sekwencji DNA badanych cypryjskich populacji *G. pallida* w większym stopniu do populacji południowoamerykańskich niż europejskich. Określenie źródła pochodzenia tych populacji wymagałoby przeprowadzenia szczegółowych studiów filogenetycznych.

Należy nadmienić, że dane literaturowe wskazują na obecność *G. pallida* na Cyprze (Philis 1981, 1995). Wcześniejsze wyniki identyfikacji nicienia metodą morfologiczno-metryczną zostały ostatnio potwierdzone przez wyniki analiz molekularnych (Christoforou i wsp. 2009).

Tabela 1. Średnie wartości cech diagnostycznych *G. pallida*
 Table 1. Mean values of diagnostic characters of *G. pallida*

Numer próby Sample number	Cechy morfologiczne cyst Morphological characters of cysts						Cechy morfologiczne osobników młodocianych J2 Morphological characters of J2 juveniles			
	odległość okienka od odbytu distance between fenestra and anus [μm]	średnica okienka fenestral diameter [μm]	indeks Graneka Granek's ratio	liczba fałdów oskórka między okienkiem a odbytem/punktowanie oskórka number of cuticular ridges between fenestra and anus/cuticular punctuation [+/-]	dlugość sztyletu [μm]	szerokość i kształt guzików sztyletu width and shape of stylet knobs [μm]	dlugość ogona tail length [μm]	dlugość przeźroczystej części ogona hyaline tail part length [μm]		
FF/136/10	50,00	25,0	2,00	10 -	23,7	4,9 (wgnębione - concave)	54,2	28,2		
FF/285/10	47,75	21,5	2,22	10 -	22,5	5 (wgnębione - concave)	55,4	28,6		



Rys. 1. *Globodera pallida*. A – przednia część ciała osobnika młodocianego J₂, B – okolice wulwy i odbytu

Fig 1. *Globodera pallida*. A – anterior part of J₂ juvenile, B – the area of fenestra and anus

```
TCCAGCTCTGAACCTTGTCCTCGCTTTAGGCATCATTACCCAAGTCGATACA
CAATTCCTACTACCTAACCTCGCTTGTGCACAGTTAGAGTCAGTTGTGGGCA
ACACCACATTGCCTCCGTTTTGTTTGTAGACGTGACACATTGCCCGCTATG
TTTGGGCTGGCACATTGATCAACAATGTATGGACAGCGCCCTGTGGGCACA
TAGTTGTAGGGGTGTAACCAATGTNTGTGGCCNANTGTGAGTACNAATANC
TGTTCCCC
```

Rys. 2. Uzyskana sekwencja produktu reakcji PCR dla *G. pallida* z próby FF/136/10

Fig. 2. Obtained sequence for PCR reaction product for *G. pallida* from FF/136/10 sample

IV. LITERATURA

- Brzeski M.W. 1998. Nematodes of Tylenchina in Poland and Temperate Europe. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa, 398 pp.
- Bulman S.R., Marshall J.W. 1997. Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). N.Z. J. Crop Hortic. Sci. 25: 123–129.
- Christoforou M., Tsaltas D., Papagiannis L., Neophytou G., Fellas P., Ioannou N. 2009. Identification and mapping of potato cyst nematodes in Cyprus using molecular tools and geographical information systems. p. 14. In: „Advances at Nematology”. A one-day conference at the Linnean Society at London. 15 December 2009. Program, abstracts & delegate list, 30 pp.
- Philis J. 1981. Species of potato cyst nematodes from the Xyloiphagou area in Cyprus. Nematol. Medit. 9: 57–61.
- Philis J. 1995. An up-dated list of plant parasitic nematodes from Cyprus and their economic importance. Nematol. Medit. 23: 307–314.

Thiéry M., Mugniéry D. 1996. Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of solanaceous plants. *Fund. Appl. Nematol.* 19: 471–479.

Zouhar M., Rysanek O., Kocova M. 2000. Detection and differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* by PCR. *Plant Protect. Sci.* 36: 81–84.

WITOLD KARNKOWSKI, RENATA DOBOSZ, AGATA KACZMAREK,
ALEKSANDRA OBRĘPALSKA-STĘPŁOWSKA, DOROTA KIERZEK

OCCURRENCE OF THE WHITE POTATO CYST NEMATODE
GLOBODERA PALLIDA (STONE, 1973) BEHRENS, 1975
(NEMATODA: HETERODERIDAE)
IN TWO CONSIGNMENTS OF TABLE POTATOES MOVED
TO POLAND FROM CYPRUS

SUMMARY

In March and April 2010, cysts from the genus *Globodera* were isolated, from soil attached to two lots of table potatoes originating from Cyprus. Cysts isolated from both soil samples (the sample FF/136/10 taken in March 2010 and the sample FF/285/10 taken in April 2010) revealed characters of two Potato Cyst Nematode species, namely *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959 and *G. pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975. Results of molecular tests (PCR and PCR-RFLP) confirmed occurrence of both above mentioned nematode species in analysed samples. Sequencing of DNA obtained during PCR amplification and its comparative analysis indicated on occurrence in tested samples of specimen with 89% level of identity and less frequent with about 95% level of identity with *G. pallida* sequenced available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Bank. It allowed to recognize that the tested DNA belonged to *G. pallida* species. Interesting is similarity of tested DNA of Cypriot populations of *G. pallida* to South American rather than European populations of this nematode.

Key words: *Globodera pallida*, Cyprus, quarantine pest, potatoes, interception