

Occurrence of the white potato nematode *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975 (Nematoda: Heteroderidae) on the territory of Poland

Wystąpienie mątwika agresywnego *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975 (Nematoda: Heteroderidae) na terytorium Polski

Witold Karnkowski¹, Agata Kaczmarek³, Renata Dobosz², Przemysław Wieczorek², Aleksandra Obrępańska-Stęplowska²

Summary

In June 2010, the presence of 40 cysts of nematodes from the *Globodera* genus was revealed in a soil sample collected from the field in the area of Opolskie Voivodeship in Poland. The results of the morphological and morphometric analyses revealed the presence of 30 cysts with features characteristic for the species *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959, and 10 cysts with features characteristic for the species *G. pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975. The results of molecular tests (PCR – Polymerase Chain Reaction and PCR-RFLP – Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) confirmed the presence of both nematode species in the sample. Sequence of rDNA fragment (ribosomal deoxyribonucleic acid) obtained in the PCR amplification and comparative analysis of the sequence revealed approximately 97% identity with a sequence characteristic for *G. pallida* deposited in the NCBI database (National Center for Biotechnology Information), which confirmed the presence of this species in the sample.

Key words: *Globodera pallida*, pale potato cyst nematode, Poland, quarantine pest

Streszczenie

W czerwcu 2010 r., w próbce gleby pobranej z pola na terenie województwa opolskiego stwierdzono obecność 40 cyst mątwików z rodzaju *Globodera*. Wyniki analiz morfologicznych i morfometrycznych wskazały na obecność 30 cyst o cechach gatunku *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959 i 10 cyst o cechach gatunku *G. pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975. Wynik przeprowadzonych testów molekularnych (PCR – Polymerase Chain Reaction i PCR-RFLP – Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) potwierdził obecność w tej próbce obu gatunków nicieni. Sekwencja fragmentu rDNA (rybosomalnego kwasu deoksyrybonukleinowego) uzyskanego podczas amplifikacji PCR oraz analiza porównawcza tej sekwencji wykazała około 97% identyczności z sekwencją charakterystyczną dla *G. pallida* zdeponowaną w bazie danych NCBI (Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej), co potwierdziło obecność tego gatunku nicienia w badanej próbce.

Słowa kluczowe: *Globodera pallida*, mątwik agresywny, Polska, organizm kwarantannowy

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 The James Hutton Institute
Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, Szkocja, Wielka Brytania

Wstęp / Introduction

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.).

W Polsce pierwsze ognisko mątwika agresywnego wykryto w 1986 roku na terenie obecnego województwa kujawsko-pomorskiego (Kornobis i Stefan 1991). Dzięki wprowadzeniu bezwzględnego zakazu uprawy roślin żywicielskich ognisko to zostało zlikwidowane. Kolejne dwa ogniska wykryto w tej samej miejscowości w 1998 roku w uprawach ziemniaka o powierzchni poniżej 1 ha, podczas urzędowych kontroli prowadzonych przez pracowników Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa (WIORiN) w Bydgoszczy. Średnie zagęszczenie cyst z żywą zawartością zebranych ze wszystkich trzech pól było stosunkowo niewielkie i wynosiło 3 sztuki na 100 ml gleby. Po pięcioletnim okresie zakazu uprawy roślin żywicielskich, w 2003 r., na żadnym z tych pól nie

wykryto cyst *G. pallida* z żywą zawartością, w związku z czym ogniska te uznano za zlikwidowane. W próbkach ponownie pobranych przez inspektorów WIORiN w Bydgoszczy jesienią 2007 r. również nie stwierdzono obecności cyst mątwików z rodzaju *Globodera* na żadnej z parceli. Ponadto, w 2010 r. stwierdzono obecność mątwika agresywnego w dwóch przesyłkach ziemniaków importowanych do Polski z Cypru (Karnkowski i wsp. 2011).

Praca przedstawia wyniki identyfikacji cyst *G. pallida* oraz współwystępującego gatunku *G. rostochiensis* (Wollenweber, 1923; Skarbilovich, 1959), z zastosowaniem metody morfologiczno-metrycznej oraz technik biologii molekularnej. Materiał pochodzi z ogniska wykrytego na terenie województwa opolskiego podczas urzędowej kontroli występowania mątwików tworzących cysty na ziemniaku.

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał do badań stanowiły cysty z rodzaju *Globodera* pochodzące z trzech prób gleby (100 ml każda) pobranych

Tabela 1. Wartości parametrów cech diagnostycznych *G. pallida* i *G. rostochiensis* (wartości średnie i zakres)

Table 1. Values of parameters of diagnostic characters for *G. pallida* and *G. rostochiensis* (means and range)

Gatunek nicienia i numer próbki Nematode species and sample number	Cechy morfologiczne cyst (10 cyst) Morphological characters of cysts (10 cysts)				Cechy morfologiczne osobników młodocianych J ₂ (20 osobników) Morphological characters of J ₂ juveniles (20 specimens)			
	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 [+/-]	długość sztyletu stylet length [μm]	szerokość i kształt guzików sztyletu width and shape of stylet knobs [μm]	długość ogona tail length [μm]	długość hyalinowej części ogona hyaline tail part length [μm]
<i>Globodera pallida</i> próbka – sample FF/2942/10	47,5 (45–50)	19,5 (19–20)	2,44 (2,37– 2,45)	14,3 (14–15) +/-	22,7 (22–23)	4 (wgłębione i zaokrąglone) (concave and rounded)	53,0 (51–54)	26,4 (25–28)
<i>Globodera rostochiensis</i> próbka – sample FF/2941/10	77,2 (51–91)	16,8 (15–18)	4,56 (3,04– 5,05)	16,6 (15–19) –	20,0 (20)	3 (zaokrąglone) (rounded)	49,5 (46–55)	25,8 (21–28)
<i>Globodera rostochiensis</i> próbka – sample FF/2942/10	81,7 (76–87)	17,8 (17–18)	4,63 (4,56– 5,12)	16,0 (15–17) –	20,5 (20–21)	3 (zaokrąglone) (rounded)	46,1 (44–48)	23,6 (21–25)
<i>Globodera rostochiensis</i> próbka – sample FF/2943/10	108,3 (85–150)	19,8 (19–21)	5,45 (4,47– 7,14)	19 (17–21) +/-	20,6 (20–23)	3 (zaokrąglone) (rounded)	47,0 (42–51)	25,0 (24–26)
<i>Globodera rostochiensis</i> próbki – samples FF/2941/10– FF/2943/10	86,9 (51–150)	17,8 (15–21)	4,85 (3,04– 7,14)	16,9 (14–21) +/-	20,4 (20–23)	3 (zaokrąglone) (rounded)	47,5 (42–54)	24,7 (21–28)

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR oraz PCR-RFLP
Table 2. Sequence of primers used in PCR and PCR-RFLP reactions

Starter Primer	Sekwencja primerów Primer sequence	Gatunek Species	Wielkość produktu (pz) Amplicon size (bp)	Referencje References
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	starter uniwersalny universal primer	–	Bulman i Marshall 1997; White i wsp. 1990
PITSp4	5'-ACAACAGCAATCGTCGAG-3'	<i>G. pallida</i>	265	Bulman i Marshall 1997
PITSr3	5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3'	<i>G. rostochiensis</i>	434	Bulman i Marshall 1997
UNI	5'-GCAGTTGGCTAGCGATCTTC-3'	starter uniwersalny universal primer	–	Zouhar i wsp. 2000
GPA	5'-GGTGACTCGACGATTGCTGT-3'	<i>G. pallida</i>	391	Zouhar i wsp. 2000
GRO1	5'-TGTTGTACGTGCCGTACCTT-3'	<i>G. rostochiensis</i>	238	Zouhar i wsp. 2000
18S	5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3'	<i>Globodera</i> spp.	1200	Thiéry i Mugniéry 1996 Vrain i wsp. 1992
26S	5'-TTT CAG TCG CCG TTA CTA AGG-3'	<i>Globodera</i> spp.	1200	Thiéry i Mugniéry 1996 Vrain i wsp. 1992

do badań w ramach urzędowej kontroli przeprowadzonej przez pracowników Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa w Opolu w czerwcu 2010 roku. Materiał zebrano z pola o powierzchni 0,75 ha. Cysty pozyskano z gleby przy użyciu automatycznego ekstraktora cyst firmy MEKU. Identyfikacji gatunków dokonano w oparciu o szczegółową analizę diagnostycznych cech morfologicznych i morfometrycznych wyizolowanych cyst (odległość okienka od odbytu, średnica okienka, indeks Graneka, liczba fałdów oskórka między otworem odbytowym a najbliższą jemu krawędzią okienka, punktowanie oskórka w okolicy okienka i odbytu) oraz osobników młodocianych J₂ (długość sztyletu, kształt guzików sztyletu, długość ogona, długość hyalinowej części ogona) (tab. 1). W procesie analizy wykorzystano publikację Brzeskiego (1998) oraz materiały odniesienia – preparaty mikroskopowe cyst i osobników młodocianych J₂.

W pierwszej kolejności przeprowadzono test PCR (Polymerase Chain Reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy) według Bulmana i Marshalla (1997). Z uwagi na uzyskanie wyniku wskazującego na wystąpienie w jednej z próbek dwóch gatunków mątwików (*G. rostochiensis* i *G. pallida*), w celu potwierdzenia uzyskanych wyników analiz i zapewnienia ich większej wiarygodności materiał ten poddano dodatkowym analizom przy użyciu testu PCR według Zouhara i wsp. (2000), a także przeprowadzono test PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism – reakcja łańcuchowa polimerazy i analiza długości fragmentów restrykcyjnych) według Thiéry i Mugniéry (1996). Sekwencje starterów użytych w poszczególnych testach podano w tabeli 2. Ze względu na możliwość wykrycia przy użyciu powyższych testów molekularnych obu gatunków nicieni w ich mieszaninie oraz z uwagi na dużą liczbę analizowanych

cyst, w jednej probówce reakcyjnej umieszczano osobniki młodociane pochodzące z kilku cyst (maksimum 5 sztuk).

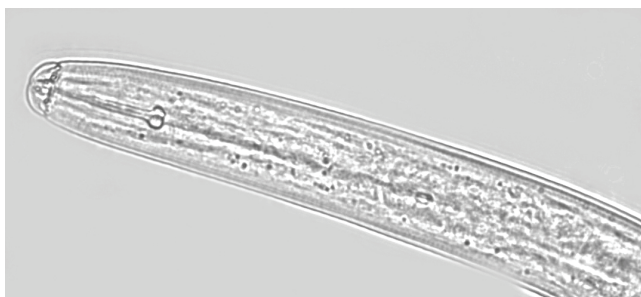
Cysty poddano następnie testom molekularnym w Centralnym Laboratorium Głównego Inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa. Izolację DNA (deoxyribonucleic acid) z cyst mątwików z zastosowaniem gotowego zestawu do izolacji DNA High Pure PCR Template Preparation Kit firmy Roche (nr katalogowy 1796828) (OEPP/EPPO 2009).

W celu potwierdzenia wyniku uzyskanego w Centralnym Laboratorium analizę DNA wyizolowanego z nicieni z jednej próbki (oznaczonej numerem FF/2942/10) przeprowadzono także w Pracowni Organizmów Kwarantannowych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie, stosując protokół Bulmana i Marshalla (1997). Jednocześnie, w Międzyzakładowej Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu przeprowadzono dla materiału pochodzącego z tej próbki sekwencjonowanie produktów PCR. W tym celu przeprowadzono na próbkach reakcję PCR stosując metodę Zouhara i wsp. (2000). Wykorzystując parę starterów specyficznych dla *G. pallida* (GPA/UNI) (tab. 2) uzyskano produkt obejmujący fragment sekwencji ITS1 rDNA. Produkty amplifikacji oczyszczano, ligowano do wektora pGEM-T-Easy Vector System (Promega), a mieszaniną ligacyjną transformowano komórki elektrokompetentne *Escherichia coli*. Następnie, z uzyskanych klonów bakteryjnych zawierających zrekombinowany plazmid prowadzono jego izolację i sekwencjonowanie.

Na podstawie uzyskanej sekwencji przeprowadzono analizę porównawczą przy wykorzystaniu narzędzia BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information – Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej).

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Na podstawie analizy morfologiczno-metrycznej w materiale wyizolowanym z próbek FF/2941/10 oraz FF/2943/10 wykryto wyłącznie cysty *G. rostochiensis* (Wollenweber, 1923; Skarbilovich, 1959) (rys. 1, 2).

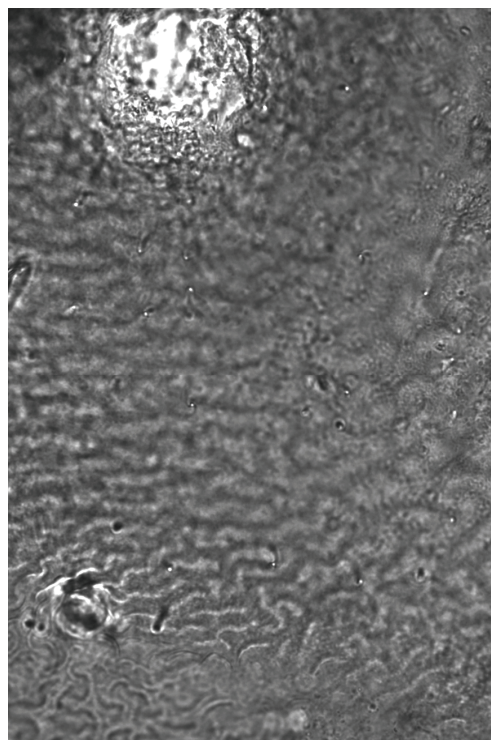


Rys. 1. Przednia część ciała osobnika młodocianego J₂ *G. rostochiensis*

Fig. 1. Anterior part of J₂ juvenile of *G. rostochiensis*

W materiale pochodzącym z próbki FF/2942/10, oprócz dominujących pod względem liczebności cyst *G. rostochiensis* (30 spośród 40 cyst), wykryto też 10 cyst *G. pallida* (rys. 3, 4). W tabeli 1. zamieszczono średnie wartości parametrów cech diagnostycznych cyst i osobników młodocianych J₂ obu gatunków oraz zakresy zmienności tych parametrów. Dane zamieszczone w tabeli 1. wskazują na to, że cysty *G. pallida* charakteryzują się mniejszą odległością okienka od odbytu, niższą wartością indeksu Graneka oraz mniejszą liczbą fałdów oskórka między okienkiem a odbytem w porównaniu do cyst *G. rostochiensis*. U osobników młodocianych *G. pallida* średnia długość sztyletu, szerokość jego guzików oraz średnia długość ogona i hyalinowej części ogona były wyższe niż u osobników młodocianych *G. rostochiensis*. Wartości średnie parametrów cech diagnostycznych cyst i osobników młodocianych J₂ wyznaczone dla populacji

każdego z gatunków znajdowały się w przedziale wartości średnich oraz zakresach zmienności charakterystycznych dla *G. rostochiensis* i *G. pallida* (Brzeski 1998; OEPP/EPPO 2009). Zaobserwowano także różnice w kształcie guzików sztyletu osobników młodocianych J₂ stwierdzonych gatunków nicieni – kształt guzików sztyletu tych osobników u *G. rostochiensis* był wyłącznie zaokrąglony (rys. 1), podczas gdy u *G. pallida* obserwowano zarówno guziki sztyletu zaokrąglone, jak i lekko głębie



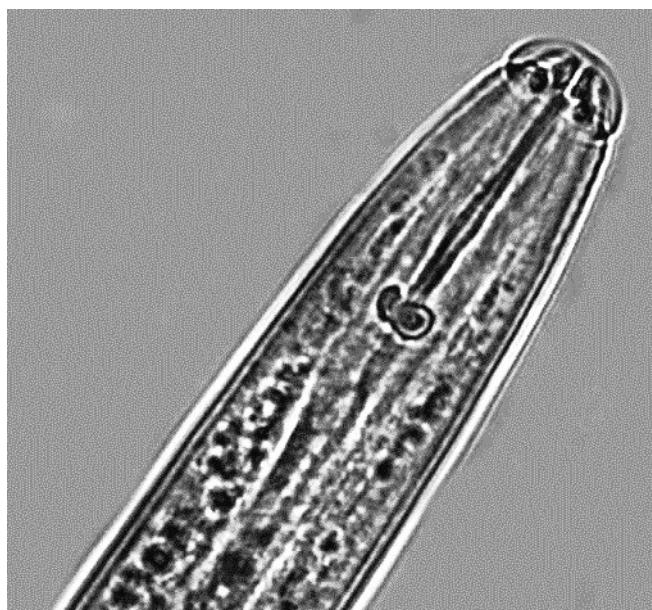
Rys. 2. Okolice wulwy i odbytu cysty *G. rostochiensis*

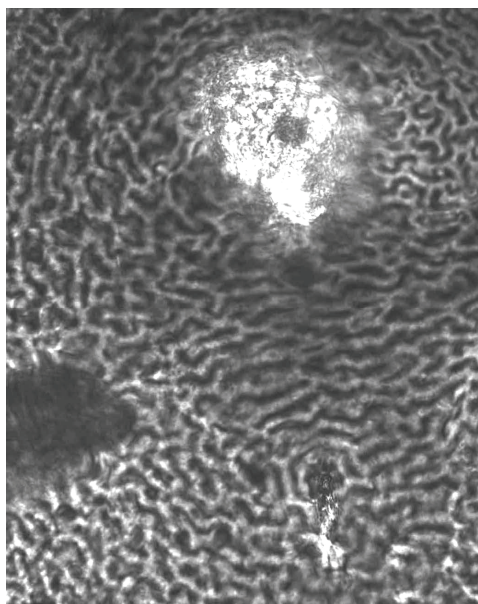
Fig. 2. The area of fenestra and anus of *G. rostochiensis* cyst



Rys. 3. Przednia część ciała osobnika młodocianego J₂ *G. pallida* ze sztyletem o różnym kształcie guzików

Fig. 3. Anterior part of J₂ juvenile of *G. pallida* with different shape of stylet knobs





Rys. 4. Okolice wulwy i odbytu cysty *G. pallida*
Fig. 4. The area of fenestra and anus of *G. pallida* cyst

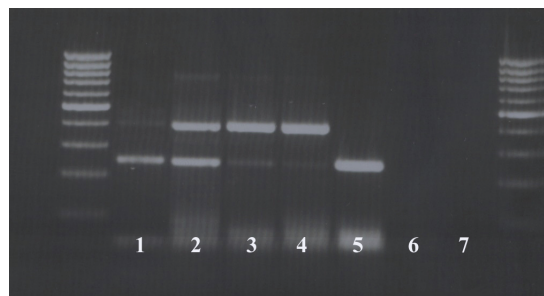
w przedniej części (rys. 3). U cyst obu gatunków nicieni zaobserwowano punktowanie ściany cysty w okolicy okienka i odbytu (tab. 1).



Rys. 5. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR (Bulman i Marshall 1997) dla próbki FF/2942/10: 1–3, 7–16 – materiał z próbki – *G. rostochiensis*, 4–6 – materiał z próbki – *G. rostochiensis* + *G. pallida*, 17 – kontrola pozytywna dla *G. pallida*, 18 – kontrola pozytywna dla *G. rostochiensis*, 19 – kontrola pozytywna dla mieszaniny gatunków *G. rostochiensis* + *G. pallida*, 20 – kontrola negatywna

Fig. 5. PCR profile (Bulman and Marshall 1997) for FF/2942/10 sample: 1–3, 7–16 – material from the sample – *G. rostochiensis*, 4–6 – material from the sample – *G. rostochiensis* + *G. pallida*, 17 – positive control for *G. pallida*, 18 – positive control for *G. rostochiensis*, 19 – positive control for mix of species *G. rostochiensis* + *G. pallida*; 20 – negative control

Szeroki zakres zmienności wymienionych powyżej cech diagnostycznych oraz pokrywanie się wartości pomiarów u poszczególnych gatunków powoduje trudności w określeniu przynależności gatunkowej nicieni w obrębie rodzaju *Globodera*. Konieczne jest równoległe badanie zarówno cyst, jak i osobników młodocianych J₂ oraz porównanie uzyskanych wyników liczbowych z protokołami diagnostycznymi, a także porównanie badanego materiału z materiałami odniesienia. Wyniki uzyskane metodą morfologiczno-metryczną powinny być także potwierdzane za pomocą testów molekularnych.



Rys. 6. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR (Zouhar i wsp. 2000) dla próbki FF/2942/10: 1 – materiał z próbki *G. rostochiensis*, 2, 3 – materiał z próbki – *G. pallida* + *G. rostochiensis*, 4 – kontrola pozytywna dla *G. pallida*, 5 – kontrola pozytywna dla *G. rostochiensis*, 6, 7 – kontrola negatywna

Fig. 6. PCR products profile (Zouhar et al. 2000) observed in the agarose gel electrophoresis for FF/2942/10 sample: 1 – material from the sample *G. rostochiensis*, 2, 3 – material from the sample – *G. pallida* + *G. rostochiensis*, 4 – positive control for *G. pallida*, 5 – positive control for *G. rostochiensis*, 6, 7 – negative control

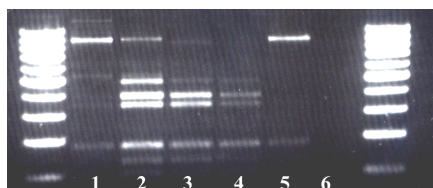
Testy molekularne z zastosowaniem wszystkich trzech wyżej wymienionych przeprowadzone przez Centralne Laboratorium Głównego Inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa oraz test PCR przeprowadzony przez Pracownię Organizmów Kwarantannowych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie dały zgodne wyniki i potwierdziły występowanie w próbkach FF/2941/10 i FF/2943/10 cyst jednego gatunku – *G. rostochiensis*, natomiast w próbce FF/2942/10 stwierdzono obecność dwóch gatunków mątwików: *G. rostochiensis* i *G. pallida* (rys. 5–7). Analiza produktów amplifikacji fragmentu ITS przy użyciu starterów ITS5, PITSr3 oraz PITSp4 (tab. 2) według Bulmana i Marshalla (1997) dla próbki FF/2942/10 umożliwiła wykrycie obecności obu gatunków nicieni w w/w próbce. Produkty reakcji miały odpowiednio wielkość 434 pz dla *G. rostochiensis* w 13 na 16 powtórzeń oraz 265 pz dla *G. pallida* w 3 na 16 powtórzeń (rys. 5). Wynik ten wyraźnie wskazuje na obecność mieszaniny gatunków w badanej próbce. Jednakże ze względu na możliwe różnicowanie międzypopulacyjne badanych gatunków zdecydowano się na przeprowadzenie dodatkowych testów PCR z wykorzystaniem starterów hybrydujących w innych miejscach rDNA niż te opisane przez Bulmana i Marshalla (1997). Dlatego, w celu potwierdzenia rezultatów przeprowadzono kolejne testy molekularne:

- PCR według Zouhara i wsp. (2000) z użyciem starterów UNI, GRO1, GPA w wyniku którego uzyskano produkty o wielkościach 238 pz dla *G. rostochiensis* (1 z 3 powtórzeń) oraz 238 i 391 pz dla mieszaniny *G. rostochiensis* i *G. pallida* (2 z 3 powtórzeń) (rys. 6),
- PCR-RFLP według Thiéry i Mugniéry (1996) z zastosowaniem starterów 18S oraz 26S (tab. 2), podczas którego uzyskany produkt został poddany trawieniu endonukleazą restrykcyjną Bsh1236I dając produkty o wielkościach charakterystycznych dla *G. rostochiensis* (1 z 3 powtórzeń) oraz mieszaniny *G. rostochiensis* i *G. pallida* (2 z 3 powtórzeń) (tab. 3, rys. 7).

Tabela 3. Rozmiary fragmentów restrykcyjnych, w parach zasad (pz), uzyskane po trawieniu produktów PCR przy użyciu enzymu Bsh1236I dla *G. rostochiensis*, *G. pallida* oraz mieszaniny tych gatunków (Thiéry i Mugniéry 1996)

Table 3. Length of restricted fragments in bp after digestion with Bsh1236I enzyme of *G. rostochiensis*, *G. pallida* and mix of these species (Thiéry and Mugniéry 1996)

Gatunek Species	Wielkość fragmentów restrykcyjnych Length of restricted fragments
<i>G. rostochiensis</i> (populacje europejskie) <i>G. rostochiensis</i> (European populations)	900, 190, 110
<i>G. pallida</i> (populacje europejskie) <i>G. pallida</i> (European populations)	500, 400, 350, 190, 110
Mieszanina <i>G. rostochiensis</i> i <i>G. pallida</i> (populacje europejskie) Mix of <i>G. rostochiensis</i> and <i>G. pallida</i> (European populations)	900, 500, 400, 350, 190, 110



Rys. 7. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RFLP trawionych enzymem Bsh1236I (Thiéry i Mugniéry 1996) dla próbki FF/2942/10: 1 – materiał z próbki – *G. rostochiensis*, 2, 3 – materiał z próbki – *G. pallida* + *G. rostochiensis*, 4 – kontrola pozytywna dla *G. pallida*, 5 – kontrola pozytywna dla *G. rostochiensis*, 6 – kontrola negatywna

Po trawieniu restrykcyjnym obraz prążków w studziencie 1 jest niejednoznaczny, jednak prążki charakterystyczne dla *G. rostochiensis* są silniejsze niż prążki charakterystyczne dla *G. pallida*

Fig. 7. Amplified PCR products from the sample FF/2942/10 digested by enzyme Bsh1236I (Thiéry i Mugniéry 1996) FF/2942/10 sample: 1 – material from the sample – *G. rostochiensis*, 2, 3 – material from the sample – *G. pallida* + *G. rostochiensis*, 4 – positive control for *G. pallida*, 5 – positive control for *G. rostochiensis*, 6 – negative control

Restriction pattern of material from the first lane is unclear, but the bands characteristic for *G. rostochiensis* are stronger than the bands characteristic for *G. pallida*

Sekwencjonowanie fragmentu rDNA wyizolowanego z próby FF/2942/10 oraz jego analiza porównawcza prowadzona *in silico* wskazały na 97% podobieństwo sekwencji fragmentu tego genu z sekwencją rDNA kilkunastu izolatów *G. pallida* zdeponowanych w Banku Genów Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI). Sekwencja tego samego genu wskazała na niższe, tzn. 94% i 95% podobieństwo analizowanego fragmentu do rDNA, odpowiednio *G. rostochiensis* i *G. tabacum* Lownsbery et Lownsbery (gatunek rozwijający się na tytoniu, nie występujący w Polsce). Otrzymane wyniki badań, prowadzonych metodami morfometrycznymi oraz technikami biologii molekularnej, tj. PCR, PCR-RFLP i sekwencjonowanie rDNA, potwierdziły obecność *G. pallida* w próbce FF/2942/10.

Wnioski / Conclusions

Wykrycie mątwika agresywnego (*G. pallida*) na terytorium Polski wskazuje na konieczność kontynuowania badań nad składem gatunkowym mątwików występujących w uprawach ziemniaka. Konieczne jest także prowadzenie dalszych prac nad zmiennością morfologiczną i morfometryczną krajowych populacji mątwików z rodzaju *Globodera*.

Literatura / References

- 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 (2): 123–129.
- Karnkowski W., Dobosz R., Kaczmarek A., Obrepalska-Stęplowska A., Kierzek D. 2011. Wystąpienie mątwika agresywnego *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens 1975 (Nematoda: Heteroderidae) w dwóch przesyłkach ziemniaków jadalnych sprowadzonych do Polski z Cypru. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 51 (4): 1545–1549.
- Kornobis S., Stefan K. 1991. Plant parasitic nematodes as pests of potatoes in Poland. Bull. OEPP/EPPO Bull. 21 (1): 331–334.
- OEPP/EPPO 2009. EPPO Standards. PM 7/40(2) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. Bull. OEPP/EPPO Bull. 39: 354–368.
- Thiéry M., Mugniéry D. 1996. Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of solanaceous plants. Fund. Appl. Nematol. 19: 471–479.
- Vrain T.S., Wakarchuk D.A., Levesque A.C., Hamilton R.I. 1992. Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. Fund. Appl. Nematol. 16: 563–573.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315–322. In: „PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications” (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds). Academic Press, San Diego, California, 426 pp.
- Zouhar M., Rysanek O., Kocova M. 2000. Detection and differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* by PCR. Plant Prot. Sci. 36: 81–84.