

Orijinal araştırma (Original article)

Ege Bölgesi patates alanlarında *Globodera rostochiensis* Wollenweber (Tylenchida: Heteroderidae)'in moleküler yöntemlerle saptanması

Molecular diagnosis of *Globodera rostochiensis* Wollenweber (Tylenchida: Heteroderidae) in the potato growing areas of Aegean Region, Turkey

Enbiye ULUTAŞ¹ Adem ÖZARSLANDAN^{2*}
Galip KAŞKAVALCI³ İ. Halil ELEKCİOĞLU⁴

Summary

DNA isolation was done by the 8 different cyst populations collected from the potato growing areas of Aegean Region (Turkey) between 2006-2008. As a result of Multiplex PCR conducted with species-specific primer, composing of band is observed in 435 bp as specific to *Globodera rostochiensis* Wollenweber (Tylenchida: Heteroderidae). By doing PCR with rDNA2 and rDNA1.58S primers of the same sample, as a consequence of cropping with Hinf I enzyme, in 233bp and 522bp band were confirmed as specific to *G. rostochiensis*. In this study, other potato cyst nematodes, *Globodera pallida* Stone, 1973 was not determined. *Globodera rostochiensis* was determined previously by using morphometric methods in Turkey. The identification of *G. rostochiensis* was confirmed by molecular methods with this study.

Key words: Potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, potato, molecular diagnosis

Özet

Ege Bölgesi'nde patates alanlarından 2006-2008 yıllarında 8 adet kist nematodu populasyonu toplanarak, elde edilen kistlerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Türe özgü spesifik primerler ile gerçekleştirilen Multiplex PCR sonucunda *Globodera rostochiensis* Wollenweber, (Tylenchida: Heteroderidae)'e özgü 435 bp de bant oluşumu gözlenmiştir. Aynı örneklerin rDNA2 ve rDNA1.58S primerleri ile PCR yapılarak Hinf I enzimi kesimi sonucunda *G. rostochiensis*'e özgü 233bp ve 522bp.de bant verdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada patates kist nematodlarından *Globodera pallida* Stone, 1973 tespit edilmemiştir. Türkiye'de daha önce morfometrik yöntemlerle saptanan, *G. rostochiensis*' in varlığı moleküler yöntemlerle de ilk defa belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Patates kist nematodu, *Globodera rostochiensis*, patates, moleküler teşhis

¹ Bornova Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü, 35040 Bornova, İzmir

² Adana Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü, 01321, Adana

³ Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 35100 İzmir

⁴ Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 01360 Balcalı, Adana

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: ozarslandan2001@yahoo.com

Alınış (Received): 14.04.2011 Kabul edilmiş (Accepted): 13.07.2011

Giriş

Türkiye'nin hemen her yerinde yetiştiriciliği yapılan patates giderek halkımızın beslenmesinde önem kazanmaktadır. Türkiye'nin önemli tarımsal ürünleri arasında yer alan patatesin farklı bölgelerde yetiştiriciliği yapılabilmektedir. Türkiye genelinde 1.426.841 da alanda 4.397.711 ton patates üretilmektedir. İzmir ilinde 118.735 da alanda 407.247 ton patates üretimi yapılmakta olup bunun 102.000 da alanında 357.000 ton patates üretimiyle Ödemiş ilçesi dikkat çekmektedir (Anonymous, 2009).

Patateste zararlı nematodların pek çoğu dünyada karantina listesinde bulunmaktadır. Özellikle Avrupa ülkeleri açısından *Globodera rostochiensis* Wollenweber, 1923 ve *Globodera pallida* Stone, 1973 (Tylenchida: Heteroderidae) hakkında genelge yayınlanan ve sıkı bir şekilde takip edilen 5 etmen içerisinde yer almaktadır. Patateste ekonomik önemde zarar yapan Patates kist nematodları (*G. rostochiensis* ve *G. pallida*), serin iklim bölgelerinde patates ürününün ana zararlıları konumundadır. İlk defa Güney Amerika'da Ant Dağları'nda görülmüş, daha sonra Avrupa, Asya (İsrail ve Hindistan), Kuzey Afrika, Kanarya Adaları, Kuzey ve Orta Batı Amerika'ya yayılmıştır (Winslow & Willis, 1972). Dünyada *G. rostochiensis*' in *G. pallida*' ya göre daha yaygın olduğu görülmektedir. EPPO'nun verilerine göre *Globodera* spp. 65 ülkede tespit edilmiş olup, bunların tümünde *G. rostochiensis*' in mevcut olduğu, bu ülkelerin 41'inde ise *G. pallida* türünün de bulunduğu bildirilmektedir (EPPO, 2011). Konukçu bitkisi gibi orijini Güney Amerika olan *Globodera* spp.'nin 1850'li yıllardan itibaren Avrupa'da mevcut olduğu tahmin edilmekte; 20. yüzyılın başlarında çoğu Avrupa ülkesinde bulunduğu ve sonradan diğer kıtalara yayıldığı bilinmektedir (Franklin, 1951; Jones, 1970). Tohumluk patates yumruları geliştirerek dünyaya ihraç eden Avrupa, ikincil yayılma merkezi durumundadır (Evans & Stone, 1977). *Globodera pallida* ve *G. rostochiensis* patatesin ekonomik açıdan en önemli zararlıları arasında kabul edilmekte ve birçok ülkenin karantina listesinde bulunmaktadır (Bates et al., 2002).

Patates kist nematodları patates bitkilerinin köklerinde beslenerek bitkinin toprak üstü aksamında zayıf büyüme, bodurlaşma, sararma ve erken kurumalara neden olur. Zararın büyük çoğunluğu yumru ağırlığında meydana gelen azalma nedeniyledir. Patates kist nematodlarının ekonomik zarar eşiğinin 10 yumurta/g toprak olduğu bildirilmektedir (Phillips et al., 1991). Populasyon yoğunluğu 20 yumurta/g toprak olduğunda yaklaşık 2 t/ha ürün kaybı tespit edilmiştir (Brown, 1969). Phillis (1992), Kıbrıs'ta *G. rostochiensis*' in 20 yumurta/g toprak populasyon yoğunluğunda patateste 2,2 ton/ha ürün kaybı meydana getirdiğini saptamıştır. İngiltere'de Patates kist nematodlarının neden olduğu yıllık kayıp, ülkenin patates üretiminin % 9'u kadardır. Diğer Avrupa ülkelerinde de benzer kayıplar görülmektedir (Evans & Rowe, 1998). Patates kist nematodlarının zararı yıldan yıla, bölgeden bölgeye değişmekle birlikte, zarar gören köklerin topraktan besin maddelerini taşımasının aksaması nedeniyle kurak koşullarda daha fazla görülmektedir. Bulaşma oranının yüksek olduğu ve patates üretiminin de sürekli olduğu Bolivya gibi tropikal ülkelerde % 80'lere varan ürün kayıpları görülmektedir (Franco et al., 1998). Dünyada Patates kist nematodunun patates verimini ortalama %12 oranında bir kayıp oluşturduğu bildirilmiştir (Bates et al., 2002).

Patates kist nematodlarının teşhisi son yıllara kadar genellikle morfolojik tanı yöntemleri ile yapılmakta ve bu daher iki türün morfolojik özellikleri ve morfometrik ölçümlerinin birbirine yakın olması nedeniyle bazen sorunlara neden olmaktadır (EPPO, 2004). Powers (2004) moleküler yöntemler kullanarak Patates kist nematodlarını tanımlamıştır. Ayrıca Bulman & Marshall (1997), Fullaondo et al. (1999), Vejl et al. (2002) patates kist nematodlarını PCR-RFLP ve türe özgü primerler ile tek veya multipleks PCR kullanarak tanımlamışlardır.

Türkiye'de Patates kist nematodları ilk kez Bolu ili Dörtdivan ilçesinde ithal tohumluk üretilen bir tarlada bulunmuş ve söz konusu bölge karantinaya alınmıştır (Enneli & Öztürk, 1996). Ulutaş (2010) Ege Bölgesi'nde patates üretim alanlarında, *G. rostochiensis*'in % 17,47 oranında bulaşık olduğunu, İzmir-Ödemiş ilçesinde patates üretim alanlarının % 61,70'inde bulunduğunu saptamıştır.

Bu çalışmada Türkiye’de patates alanlarında bulaşıklığı tespit edilen kist nematodları PCR-RFLP ve türe özgü primerler kullanılarak tanımlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Örneklerin toplanması ve laboratuvarında kistlerin elde edilmesi

Bu çalışmada 2006-2008 yıllarında İzmir’in Ödemiş (Bozdağ) ilçesinde Kist nematodu ile yoğun bulaşık 8 patates tarlasından alınan toprak örneklerinden elde edilen kistler üzerinde çalışılmıştır. (Çizelge 1). Arazi alanının 20-30 farklı yerinden toprak sondası ile toprak örnekleri alınarak paçal yapıp yaklaşık 2 kg kadar toprak, polietilen torbalar içine etiketlenerek konulmuş ve buz kutusu içinde laboratuvara getirilerek inceleninceye kadar buzdolabında +4°C’de tutulmuştur. Bitki kökleri ve toprak örneklerinde bulunan kistlerin izolasyonunda Fenwick (1940) metodunun modifiye edilmiş biçimi olan Cort cihazı kullanılmıştır. Bu amaçla aletin üzerindeki kaba elek içine her bir örnekten 250 gr kurutulmamış toprak örneği yerleştirilmiş ve üstten hortum yardımıyla orta basınçta (6 l/da) yıkanarak ve eş zamanlı olarak aletin olduğundan akan sular kistlerin elde edilmesi amacıyla 850 ve 250 µm çapındaki elekler üzerine aktarılmıştır. Daha sonra 250 µm çapındaki elek üzerinde toplanan süzölmüş topraktan, bir pisetten püskürtülen su yardımıyla kistler, çizgilerle bölünmüş sayım kağıtlarına alınarak ve 20x büyütme mikroskop altında kök ve gübre parçalarından ayrılarak toplanmıştır.

Çizelge 1. 2006 ve 2008 yıllarında İzmir-Ödemiş’te Kist nematodu popülasyonlarının elde edildiği alanlar

Kod numarası	Alındığı yer
1	Subatan
2	Gölcük
3	Gölcük
4	Elmabağ
5	Elmabağ
6	Gündalan
7	Büyük Çavdar
8	Bozdağ

Moleküler tanılama

DNA izolasyonu: Stereo binoküler altında toplanan kistlerden, eppendorf tüplere her bir örnek için 10 kist aktarılmış ve DNA izolasyonu Fermentas DNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır.

Türe özgü spesifik ve genel primerlerle moleküler tanımlamaların yapılması: Kist nematodu örneklerinin moleküler tanımlamalarında türlere özgü spesifik primerler ve genel primerler kullanılmıştır (Çizelge 2). PCR reaksiyonu 5µl DNA, 10x Buffer 2,5 µl, MgCl₂ 2,5 µl, 200 µM dNTP 1,5 µl, her primerden 0,4 µM dan 2 µl (ITS5 ve PITSp4 *G. pallida* spesifik, ITS5 ve PITSr3 *G. rostochiensis* spesifik, Kist nematodlarına genel primerler rDNA2 - rDNA1.58S), 0,2 µl Taq DNA polymerase ve ddH₂O olacak şekilde toplam 25 mikrolitrede gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. Kist nematodu örneklerinin moleküler tanımlanmasında kullanılan primerler

Primer ismi	5_ - 3 sekans	Kaynaklar
ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3	White et al., 1990
PITSp4	5'ACAACAGCAATCGTCGAG 3'	Bulman & Marshall, 1997
PITSr3	5' AGCGCAGACATGCCGCAA 3'	Bulman & Marshall, 1997
rDNA2	5' TTGATTACGTCCCTGCCCTTT 3'	Vrain, 1992
rDNA1.58S	5'ACGAGCCGAGTGATCCACCG 3'	Szalanski' et al., 1997

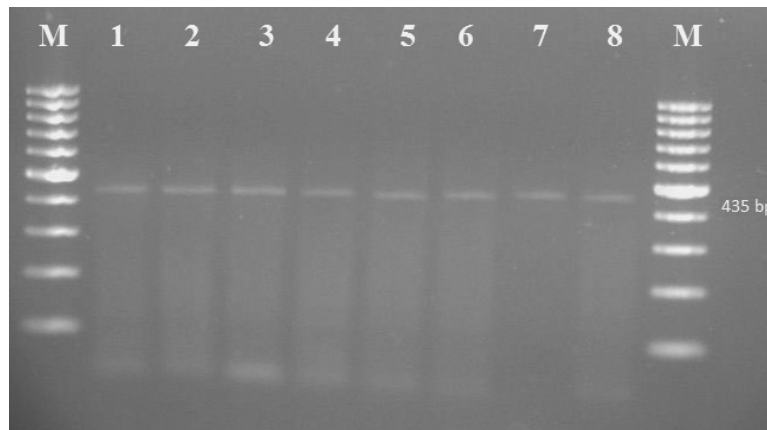
PCR Döngüsü, başlangıçta 94 °C de 4 da, 94 °C de 60 sn, 55°C de 60 sn, 72°C de 120 sn ve PCR 35 döngü, son olarak 72°C 10 da olacak şekilde tamamlanmıştır.

rDNA2-rDNA1.58S primerler kullanılarak elde edilen PCR ürünü *Hinf* I enzimiyle 37 °C de 3 saat bekletilerek kesim işlemi yapılmıştır. Bunun için; PCR ürünü (10 µl), 10xBuffer (2 µl), *Hinf* I Kesim Enzimi (1 µl) ve dSu (8 µl) olacak şekilde örneklerin kesimi gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez: PCR ürünleri % 1,5 agaroz jel kullanılarak elektroforez edilmiş ve 10 dak. etidyum bromid çözeltisinde bekletildikten sonra UV transilluminatör yardımı ile görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

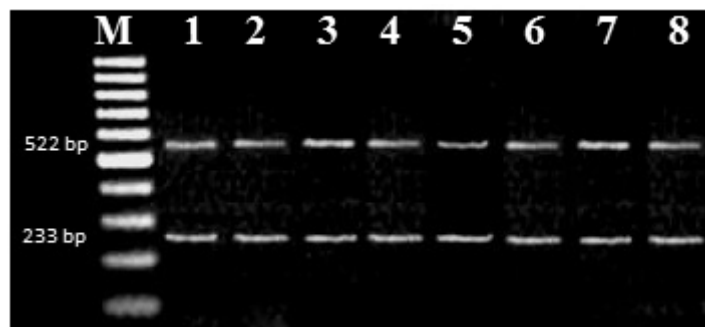
Araştırma Sonuçları ve Tartışma

İzmir ili Ödemiş (Bozdağ) ilçesi patates tarlalarından alınan toprak örneklerinden toplanan Kist nematodu populasyonları PCR-RFLP ve türe özgü moleküler primerler kullanılarak tanımlanmıştır. Kist nematodu populasyonlarının tanımlanmasında türe özgü spesifik ITS5 (White et al., 1990), PITSp4 ve PITSr3 (Bulman & Marshall, 1997) primerler kullanılması sonucunda *G. rostochiensis*'e özgü 435 bp DNA bantı elde edilmiştir (Şekil 1). Çalışmada patates alanlarından alınan tüm populasyonların *G. rostochiensis* olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 1. *Globodera rostochiensis* Wollenweber'in Multipleks PCR ile PITSr3, PITSp4 primerleri ve genel primer ITS5 moleküler teşhisi, Markır (M)=100 bp (Fermentas); örneklerin kodları (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

Kist nematodlarına genel primerlerden rDNA2 (Vrain, 1992) ve rDNA1.58S (Szalanski et al., 1997) primerler kullanılmış ve PCR ürünü *Hinf* I enzimi ile kesimi sonucunda *G. rostochiensis*'e özgü 233bp ve 522bp. de DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. *Globodera rostochiensis* Wollenweber, örneklerin kodları(1,2,3,4,5,6,7,8), rDNA2 -rDNA1.58S primerlerinin PCR ürünlerinin *Hinf* I ile kesimiyle oluşan bantlar (233 bp, 522 bp). Markır (M)=100bp (Fermentas).

Moleküler düzeyde yapılan çok sayıda tanımlama çalışmalarında *G. rostochiensis* ve *G. pallida* türlerinin teşhisinde PCR-RFLP ve türe özgü primerler ile tek veya multipleks PCR kullanılmıştır. Fleming et al. (1998), yapmış oldukları çalışmada rDNA2 ve rDNA1.58S primerlerini kullanarak PCR ürününü

Hinf I enzimi ile keserek *G. rostochiensis*' e özgü 233bp ve 522bp'de, *G. pallida*' ya ise 152bp, 233bp ve 370bp'de bant verdiğini tespit etmiştir.

White et al. (1990) ile Bulman & Marshall (1997) *G. rostochiensis*, *G. pallida* tanımlanmasında geliştirdikleri spesifik ITS5 PITSp4 ve PITSr3 primerleri değişik araştırmacılar tarafından kullanılmış ve bu çalışmalarda *G. rostochiensis*'e özgü 435 bp DNA bantı elde etmişlerdir (Bulman & Marshall, 1997; Fullaondo et al., 1999; Pylypenko et al., 2005; Skantar et al., 2007). Yapılan bu çalışmalar ile İzmir- Ödemiş (Bozdağ)'te Kist nematodu ile yoğun bulaşık 8 patates tarlasından alınan toprak örneklerinden elde edilen kistlerle yaptığımız bu çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Dünyada yaygınlık durumuna bakıldığında *G. rostochiensis*'in *G. pallida*'ya göre daha yaygın olduğu görülmektedir. EPPO'nun verilerine göre *Globodera* spp. 65 ülkede tespit edilmiş olup, bunların tümünde *G. rostochiensis*'in mevcut olduğu, bu ülkelerin 41'inde ise *G. pallida* türünün bulunduğu bildirilmektedir (EPPO, 1994). Ukrayna'da yapılan çalışmalarda önceleri sadece *G. rostochiensis*'in mevcut olduğu (Pylypenko, 1998, 1999); daha sonra yapılan çalışmada ise bulunma oranları açısından *G. rostochiensis*'in % 95-98, *G. pallida*'nın % 2-5 olduğunu bildirmişlerdir (Pylypenko et al., 2005).

Yukarıda belirtilen çalışmalara bakıldığında dünyada *G. rostochiensis*' in daha yaygın olduğu görülmektedir. Yaptığımız bu çalışmayla Türkiye'de ilk defa Kist nematodlarında türe özgü ve genel primerler ile PCR-RFLP ve PCR moleküler yöntemler kullanılarak Patates Kist nematodu *G. rostochiensis* türü teşhis edilmiştir.

Türkiye'ye yurt dışından önemli miktarlarda tohumluk patates geldiği bilinmektedir. Son yıllarda ise ülkemizden özellikle yakın komşu ülkelere önemli miktarlarda patates ihraç edilmektedir. Hem ithalatta hem de ihraç ürünlerinde dış karantinaya titizlikle uyulması için güvenilir ve hızlı sonuç veren teşhis yöntemlerinin pratikte bu konuda yetkili olan Karantina Müdürlükleri ile Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü laboratuvarlarında yaygın kullanılması büyük önem arz etmektedir. Morfolojik teşhis yöntemlerinin göreceli olarak uzun zaman alması ve varyasyon nedeniyle birbirine yakın türlerin karıştırılma olasılıklarının yüksek olması nedeniyle moleküler teşhis yöntemlerinin yerleştirilmesinde büyük yarar vardır. Bu bağlamda Patates kist nematodlarının teşhisinde moleküler yöntemlerin verimli bir şekilde araştırma alanının yanı sıra iç ve dış karantina çalışmalarında kullanılabileceği bu çalışma sonucunda ortaya konulmuştur. Türkiye Patates kist nematodu faunasının tam olarak ortaya çıkarılması için ise Türkiye genelinden daha fazla örneklerin toplanıp moleküler yöntemlerle teşhis edilmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Anonymous, 2009. Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara (web sayfası: <http://tuikrapor.tuik.gov.tr>), (erişim Tarihi: Mart 2011).
- Bates, J. A., E. J. Taylor, P. T. Gans, & J. E. Thomas, 2002. Determination of relative proportions of *Globodera* species in mixed populations of potato cyst nematodes using PCR product melting peak analysis. *Molecular Plant Pathology*, 3: 153–161.
- Brown, E. B., 1969. Assessment of the damage caused to potatoes by potato cyst eelworm, *Heterodera rostochiensis* Woll. *Annals of Applied Biology*, 63 (3): 493-502.
- Bulman, S. R., & J. W. Marshall, 1997. Differentiation of Australian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 25:123–129.
- Enneli, S. & G. Öztürk, 1996. "Orta Anadolu Bölgesinde patateslerde zarar yapan, önemli bitki paraziti nematodlar, 396-403". Türkiye 3. Entomoloji Kongresi (24-28 Eylül, Ankara) Bildirileri, Ankara Üniversitesi Basımevi, 716s.
- EPPO, 2004. Diagnostic protocols for regulated pests, *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. EPPO Bulletin 34:309–314.
- EPPO, 2011. Data Sheets on Quarantine Pests *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. (web sayfası: http://www.eppo.org/QUARANTINE/nematodes/Globodera_pallida/HETDSP_ds.pdf), (erişim tarihi: Mart, 2011).

- Evans, D. & A. R. Stone, 1977. A review of the distribution and biology of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. PANS 23(2), 178-189.
- Evans, K. & J. A. Rowe, 1998. "Distribution and Economic Importance, 1–30". In: The Cyst Nematodes (Ed: S.B. Sharma), Kluwer Academic Editors, Dordrecht, The Netherlands.
- Fenwick, D. W., 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. Journal of Helminthology, 18: 155-172.
- Fleming, C. C., S. J. Turner, T. O. Powers & A. L. Szalansky, 1998. Diagnostics of cyst nematodes: Use of the polymerase chain reaction to determine species and estimate population levels. Aspects of Applied Biology, 52: 375-382.
- Franco, J., R. Oros, G. Main & N. Ortuno, 1998. "Potato Cyst Nematodes (*Globodera* species) in South America, 239-269". In: Potato Cyst Nematodes: Biology, Distribution and Control (Eds: R.J. Marks & B.B. Brodie), CAB International, Wallingford, UK.
- Franklin, M. T., 1951. The Cyst Forming Species of *Heterodera*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, 147 pp.
- Fullaondo, A., E. Barrena, M. Viribay, I. Barrena, A. Salazar & E. Ritter, 1999. Identification of potato cyst nematode species *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* by PCR using specific primer combinations. Nematology 1 (2): 157-163.
- Jones, F. G. W., 1970. The control of the potato cyst nematode. Journal of the Royal Society of Arts, 118: 179-199.
- Phillis, I., 1992. Assessment of potato yield loss caused by the potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, (web page: <http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=19922319811>), (Erişim tarihi: Mart 2010).
- Phillips, M. S., C. A. Hackett & D. L. Trudgill, 1991. The relationship between the initial and final population densities of the potato cyst nematode *Globodera pallida* for partially resistant potatoes. Journal of Applied Ecology, 28: 109- 119.
- Powers, T. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. Annual Review of Phytopathology, 42:367-383.
- Pylypenko, L. A. 1998. Distribution of *Globodera rostochiensis* Wollenweber, 1923 (Tylenchida, Heteroderidae) in Ukraine. Vesnik Zoologii, 32: 139-142.
- Pylypenko, L. A. 1999. The Interrelations in A System Parasite - Host Plant at the Potato Globoderosis. Ph.D. Thesis, National Agrarian University, Kyiv, Ukraine, 136 pp.
- Pylypenko, L. A., T. Uehara, M. S. Phillips, D. D. Sigareva & V. C. Blok, 2005. Identification of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* in the Ukraine by PCR. European Journal of Plant Pathology, 111: 39–46.
- Skantar, A. M., Z. A. Handoo, L. K. Carta & D. J. Chitwood, 2007. Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. Journal of Nematology, 39 (2): 133-144.
- Syracuse, A. J., C. S. Johnson, J. D. Eisenback, C. L. Nessler & E. P. Smith, 2004. Intraspecific variability within *Globodera tabacum solanacearum* using random amplified polymorphic DNA. Journal of Nematology, 36: 433-439.
- Szalanskj, A. L., D. D. Sui, T. S. Harris & T. O. Powers, 1997. Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS I. Journal of Nematology, 29:255-267.
- Ulutaş, E., 2010. Ege Bölgesi Patates Üretim Alanlarında Bulunan Önemli Bitki Paraziti Nematodların Belirlenmesi ve Bitki Gelişimine Etkileri. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (Basılmamış) Doktora Tezi, Bornova, İzmir, 92+XVIII s.
- Vejl, P., S. Skupinová, P. Sedlak & J. Domkarova, 2002. Identification of PCN species (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) by using of ITS-1 region's polymorphism. Rostlinna Vyroba, 48: 486-489.
- Vrain, T. C., D. A. Wakarchuk, A. C. Levesque & R. I. Hamilton, 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphisms in the *Xiphinema americanum* group. Fundamental and Applied Nematology, 15: 563–573.
- Winslow, R. D & R. J. Willis, 1972. "Nematode Diseases of Potatoes. II. Potato Cyst Nematode, *Heterodera rostochiensis*, 18-34". In: Economic Nematology (Ed: J. Webster), Academic Press, New York., 563pp.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor, 1990. "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics, 315–322". In: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications (Eds: M. A. Innes, D. H. Gelfard, J. J. Sninsky & T. J. White). Academic Press, San Diego.