การศึกษาสถานภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน *Meloidogyne chitwoodi* และ *Meloidogyne fallax* ในประเทศไทย

Study on the Status of *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax* in Thailand

ไตรเดช ข่ายทอง[1] ธิติยา สารพัฒน์[1] รุ่งนภา ทองเครื่ง[1] วานิช คำพานิช[2]

[1]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน *Meloidogyne chitwoodi* และ *M. fallax* ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง ดำเนินการในปี 2559 เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกมันฝรั่ง จ. เชียงราย จ.เชียงใหม่ และ จ. ตาก รวม 72 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ตรวจนับไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบไส้เดือนฝอยรากปมในตัวอย่างดิน 50 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม โดยปลูกมะเขือเทศในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอ่อนระยะที่สองด้วยคู่ไพรเมอร์ 194/195 ได้ผลผลิตปฏิกิริยาขนาด 720 คู่เบส ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นไส้เดือนฝอยกลุ่ม tropical species เช่น *M. incognita M. javanica* หรือ *M. arenaria* เมื่อตรวจลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นพบว่าเป็นลักษณะของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในปี 2560 เก็บตัวอย่างดินจาก จ. เพชรบูรณ์ จ. ตาก จ.ลำพูน จ.เชียงใหม่ จ. เชียงราย รวม 43 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ด้วยคู่ไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K-14R ซึ่งจำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 400 คู่เบส

คำหลัก: การเฝ้าระวังศัตรูพืช ไส้เดือนฝอยรากปม การแพร่กระจาย มาตรการสุขอนามัยพืช

รหัสการทดลอง 03-04-59-04-01-00-07-59

คำนำ

ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley (Columbia root-knot nematode) และ *Meloidogyne fallax* Karssen (False Columbia root-knot nematode) เป็นไส้เดือนฝอยที่เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกันประเภท A2 ของ European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) ซึ่งจัดเป็นศัตรูพืชกักกันที่พบในพื้นที่ สำหรับประเทศไทย ไส้เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi* อยู่ในรายชื่อไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกันเช่นเดียวกัน แต่ยังไม่มีรายงานการตรวจพบไส้เดือนฝอย *M. chitwoodi* และ *M. fallax* ในประเทศไทย ไส้เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi* และ *M. fallax* เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่เข้าทำลายพืชทั้งใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง แครอท มะเขือเทศ (Santo *et al.*, 1980; O'Bannon *et al.*, 1982; Brinkman *et al.*, 1996; Karssen, 2002) มีรายงานการพบ *M. chitwoodi* ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1980 ในแถบ Pacific Northwest ของสหรัฐอเมริกา ปัจจุบันมีรายงานการพบไส้เดือนฝอยชนิดนี้ในประเทศ อาร์เจนตินา เบลเยี่ยม เยอรมัน เนเธอร์แลนด์ โปรตุเกส สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก และแอฟริกาใต้ สำหรับไส้เดือนฝอย *M. fallax* มีรายงานการพบครั้งแรกในปี 1992 ในประเทศเนเธอร์แลนด์ ซึ่งในระยะแรกคิดว่าเป็น race ใหม่ของ *M. chitwoodi* (Karssen, 1994; van Meggelen *et al.*, 1994) ต่อมาพบว่ามีความแตกต่างกันทางสัณฐานและ isozyme patterns จึงได้มีการจัดจำแนกเป็นชนิดใหม่คือ *M. fallax* (Karssen, 1996) หลังจากการพบครั้งแรกก็มีรายงานการพบ *M. fallax* อีกหลายแห่งในแหล่งปลูกมันฝรั่งแถบตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศเนเธอร์แลนด์ (Karssen, 1996) ใกล้กับชายแดนของประเทศเยอรมันและเบลเยี่ยม และมีรายงานการพบในประเทศฝรั่งเศส (Daher *et al.*, 1996) นอกจากนั้นยังพบในประเทศอื่นๆ เช่น นิวซีแลนด์ ออสเตรเลีย และแอฟริกาใต้ (Marshall *et al.*, 2001; Nobbs *et al.*, 2001; Fourie *et al.*, 2001) ไส้เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi* และ *M. fallax* เข้าทำลายพืชเช่นเดียวกับไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ สามารถชักนำเซลล์รากพืชให้สร้าง feeding site และทำให้พืชเกิดปุ่มปม เมื่อระบบรากถูกทำลายพืชจะแสดงอาการอ่อนแอ แคระแกร็น ใบซีด จากการได้รับน้ำและแร่ธาตุไม่เพียงพอ ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดทำความเสียหายต่อรากและส่วนใต้ดินของพืช เช่น มันฝรั่ง แครอท ทำให้เกิดความเสียหายด้านคุณภาพ ความเสียหายเชิงปริมาณยังไม่ชัดเจน ระดับความเสียหายของหัวมันฝรั่ง (Van Riel, 1993) และแครอท (Wesemael & Moens, 2008) ขึ้นกับชนิดของพันธุ์ ความหนาแน่นของประชากรไส้เดือนฝอยในดิน อุณหภูมิ ฤดูปลูก และชนิดดิน จำนวนรุ่น (generation) ของไส้เดือนฝอยรากปมต่อฤดูปลูกก็เป็นส่วนสำคัญต่อระดับความเสียหาย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และวิธีการ

สำรวจพื้นที่ปลูกมันฝรั่งแบบเจาะจง เพื่อตรวจหาไส้เดือนฝอยรากปม โดยดูลักษณะการถูกเข้าทำลายจากไส้เดือนฝอยรากปมของมันฝรั่ง หรือพืชชนิดอื่นๆ ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง การสำรวจแบบเจาะจงเป็นการสำรวจเบื้องต้น เพื่อตรวจหาพืชที่แสดงอาการปมที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นว่าในพื้นที่มีไส้เดือนฝอยรากปมหรือไม่

จัดทำคู่มือการสำรวจ และแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจเช่น ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วัน และเวลา สภาพดินฟ้าอากาศ พิกัดทางภูมิศาสตร์

<u>การเก็บตัวอย่างดิน และหัวมันฝรั่ง</u>

เก็บตัวอย่างดินโดยแบ่งพื้นที่เป็นแปลงย่อย (grid) ขนาด 10 x 10 ตารางเมตร สุ่มเก็บตัวอย่างดินโดยเดินเก็บในลักษณะสลับฟันปลาให้ทั่วพื้นที่ เก็บดินที่ความลึก 25 เซนติเมตร ด้วย auger ขนาด 1 นิ้ว ให้ได้ตัวอย่างดินประมาณ 4 ลิตรต่อพื้นที่ 10,000 ตารางเมตร คลุกเคล้าตัวอย่างดินให้ทั่ว แล้วแบ่งตัวอย่างดิน 200 มิลลิลิตร เพื่อตรวจหาไส้เดือนฝอยรากปมและเก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่ง 200 หัวต่อแปลง

<u>การตรวจไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและหัวมันฝรั่ง</u>

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินโดยวิธี Decanting and Sieving with Bearmann Tray และแยกไส้เดือนฝอยออกจากหัวมันฝรั่งตามวิธีใน EPPO Standard PM 3/69

แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินโดยคลุกเคล้าตัวอย่างดินให้ทั่ว ชั่งตัวอย่างดินหนัก 250 กรัม แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินโดยวิธีการกวนตัวอย่างดินในน้ำ 2 ลิตรและกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่าง และนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ

ตรวจตัวอย่างหัวมันฝรั่งโดยการบ่มหัวมันฝรั่งที่อุณหภูมิประมาณ 18°C ให้ได้อุณหภูมิรวมอย่างน้อย 2,150 day-degrees ซึ่งไส้เดือนฝอยที่ฝังตัวอยู่ในหัวมันฝรั่งจะสามารถเจริญเติบโตได้จนกระทั่งสามารถสังเกตอาการบนหัวมันฝรั่งได้ด้วยสายตา หากหัวมันฝรั่งมีการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย หัวมันฝรั่งที่มีการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม บริเวณผิวของหัวมันฝรั่งจะมีลักษณะเป็นตุ่มหรือปุ่มปมนูนขึ้น ทำให้มันฝรั่งมีผิวไม่เรียบ แต่บางครั้งอาจไม่พบอาการที่ผิวหากไส้เดือนฝอยฝังตัวอยู่ลึก เมื่อฝานหัวมันฝรั่งออกดูจะพบลักษณะแผลฉ่ำน้ำ และอาจพบตัวเต็มวัยเพศเมียและกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมฝังตัวอยู่ ซึ่งสามารถแยกตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยมาตรวจสอบ โดยการเขี่ยตัวไส้เดือนฝอยจากเนื้อเยื่อมันฝรั่งโดยตรงหรือการย่อยเนื้อเยื่อมันฝรั่งด้วยเอ็นไซม์ cellulase และ pectinase

<u>วิธีการตรวจ และจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม M. chitwoodi และ M. fallax ปฏิบัติตามวิธีการใน EPPO Standard PM 7/41</u>

ในกรณีที่ตรวจพบอาการรากปม หรือหัวหูด จะสามารถได้ตัวไส้เดือนฝอยรากปมทุกระยะ โดยเฉพาะตัวเต็มวัยเพศผู้ ตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวอ่อนระยะที่สอง ซึ่งสามารถจำแนกชนิดจาก

ลักษณะทางสัณฐาน โดยเปรียบเทียบกับลักษณะของ *M. chitwoodi* หรือ *M. fallax* ร่วมกับการจำแนกโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *M. chitwoodi* หรือ *M. fallax* ซึ่งได้จาก sequence-characterized amplified regions (SCARs)

<u>การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธี PCR</u>

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธี PCR โดยใช้แนวทางการจำแนกชนิดโดยใช้อณูชีววิทยา (molecular diagnostic key) ซึ่งพัฒนาโดย Adam *et al.* (2007)

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการตาม Schizas *et al.,* 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เขี่ยไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช่ส่วนปลายของ pipette tip ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 6 นาที ถ้าเตาไมโครเวฟเป็นชนิด 750 วัตต์ (สามารถปรับเวลาตามกำลังไฟของเตาไมโครเวฟให้ได้ 4,500 วัตต์-นาที ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม) ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ไพรเมอร์ และสภาวะปฏิกิริยา PCR ตาม Adam *et al.* (2007) (ภาคผนวก)

- การบันทึกข้อมูล

บันทึกที่ตั้งของแปลง วัน และเวลา สภาพดินฟ้าอากาศ พิกัดทางภูมิศาสตร์ บันทึกข้อมูลการตรวจไส้เดือนฝอยสกุลต่างๆ จากตัวอย่างดิน จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม บันทึกผลการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธี PCR

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในปี 2559 เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกมันฝรั่ง จ. เชียงราย จ.เชียงใหม่ และ จ. ตาก รวม 72 ตัวอย่างแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ตรวจนับไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบไส้เดือนฝอยรากปมในตัวอย่างดิน 50 ตัวอย่าง ซึ่งมีปริมาณตัวอ่อนระยะที่สองในดินแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ซึ่งส่วนใหญ่มีปริมาณตัวอ่อนระยะที่สองในดินไม่มาก เพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมโดย ปลูกมะเขือเทศในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม นำตัวเต็มวัยเพศเมียมาศึกษาลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้น พบว่าส่วนใหญ่มีลักษณะริ้วรอยย่นของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ทดสอบคู่ไพรเมอร์ 194/195 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปม กับตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่เลี้ยงไว้ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

จึงใช้คู่ไพรเมอร์นี้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมที่เก็บจากแปลงมันฝรั่ง โดยนำกลุ่มไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียที่ได้ศึกษาลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นแล้ว มาแช่ในน้ำสะอาดเพื่อให้ตัวอ่อนระยะที่สองฟักออกมาจากไข่ นำตัวอ่อนระยะที่สองที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอ ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ 194/195 พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 720 คู่เบส ซึ่งบอกได้ว่าเป็น tropical species แต่หากเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi* หรือ *M. fallax* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1600-1700 คู่เบส อย่างไรก็ตามพบบางตัวอย่างที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่า 720 คู่เบส แต่ไม่ถึง 1600-1700 คู่เบส ซึ่งต้องทำการศึกษาในลำดับต่อไป

ในปี 2560 เก็บตัวอย่างดินจาก จ. เพชรบูรณ์ จ. ตาก จ.ลำพูน จ.เชียงใหม่ จ. เชียงราย รวม 43 ตัวอย่าง เมื่อเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน นำตัวเต็มวัยเพศเมียมาตรวจสอบลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นพบว่ามีลักษณะของ *M. incognita* เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ 194/195 พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาด 720 คู่เบส เมื่อตรวจสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K-14R ซึ่งจำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 400 คู่เบส

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ในปี 2559 เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกมันฝรั่งรวม 72 แปลง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 50 แปลง ในปี 2560 เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกมันฝรั่งรวม 43 แปลง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 7 แปลง ตรวจสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ 194/195 พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปมกลุ่ม tropical species เมื่อตรวจลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นมีลักษณะของ *M. incognita* เมื่อตรวจสอบด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ซึ่งยืนยันว่าไส้เดือนฝอยรากปมจากตัวอย่างดินที่พบคือไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

เอกสารอ้างอิง

Adam, M. A. M., M.S., Phillips, and V.C. Blok. 2007. Molecular diagnostic key for identification for single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* sp.). Journal of Plant Pathology 56: 190–197.

Brinkman, H., J.M. Goossens and H.R. Van Riel. 1996. Comparative host suitability of selected crop plants to *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz Umweltschutz 96: 127–129.

Daher, S., S. Gillet, D. Mugniéry and H. Marzin. 1996. Discovery in France and characteristics of the Dutch variant of *Meloidogyne chitwoodi*. Proceedings of

the Third International Nematology Congress, p. 188. (Ed. Plant Protection Service), Gosier (GP).

Fourie, H., C. Zijlstra and A.H. McDonald. 2001. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. Nematology 3: 675 – 689.

Karssen, G. 1994. The use of isozyme phenotypes for the identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: Annual Report 1992 Diagnostic Centre, pp. 85–88. Plant Protection Service, Wageningen (NL).

Karssen, G.1996. Description of *Meloidogyne fallax* n. sp., a root-knot nematode from the Netherlands. Fundamental and Applied Nematology 19: 593–599.

Karssen, G. 2002. The Plant-Parasitic Nematode Genus *Meloidogyne* in Europe. Brill Leiden, Köln (DE).

Marshall, J.W., C. Zijlstra, and K.W.L. Knight. 2001. First record of *Meloidogyne fallax* in new Zealand. Australasian Plant Pathology 30: 283–284.

Nobbs, J.M., Q. Liu, D. Hartley, Z. Handoo, V.M. Williamson, and S. Taylor. 2001. First record of *Meloidogyne fallax* in Australia. Australasian Plant Pathology 30: 373.

O'Bannon, J.H., G.S. Santo, and A.P. Nyczepir. 1982. Host range of the Columbia root-knot nematode. Plant Disease 66: 1045 –1048.

Santo, G.S., J.H. O'Bannon, A.M. Finley, and A.M. Golden. 1980. Occurrence and host range of a new root-knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*) in the Pacific Northwest. Plant Disease 64: 951–952.

Van Riel, H.R. 1993. Comparison of potato cultivars in relation to their level of external symptoms on tubers caused by *Meloidogyne chitwoodi*. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste

van Meggelen, J.C., G. Karssen, G.J.W. Janssen, B. Verkerk-Bakker, and Janssen R. 1994. A new race of *Meloidogyne chitwoodi*. Fundamental and Applied Nematology 17: 93–96.

Wesemael, W.M.L., and M. Moens. 2008. Quality damage on carrots (*Daucus carota* L.) caused by the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi*. Nematology 10: 261–270.

Table 1 Number of soil sample collected in 2016

Total soil samples	Root-knot nematode detected samples	Number of soil samples classified by root-knot nematodes number in 250 g soil				
		1 – 10	11 – 50	51 – 150	151 - 250	> 250
72	50	25	16	4	1	4

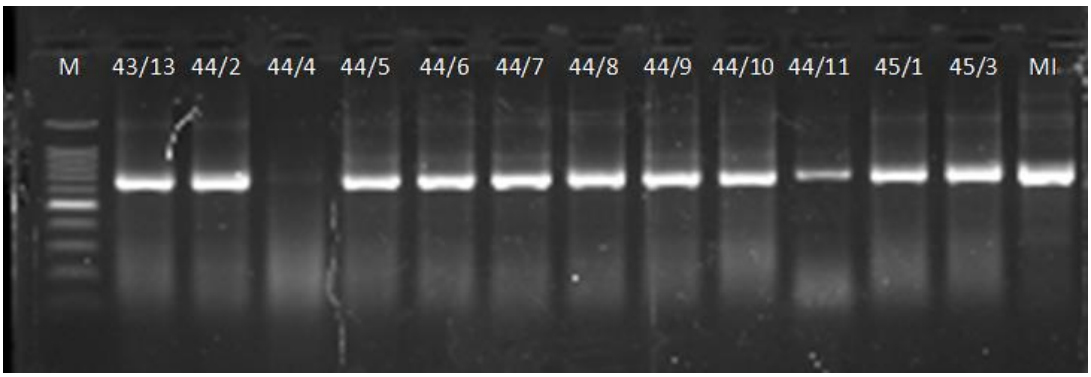

Figure 1 Root-knot nematodes DNA amplified with 194/195 primers

ภาคผนวก

Root-knot nematodes molecular diagnostic key (Adam *et al.*, 2007)

1. Amplify the amplifly the IGS between 5S and 18S ribosomal genes using 194/195 primers			
a)	720-bp product	Tropical species.....	go to (2)
b)	780-bp product	*M. mayaguensis* (now *M. enterolobii*)	
c)	700-bp product	*M. hapla*.....	go to (3)
d)	1,700- to 1,800-bp products	*M. fallax and M. chitwoodi*.....	go to (3)
e)	Other size, clone and sequence		
2. Tropical RKN specific SCAR primers			
2.1 Fjav and Rjav primers			
a)	720-bp product	*M. javanica*	
b)	No product.....		go to (2.2)
2.2 MI-F and MI-R primers			
a)	999-bp product	*M. incognita*	
b)	No product.....		go to (2.3)
2.3 Far and Rar primers			
a)	420-bp product	*M. arenaria*	
3. JMV primers			
a)	540-bp product	*M. chitwoodi*	
b)	670-bp product	*M. fallax*	
c)	440-bp product	*M. hapla*	

Primer sequences, specificity and sources (Adam *et al.*, 2007)

Code	Primer sequence 5'-3'	Specificity and source
194	TTAACTTGCCAGATCGGACG	5S-18S ribosome region
195	TCTAATGAGCCGTACGC	Blok et al. (1997)
Inc-K14-F	GGGATGTGTAAATGCTCCTG	*M. incognita*-specific SCAR
Inc-K14-R	CCCGCTACACCCTCAACTTC	Randig et al. (2002)
Fjav	GGTGCGCGATTGAACTGAGC	*M. javanica*-specific SCAR
Rjav	CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC	Zijlstra et al. (2000)
Far	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	*M. arenaria*-specific SCAR
Rar	TCGGCGATAGACACTACAAACT	Zijlstra et al. (2000)
JMV1	GGATGGCGTGCTTTCAAC	*M. hapla*-, *M. chitwoodi*- and
JMV2	TTTCCCCTTATGATGTTTACCC	*M. fallax*-specific IGS-SCAR
JMV hapla	AAAAATCCCCTCGAAAAATCCACC	Wishart et al. (2002)

PCR amplification profiles for different primers (Adam *et al.*, 2007)

		45 cycles			
		50°C (194/195)			
		61°C (Far/Rar)			
		64°C (Fjav/Rjav)			
		64°C (Inc-K14-F/Inc-K14-R)			
94°C	94°C	50°C (JMV primers)			
2 mins	30 secs		72°C		
			90 secs (194/195)	72°C	
		30 secs	90 secs (JMV primers)	7 mins	4°C
			1 min for remaining primers		∞