

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : แผนงานวิจัยการกักกันพืช
2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยการศึกษาสถานภาพศัตรูพืชกักกันในประเทศไทย
กิจกรรม : -
กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน *Meloidogyne chitwoodi* และ *Meloidogyne fallax* ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งของประเทศไทย
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Survey of *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax* the quarantine plant parasitic nematodes in Thailand
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : ไตรเดช ข่ายทอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ
ผู้ร่วมงาน : ธิติยา สารพัฒน์ กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ
รุ่งนภา ทองเครื่อง กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ
วานิช คำพานิช กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สอพ
5. บทคัดย่อ : การสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน *Meloidogyne chitwoodi* และ *M. fallax* ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง ดำเนินการในปี พ.ศ. 2559 ถึง พ.ศ. 2561 เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกมันฝรั่ง จ. เชียงราย จ. เชียงใหม่ จ. ลำพูน จ. พะเยา จ. ตาก และ จ. น่าน รวม 135 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ตรวจไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบไส้เดือนฝอยรากปมในตัวอย่างดิน 62 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม โดยปลูกมะเขือเทศในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยาไม่พบไส้เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi* และ *M. fallax* โดยการตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างระยะที่สองด้วยคูไพรเมอร์ 194/195 ได้ผลผลิตปฏิกิริยาขนาด 720 คู่เบส ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นไส้เดือนฝอยกลุ่ม tropical species เช่น *M. incognita* *M. javanica* หรือ *M. arenaria* เมื่อตรวจลักษณะรูปร่างส่วนกัน และคูไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือน

ฝอยรากปม Inc-K14-F/Inc-K-14R ซึ่งจำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* พบว่าส่วนใหญ่เป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 400 คู่เบส ตรวจสอบด้วยคูโพรเมอร์ Fjav/Rjav ซึ่งจำเพาะต่อ *M. javanica* พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* 2 ตัวอย่าง ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 720 คู่เบส

6. 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 สำหรับประเทศไทยไส้เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi* อยู่ในรายชื่อไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกันเช่นเดียวกัน แต่ยังไม่มียางานการตรวจพบไส้เดือนฝอย *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) มียางานการพบ *M. chitwoodi* ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1980 ในแถบ Pacific Northwest ของสหรัฐอเมริกา ปัจจุบันมียางานการพบไส้เดือนฝอยชนิดนี้ในประเทศ อาเจนตินา เบลเยียม เยอรมัน เนเธอร์แลนด์ โปรตุเกส สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก และแอฟริกาใต้ สำหรับไส้เดือนฝอย *M. fallax* มียางานการพบครั้งแรกในปี 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) ใกล้กับชายแดนของประเทศเยอรมันและเบลเยียม 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 แคระแกรน ใบซีด จากการได้รับน้ำและแร่ธาตุไม่เพียงพอ ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดทำความเสียหายต่อรากและส่วนใต้ดินของพืช เช่น มันฝรั่ง แครอท ทำให้เกิดความเสียหายด้านคุณภาพ ความเสียหายเชิงปริมาณยังไม่ชัดเจน ระดับความเสียหายของหัวมันฝรั่ง (Van Riel, 1993) และแครอท (Wesemael & Moens, 2008) ขึ้นกับชนิด

ของพันธุ์ ความหนาแน่นของประชากรไส้เดือนฝอยในดิน อุณหภูมิ ฤดูปลูก และชนิดดิน จำนวนรุ่น (generation) ของไส้เดือนฝอยรากปมต่อฤดูปลูกก็เป็นส่วนสำคัญต่อระดับความเสียหายเขียน ความสำคัญ หลักการและเหตุผลที่ทำการทดลองปัญหาที่ต้องแก้ไข วัตถุประสงค์และเป้าหมายของการวิจัย การตรวจเอกสาร อ้างถึงรายงานหรือผลงานที่ทำมาแล้วว่าเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับงานที่ทำ อย่างไร เพื่อสนับสนุนและเน้นให้เห็นความสำคัญของงานที่ทำ

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย เครื่อง thermal cyler และ electrophoresis

- วิธีการ

การเก็บตัวอย่างดิน

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 เพื่อตรวจหาไส้เดือนฝอยรากปม

การตรวจไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน

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

แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินโดยคลุกเคล้าตัวอย่างดินให้ทั่ว ชั่งตัวอย่างดินหนัก 250 กรัม แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินโดยวิธีการกวนตัวอย่างดินในน้ำ 2 ลิตรและกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่าง และนำตัวอย่างไส้ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงในลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ

เมื่อพบตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมในตัวอย่างดิน นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาที่ปลูกในตัวอย่างดินเพื่อให้ไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากและเจริญเติบโตพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย สุ่มกลุ่มไข่จากรากมะเขือเทศ 10 กลุ่มไข่ต่อรากนำไปแช่ในน้ำสะอาด เมื่อตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมฟักออกจากไข่ นำไปสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบด้วยวิธี PCR ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานเช่นลักษณะรูปร่างส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมียเพื่อยืนยันผลร่วมกับวิธี PCR

การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธี PCR

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

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เชื้อไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช้ส่วนปลายของ 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 นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟขนาด 700 วัตต์ นาน 6 นาที ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ไพรเมอร์ และสภาวะปฏิกิริยา PCR ตาม Adam *et al.* (2007) (ภาคผนวก)

วิธีการตรวจ และจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi* และ *M. fallax* ปฏิบัติตามวิธีการใน EPPO Standard PM 7/41

ในกรณีที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi* หรือ *M. fallax* จะตรวจยืนยันโดยละเอียดตามวิธีการใน EPPO Standard PM 7/41 ซึ่งสามารถจำแนกชนิดจากลักษณะทางสัณฐานของตัวเต็มวัยเพศผู้ ตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวอ่อนระยะที่สอง ร่วมกับการจำแนกด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *M. chitwoodi* หรือ *M. fallax* ซึ่งได้จาก sequence-characterized amplified regions (SCARs)

- การบันทึกข้อมูล

บันทึกที่ตั้งของแปลง วัน และเวลา สภาพดินฟ้าอากาศ พิกัดทางภูมิศาสตร์ บันทึกข้อมูลการตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุลต่างๆ จากตัวอย่างดิน จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม บันทึกผลการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธี PCR

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกมันฝรั่ง จ. เชียงราย 23 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 4 ตัวอย่าง จ. เชียงใหม่ 54 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 33 ตัวอย่าง จ. ลำพูน 18 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 3 ตัวอย่าง จ. พะเยา 9 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 2 ตัวอย่าง จ. ตาก 30 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 20 ตัวอย่าง และ จ. น่าน 1 ตัวอย่าง ไม่พบไส้เดือนฝอยรากปม (ตารางที่ 1) โดยมีระดับประชากรตัวอ่อนระยะที่สองในดินตั้งแต่ 1-728 ตัวต่อดิน 250 กรัม แต่ส่วนใหญ่จะมีปริมาณน้อยกว่า 50 ตัวต่อดิน 250 กรัม นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาที่ปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือน

ฝอยรากปม เมื่อใส่เดือนฝอยรากปมสร้างกลุ่มไข่ สุ่มตัวอย่างกลุ่มไข่ 10 กลุ่มต่อรากมาแช่ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ นำตัวอ่อนระยะที่สองที่ฟักออกมาจากกลุ่มไข่มาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบชนิดด้วยวิธี PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ 194/195 ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 720 คู่เบส ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นใส่เดือนฝอยกลุ่ม tropical species ซึ่งอาจเป็น ใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* *M. javanica* หรือ *M. arenaria* แต่ไม่ใช่ใส่เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi* และ *M. fallax* ซึ่งจะต้องได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1600-1700 คู่เบส เมื่อตรวจสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K-14R ซึ่งจำเพาะต่อใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และคู่ไพรเมอร์ Fjav/Rjav ซึ่งจำเพาะต่อใส่เดือนฝอยรากปม *M. javanica* พบว่าส่วนใหญ่เป็นใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 400 คู่เบส มีเพียง 2 ตัวอย่างที่เป็น *M. javanica* เมื่อตรวจสอบลักษณะของ รังรอยย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย ให้ผลตรงกับการจำแนกชนิดด้วยวิธี PCR

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ : การสำรวจใส่เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน *M. chitwoodi* และ *M. fallax* ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง ดำเนินการในปี พ.ศ. 2559 ถึง พ.ศ. 2561 ไม่พบใส่เดือนฝอยศัตรูพืชกักกันทั้ง 2 ชนิดนี้จากการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกมันฝรั่ง จ. เชียงราย จ. เชียงใหม่ จ. ลำพูน จ. พะเยา จ. ตาก และ จ. น่าน รวม 135 ตัวอย่าง แยกใส่เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ตรวจใส่เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ ใส่เดือนฝอยรากปมในตัวอย่างดิน 62 ตัวอย่าง จำแนกชนิดด้วยวิธี PCR พบว่าส่วนใหญ่เป็นใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และพบใส่เดือนฝอยรากปม *M. javanica* 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นข้อมูลที่ยืนยันว่าปัจจุบันยังไม่พบใส่เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi* และ *M. fallax* ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งของประเทศไทย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ได้ข้อมูลสถานภาพของใส่เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi* และ *M. fallax* ในแปลงปลูกมันฝรั่งในประเทศไทย สำหรับใช้สนับสนุนการออกประกาศการปลดศัตรูพืชโดย NPPO และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list) และวางแผนแนวทางในการควบคุม กำจัด เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดในกรณีที่ตรวจพบใส่เดือนฝอยชนิดนี้ ข้อมูลที่ได้สามารถประกอบในการเจรจา การนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) :

12. 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.

13. ภาคผนวก :

Table 1 Locations and number of soil samples taken from potato fields

Locations		No. of Samples	No. of RKN-positive samples
Province	District		
Chiang Rai	Wiang Pa Pao	11	0
	Mae Suai	1	0
	Phan	3	2
	Thoeng	8	2
Chiang Mai	Mueang	1	1
	Fang	23	12
	Chai Prakan	8	6
	San Sai	17	12
	Mae Rim	4	0
	Hang Dong	1	2
Lamphun	Thung Hua Chang	11	3
	Li	7	0
Phayao	Chiang Muan	2	0
	Chiang Kham	7	2
Tak	Mae Sot	3	0
	Mae Ramat	2	1
	Phop Phra	25	19
Nan	Pua	1	0
Total		135	62

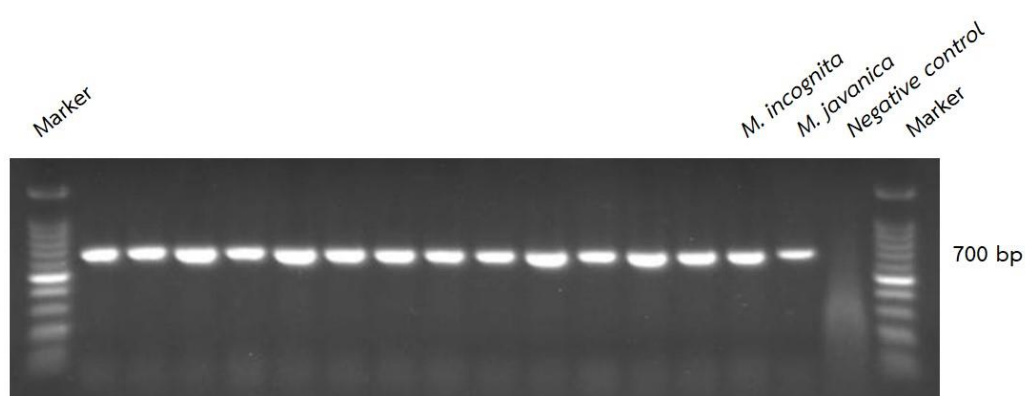


Fig. 1 PCR products amplified by 194/195 primers, all samples yielded approximately 720 bp.

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

1. Amplify the amplify 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	<i>M. mayaguensis</i> (now <i>M. enterolobii</i>)
c)	700-bp product	<i>M. hapla</i> go to (3)
d)	1,700- to 1,800-bp products	<i>M. fallax</i> and <i>M. chitwoodi</i> 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	<i>M. javanica</i>
b)	No product.....	go to (2.2)
2.2 MI-F and MI-R primers		
a)	999-bp product	<i>M. incognita</i>
b)	No product.....	go to (2.3)
2.3 Far and Rar primers		
a)	420-bp product	<i>M. arenaria</i>
3. JMV primers		
a)	540-bp product	<i>M. chitwoodi</i>
b)	670-bp product	<i>M. fallax</i>
c)	440-bp product	<i>M. hapla</i>

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	<i>M. incognita</i> -specific SCAR
Inc-K14-R	CCCGCTACACCCTCAACTTC	Randig et al. (2002)
Fjav	GGTGCGCGATTGAACTGAGC	<i>M. javanica</i> -specific SCAR
Rjav	CAGGCCCTTCAGTGGAATATAC	Zijlstra et al. (2000)
Far	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	<i>M. arenaria</i> -specific SCAR
Rar	TCGGCGATAGACACTACAACT	Zijlstra et al. (2000)
JMV1	GGATGGCGTGCTTTCAAC	<i>M. hapla</i> -, <i>M. chitwoodi</i> - and
JMV2	TTTCCCCTTATGATGTTACCC	<i>M. fallax</i> -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
				1 min for remaining primers	4°C
					∞