

Deteksi dan Identifikasi Spesies *Meloidogyne* pada Tanaman Wortel dari Dataran Tinggi Malino, Gowa, Sulawesi Selatan

Detection and Identification of *Meloidogyne* Species on Carrot from Malino Highland, Gowa, South Sulawesi

Hishar Mirsam, Supramana*, Gede Suastika

Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Meloidogyne spp. merupakan salah satu penyebab penurunan produksi wortel di Indonesia. Nematoda ini telah dilaporkan menjadi penyebab penyakit umbi bercabang di beberapa sentra produksi wortel di Pulau Jawa. Penelitian ini bertujuan mendeteksi dan mengidentifikasi karakter morfologi dan molekuler spesies *Meloidogyne* pada tanaman wortel asal Dataran Tinggi Malino, Kecamatan Tinggimoncong, Kabupaten Gowa, Sulawesi Selatan. Identifikasi morfologi dilakukan dengan pengamatan karakter pola perineal nematoda betina. Identifikasi molekuler dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mengamplifikasi DNA ribosom menggunakan primer spesifik spesies (Rjav/Fjav untuk *M. javanica*, Rar/Far untuk *M. arenaria* dan Rinc/Finc untuk *M. incognita*) dan primer multipleks (JMV1/JMVhapla/JMV2 untuk *M. hapla*, *M. chitwoodi*, dan *M. fallax*). Dua spesies *Meloidogyne*, yaitu *M. incognita* dan *M. arenaria* ditemukan berasosiasi dengan kejadian penyakit umbi bercabang. PCR menggunakan primer spesifik berhasil mengamplifikasi pita DNA *M. incognita* dan *M. arenaria* dengan ukuran berturut-turut ± 999 pb dan ± 420 pb, sedangkan PCR dengan primer multipleks tidak berhasil mengamplifikasi pita DNA. Analisis sikuen nukleotida menunjukkan isolat *M. incognita* asal Malino memiliki kekerabatan yang dekat dengan isolat asal Bangka-Indonesia, Cina (isolat JS2), dan Malaysia (isolat JIK4, FIK4, JIT19, dan FIT19) dengan nilai homologi berkisar 99.2–100.0%. Sikuen nukleotida *M. arenaria* asal Malino-Indonesia telah didaftarkan pada GenBank dengan nomor akses KP234264 dan menjadi data pertama yang tersedia di GenBank.

Kata kunci: *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, umbi bercabang

ABSTRACT

Meloidogyne spp. was reported as the cause of branched tuber disease on several carrot production areas in Java, Indonesia and may potentially cause yield loss. This research aimed to use morphological and molecular characters to detect and identify *Meloidogyne* species on carrot from Malino Highland, Sub-district of Tinggimoncong, District of Gowa, South Sulawesi. Morphological identification was done based on character of the female perineal pattern. Molecular identification was based on amplification of r-DNA by polymerase chain reaction technique using species specific primers (Fjav/Rjav for *M. javanica*, Far/Rar for *M. arenaria*, and Finc/Rinc for *M. incognita*) and multiplex primer (JMV1/JMVhapla/JMV2 for *M. hapla*, *M. chitwoodi*, and *M. fallax*). Two of *Meloidogyne* species, i.e. *M. incognita* and *M. arenaria* were detected associated with the incidence of carrot branched tuber. The specific primers amplified two DNA bands, i.e. ± 999 bp of *M. incognita* and ± 420 bp of *M. arenaria*, while multiplex primer was failed to amplify DNA bands. Nucleotide sequence analysis showed *M. incognita* isolate of Malino was closely related to *M. incognita* isolate from Bangka-Indonesia, China

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jalan Kamper, Kampus Darmaga IPB, Bogor 16680
Tel: 0251-8629364, Faks: 0251-8629362, Surel: supramana@ipb.ac.id

(isolate JS2), and Malaysia (isolates JIK4, FIK4, JIT19, and FIT19) with homology of 99.2–100.0%. The nucleotide sequences of *M. arenaria* from Malino was submitted to GenBank with accession number KP234264, which was the first nucleotide sequence data in GenBank.

Key words: branched tuber, *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*

PENDAHULUAN

Kabupaten Gowa merupakan salah satu sentra produksi wortel terbesar di Sulawesi Selatan, dengan rata-rata luas panen 163 ha dan produksi berkisar antara 9489 ton dan 15 637 ton (BPS Gowa 2013). Salah satu kendala produksi wortel di Indonesia termasuk yang dihadapi petani-petani di Kabupaten Gowa ialah penyakit umbi bercabang yang disebabkan oleh nematoda puru akar, *Meloidogyne* spp. Beberapa penelitian terdahulu berhasil mengidentifikasi 4 spesies *Meloidogyne* yang menginfeksi tanaman wortel di beberapa sentra produksi wortel di Pulau Jawa, yaitu *M. incognita*, *M. hapla*, *M. javanica*, dan *M. arenaria* (Hikmia *et al.* 2012; Taher *et al.* 2012; Halimah *et al.* 2013). Gejala malformasi umbi berupa puru, umbi bercabang, dan lesio ditemukan pada umbi wortel di daerah Malino. Penyebab umbi bercabang pada tanaman wortel di Dataran Tinggi Malino di Kabupaten Gowa sampai saat ini belum diketahui. Oleh karena itu, perlu dilakukan kajian untuk mengidentifikasi penyebab penyakit umbi bercabang di Dataran Tinggi Malino.

Nematoda puru akar secara morfologi sangat mirip satu dengan yang lain sehingga sulit diidentifikasi sampai tingkat spesies. Selain itu, beberapa spesies nematoda puru akar sering ditemukan bersamaan pada akar tanaman yang sama. Identifikasi pola perineal atau pola sidik pantat nematoda puru akar betina merupakan salah satu teknik identifikasi morfologi nematoda yang diperkenalkan oleh Eisenback *et al.* (1981). Selain identifikasi pola perineal, identifikasi dengan pendekatan biologi molekuler diyakini lebih cepat dan lebih akurat dibandingkan dengan identifikasi karakter morfologi dan pola perineal (Esbenshade dan Tirantaphyllou 1990). Salah satu teknik molekuler yang dilakukan ialah

dengan mengamplifikasi bagian DNA ribosom pada daerah *internal transcribed spacers* (ITS) melalui teknik *polymerase chain reaction* (PCR) (Zijlstra *et al.* 2000).

Penelitian ini bertujuan mendeteksi dan mengidentifikasi spesies *Meloidogyne* pada tanaman wortel asal Dataran Tinggi Malino, Kecamatan Tinggimoncong, Kabupaten Gowa, Sulawesi Selatan berdasarkan karakter pola perineal dan molekuler.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan sampel berupa umbi bergejala dan tanah terinfestasi *Meloidogyne* spp. dilakukan di Kelurahan Pattapang, Kecamatan Tinggimoncong, Kabupaten Gowa, Sulawesi Selatan, yaitu di dusun Buluballea, Lembanna, dan Kampung Baru. Lokasi penelitian berada pada ketinggian 1750 m di atas permukaan laut.

Perbanyakkan *Meloidogyne* spp.

Meloidogyne spp. diperbanyak pada tanaman tomat yang ditanam pada medium tanah yang berasal dari pertanaman wortel di daerah Malino. Setelah tanaman tomat berumur 4–5 minggu, akar dicuci dengan air mengalir, selanjutnya dilakukan pemotongan puru akar dan akar rambut berpuru. Puru akar yang diperoleh digunakan untuk pengamatan jaringan dan ekstraksi DNA.

Pengamatan Keberadaan *Meloidogyne* spp. di dalam Jaringan

Puru akar direndam dalam kloroks 5% selama 10 menit dan dibilas dengan air hingga tak berbau. Puru akar kemudian direndam dalam *acid fuchsin* dan dipanaskan hingga mendidih. Akar rambut berpuru dibilas dengan air, kemudian direndam dalam campuran 20 mL gliserin dan 2 tetes HCl lalu dipanaskan sampai berwarna merah pudar. Puru akar diletakkan pada gelas preparat cekung, kemudian diamati

stadium nematoda yang ada menggunakan mikroskop stereo (Olympus tipe B202). Hal ini dilakukan untuk mengamati stadium nematoda yang berada di dalam akar.

Pembuatan Preparat Nematoda

Preparat nematoda dibuat untuk pengamatan pola perineal sebagai dasar identifikasi secara morfologi. Akar dengan gejala puru dicuci untuk membersihkan tanah yang menempel. Puru dipisahkan dari akar, kemudian direndam selama kurang lebih 24 jam. Setelah puru melunak, nematoda betina dicongkel perlahan dari puru dan dipindahkan ke dalam cawan sirakus yang telah berisi asam cuka. Asam cuka berguna untuk menghilangkan lemak yang berada dalam tubuh nematoda betina. Setelah itu, nematoda betina dipindahkan ke gelas objek. Bagian anterior dipotong dengan pisau khusus, kemudian bagian posterior ditekan agar sisa kotoran dan lemak dalam tubuh nematoda keluar. Potongan direndam dalam laktofenol 0.03% dan dibiarkan sebentar. Bagian posterior disayat dan jaringan di dalam dibuang secara hati-hati, kemudian dipindahkan ke gelas objek lain dengan ditetesi laktofenol dan ditutup dengan gelas penutup. Preparat diamati menggunakan mikroskop kompon. Identifikasi dilakukan mengikuti panduan Eisenback *et al.* (1981) serta Shurtleff dan Averre (2005).

Identifikasi Menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction

Ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA mengikuti metode Zijlstra *et al.* (2000). Nematoda betina sebanyak 10–20 ekor dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 mL. Sebanyak 150 μ L bufer ekstrak (200 mM Tris HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, dan 0.5% SDS) ditambahkan ke dalam tabung dan nematoda digerus sampai halus dengan *cornical grinder* steril. Sebanyak 150 μ L larutan kloroform:isoamilalcohol (24:1) ditambahkan dan dicampurkan hingga homogen dengan divorteks selama 3 menit. Suspensi yang terbentuk disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 11 000 rpm. Supernatan hasil sentrifugasi diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru.

Sodium asetat 3M (pH 5.2) ditambahkan ke dalam supernatan dengan perbandingan 1:10 dan dicampur hingga homogen. Isopropanol sebanyak 2/3 volume supernatan ditambahkan ke dalam tabung dan dicampur hingga homogen. Tabung diinkubasi pada suhu -20°C selama semalam. Suspensi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit. Cairan dalam tabung dibuang dan pelet (endapan DNA) yang terbentuk dicuci dengan etanol 80% sebanyak 150 mL, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit. Cairan alkohol yang digunakan untuk mencuci pelet dibuang dan endapan DNA dikeringkan. Bufer Tris EDTA ditambahkan pada tabung mikro sebanyak 30–100 μ L sesuai dengan ketebalan endapan DNA.

Amplifikasi DNA Nematoda. Amplifikasi DNA menggunakan mesin *thermo cycle* PCR. Primer yang digunakan merupakan primer spesifik spesies untuk *M. incognita*, *M. javanica*, dan *M. arenaria*, dan primer multipleks untuk *M. hapla*, *M. chitwoodi*, dan *M. fallax* (Tabel 1). Setiap reaksi yang menggunakan primer spesifik spesies terdiri atas 12.5 μ L 2x Go Taq®Green Master mix (Promega), 1 μ L primer *Forward* 10 μ M, 1 μ L primer *Reverse* 10 μ M, 2 μ L templet DNA, dan 8.5 μ L air bebas nuklease sehingga volume menjadi 25 μ L. Reaksi yang menggunakan primer multipleks spesies terdiri atas 12.5 μ L 2x Go Taq®Green Master mix (Promega), 1 μ L primer *forward* JMV1 10 μ M, 1 μ L primer *reverse* JMV2 10 μ M, 1 μ L primer *reverse* JMV hapla 10 μ M, 2 μ L templet DNA, dan 7.5 μ L air bebas nuklease sehingga volume menjadi 25 μ L.

Program amplifikasi DNA disesuaikan dengan primer yang digunakan dan spesies yang akan dideteksi. Amplifikasi DNA melalui 4 tahapan, yaitu denaturasi, aneling, ekstensi, dan ekstensi akhir (Tabel 2).

Analisis Sikuen Nukleotida. Produk amplifikasi dikirim ke First Base (Malaysia) untuk disikuen. Hasil sikuen dianalisis menggunakan program *basic local alignment search tool* (BLAST) dengan program optimasi untuk mendapatkan urutan basa DNA

Tabel 1 Pasangan primer yang digunakan untuk identifikasi spesies *Meloidogyne* spp. dengan teknik *polymerase chain reaction*

Spesies	Kode primer	Sikuen 5'-3'	Target DNA (pb)	Sumber rujukan
<i>Meloidogyne</i>				
<i>M. incognita</i>	Finc Rinc	GTGAGGATTCAGTCTCCCAG ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC	± 999	Zijlstra <i>et al.</i> (2000)
<i>M. arenaria</i>	Far Rar	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC TCGGCGATAGACACTACAAC	± 420	Zijlstra <i>et al.</i> (2000)
<i>M. javanica</i>	Fjav Rjav	GGTGC GCGATTGAACTGAGC CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC	± 720	Zijlstra <i>et al.</i> (2000)
<i>M. hapla</i> , <i>M. chitwoodi</i> , <i>M. fallax</i>	JMV1 JMVhapla JMV2	GGATGGCGTGCTTTCAAC AAAAATCCCCTCGAAAAATCCACC TTCCCCTTATGATGTTTACCC	± 440 ± 540 ± 670	Wishart <i>et al.</i> (2002)

Tabel 2 Program amplifikasi target DNA untuk masing-masing spesies *Meloidogyne* dengan teknik *polymerase chain reaction*

Tahap amplifikasi ^{a,b}	Suhu (°C); waktu (detik)			
	<i>M. incognita</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>M. javanica</i>	<i>M. hapla</i> , <i>M. chitwoodi</i> , <i>M. fallax</i>
Pradenaturasi	95;120	94;240	94;240	94;240
Denaturasi	94; 30	94; 30	94; 30	94; 30
Aneling	57; 45	55; 45	55; 45	50; 30
Ekstensi	72;120	72; 60	72; 60	72; 90
Ekstensi akhir	72;600	72;420	72;420	72;420

^aSuhu penyimpanan hasil amplifikasi 4 °C setelah tahap polimerisasi akhir.

^bAmplifikasi dilakukan sebanyak 35 kali, 35 kali, 30 kali, dan 45 kali berturut-turut untuk *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, dan (*M hapla*, *M. chitwoodi*, *M. fallax*).

yang terdapat dalam situs National Center for Biotechnology Information (NCBI). Hasil sikuen nukleotida yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan penyejajaran berganda *ClustalW* pada perangkat lunak Bioedit Sequence Alignment Editor versi 7.1.3. Hubungan kekerabatan antarisolat dikonstruksi menggunakan perangkat lunak Molecular Evolutionary Genetic Analysis Software versi 6.06 (MEGA6) dengan *bootstrap* 1000 kali ulangan.

HASIL

Perkembangan *Meloidogyne* spp. di dalam Akar

Meloidogyne spp. memperlihatkan stadium perkembangan mulai dari telur, juvenil 1, 2, 3, dan 4, sampai dewasa. Telur berada di permukaan jaringan akar tanaman sampai stadium juvenil 2. Juvenil 1 berada dalam

cangkang telur sampai mengalami pergantian kulit pertama menjadi juvenil 2. Juvenil 2 aktif bergerak mencari jaringan akar tanaman untuk melakukan penetrasi. Setelah berhasil masuk, nematoda mengalami pergantian kulit kedua dan ketiga berturut-turut menjadi juvenil 3 dan 4 di dalam jaringan tanaman. *Meloidogyne* betina dewasa akan menetap pada jaringan akar tanaman yang terinfeksi (Gambar 1) dan menyebabkan pembesaran sel akar.

Identifikasi Spesies *Meloidogyne* Berdasarkan Pola Perineal

Spesies *Meloidogyne* yang berhasil diidentifikasi, yaitu *M. incognita* dan *M. arenaria*. Pola perineal *M. incognita* sangat khas berupa lengkungan dorsal yang tinggi dan menyempit, sedangkan pada bagian paling luarnya sedikit melebar dan agak mendatar, pola steriasinya terlihat kasar dan bergelombang, serta tidak memiliki garis

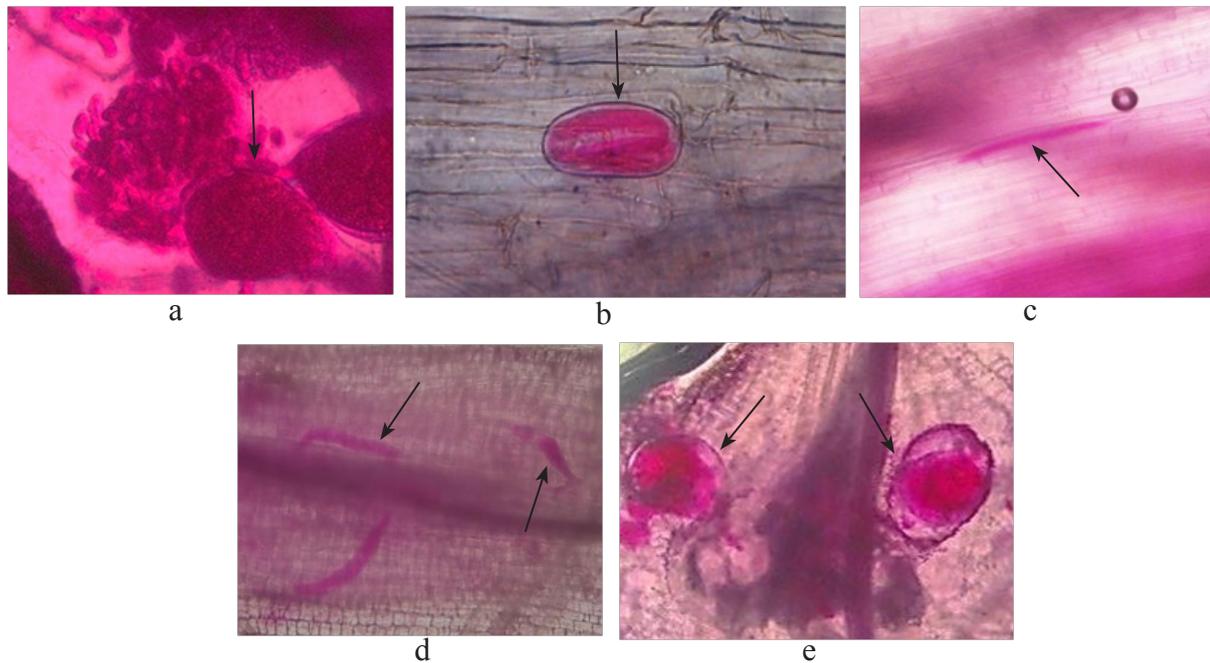
lateral (Gambar 2a). Pola perineal *M. arenaria* sangat bervariasi, ditandai dengan lengkungan tepi yang rendah dan bulat dengan *striae* yang halus hingga bergelombang (Gambar 2b).

Identifikasi Spesies *Meloidogyne* Berdasarkan ITS r-DNA

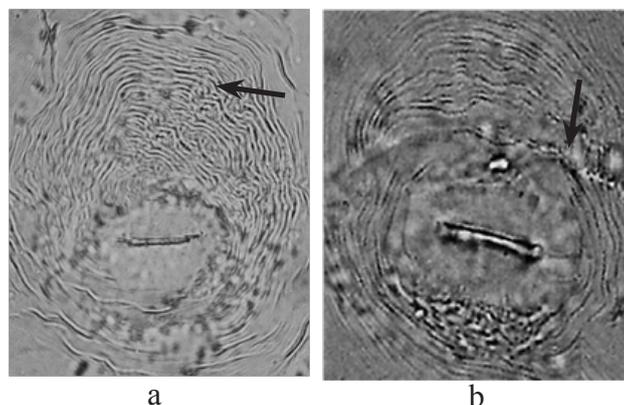
Pita DNA berukuran ± 999 pb dan ± 420 pb berhasil diamplifikasi menggunakan pasangan primer berturut-turut Finc/Rinc dan Far/Far, sedangkan penggunaan primer Fjav/Rjav dan multipleks (JMV1/JMVhapla/JMV2) tidak berhasil mengamplifikasi DNA (Gambar 3). Sikuen nukleotida fragmen DNA hasil

amplifikasi memiliki homologi tertinggi dengan *M. incognita* (Tabel 3).

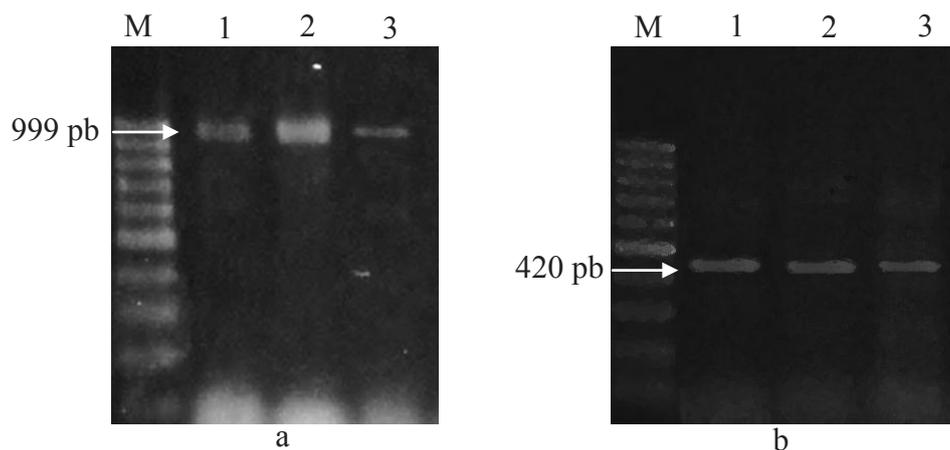
Analisis filogenetika memperlihatkan *M. incognita* asal Malino berada satu kelompok dengan isolat *M. incognita* asal Bangka-Indonesia, Cina (isolat JS2), dan Malaysia (isolat JIK4, FIK4, JIT19, dan FIT19) dengan nilai koefisien jarak genetik 0.000 untuk isolat Bangka dan JS2, 0.0023 untuk isolat JIK4 dan FIK4, dan 0.005 untuk isolat JIT19 dan FIT 19 (Gambar 4). Analisis filogenetika *M. arenaria* belum dapat terkonfirmasi karena sikuen nukleotida *M. arenaria* asal Malino dengan menggunakan primer Far/Mar yang didesain



Gambar 1 Siklus hidup *Meloidogyne* spp. dalam jaringan akar. a, massa telur; b, juvenil 1; c, juvenil 2; d, juvenil 3 dan 4; dan e, nematoda betina dewasa. Gambar 1b, pembesaran 100×; Gambar 1a,1c,1d,1e, pembesaran 40×.



Gambar 2 Pola perineal *Meloidogyne* betina asal Malino, Sulawesi Selatan (pembesaran 40×). a, *M. incognita*; b, *M. arenaria*



Gambar 3 Hasil amplifikasi DNA *Meloidogyne* spp. asal Malino, Sulawesi Selatan pada 1% gel agarosa. M, penanda DNA 100 pb; a, *M. incognita*; b, *M. arenaria*; Sampel berasal dari. 1, Buluballea; 2, Lembanna; dan 3, Kampung Baru.

Tabel 3 Homologi sikuen nukleotida spesies *Meloidogyne* spp. asal Malino, Sulawesi Selatan (nomor aksesori KP234265) dengan isolat-isolat yang ada pada GenBank

Spesies	Isolat	Asal	No. aksesori GenBank	Homologi (%) ^a
<i>M. incognita</i>	Bangka	Indonesia	^b	100.0
<i>M. incognita</i>	JS2	Cina	JN005841	100.0
<i>M. incognita</i>	JIK4	Malaysia	KF041337	99.5
<i>M. incognita</i>	FIK4	Malaysia	KF041330	99.5
<i>M. incognita</i>	JIT19	Malaysia	KF041339	99.2
<i>M. incognita</i>	FIT19	Malaysia	KF041332	99.2

^aMatriks identitas sikuen diperoleh dengan perangkat lunak Bioedit 7.1.3.

^bIsolat koleksi Laboratorium Nematologi Tumbuhan IPB dan belum didaftarkan di GenBank.

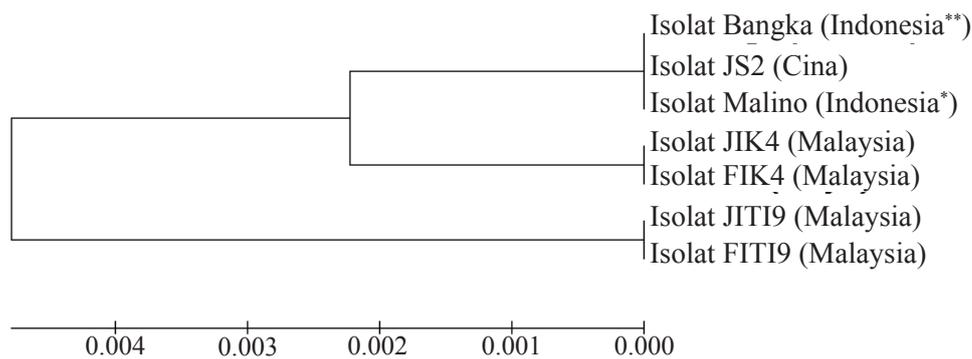
oleh Zijlstra *et al.* (2000) belum tersedia pada GenBank. Sikuen penelitian asal Malino-Indonesia telah didaftarkan pada GenBank dengan nomor aksesori KP234265 untuk *M. incognita* dan KP234264 untuk *M. arenaria*.

PEMBAHASAN

Dua spesies *Meloidogyne* spp., yaitu *M. incognita* dan *M. arenaria*, berhasil diidentifikasi berdasarkan pola perineal dan sikuen nukleotidanya. Kedua spesies tersebut mengindikasikan bahwa pertanaman wortel di Dataran Tinggi Malino sudah terinfestasi oleh *Meloidogyne* spp. *M. incognita* dan *M. arenaria* merupakan spesies *Meloidogyne* yang bersifat kosmopolit dan telah dilaporkan di seluruh dunia. Di Indonesia, kedua spesies ini dilaporkan telah menginfestasi pertanaman wortel di daerah Jawa Timur, Jawa Tengah, dan Jawa Barat. (Hikmia *et al.* 2012; Taher *et al.* 2012; Halimah *et al.* 2013).

Taylor *et al.* (1982) menyatakan bahwa terdapat hubungan antara iklim dan karakteristik tanah terhadap distribusi *Meloidogyne* spp. Suhu optimum untuk perkembangan *M. incognita* dan *M. arenaria* ialah 15–25 °C. Keberadaan spesies *Meloidogyne* spp. di Malino terkait erat dengan kondisi iklim. Suhu udara tahunan rata-rata berkisar 17–20 °C dengan rata-rata suhu maksimum 18–20 °C terjadi pada bulan Juli/Agustus, dan rata-rata suhu minimum 15–17 °C terjadi pada bulan Desember/Januari.

Infeksi *Meloidogyne* spp. pada umbi wortel di Malino menyebabkan malformasi dengan 4 tipe gejala, yaitu umbi bercabang, agak bulat dan bercabang, pendek dan membulat, serta umbi pecah. Selain itu, juga ditemukan lesio gelap pada umbi, tetapi tidak terdapat puru. Wesemael dan Moens (2008) menjelaskan bahwa gejala yang disebabkan oleh *Meloidogyne* spp. bervariasi sesuai dengan jenis tanaman inang, kepadatan



Gambar 4 Pohon filogenetika spesies *Meloidogyne incognita* yang menginfeksi pertanaman wortel di dataran tinggi Malino, Sulawesi Selatan dengan analisis UPGMA menggunakan program Bioedit 7.1.3. dan MEGA 6.06. Skala di bawah gambar adalah skala nilai koefisien jarak genetik yang menggambarkan jumlah rata-rata perubahan nukleotida di antara isolat.

*Sampel penelitian; **Isolat koleksi Laboratorium Nematologi Tumbuhan IPB.

populasi nematoda, dan kondisi lingkungan. Finley (1981) mengungkapkan bahwa infeksi *Meloidogyne* spp. pada umbi terkadang sulit untuk dideteksi karena tidak menimbulkan puru pada permukaan umbi. Oleh karena itu, metode molekuler menggunakan primer spesifik spesies dapat membantu untuk mendeteksi infeksi *Meloidogyne* spp.

Analisis sikuen nukleotida menunjukkan hubungan kekerabatan yang dekat antara *M. incognita* asal Malino dengan *M. incognita* asal Bangka, Cina, dan Malaysia. Diduga *Meloidogyne* spp. tersebar ke Indonesia khususnya di Sulawesi Selatan melalui aktivitas impor benih wortel dari Cina. Badan Pusat Statistik (BPS 2013) mencatat Cina menjadi negara pengekspor sayuran dan buah-buahan terbesar ke Indonesia khususnya pada Februari 2013. Salah satu jenis sayuran yang paling banyak diimpor adalah wortel.

DAFTAR PUSTAKA

- [BPS] Badan Pusat Statistik Gowa. 2013. *Gowa dalam Angka 2013*. Makassar (ID): BPS Kabupaten Gowa.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2013. *Buletin Statistik Perdagangan Luar Negeri, Impor*. Jakarta (ID): BPS Indonesia.
- Eisenback JD, Hirschmann H, Sasser JN, Triantaphyllou AC. 1981. *A Guide to The Four Most Common Species of Root-Knot Nematodes (Meloidogyne spp.) with A Pictorial Key*. North Carolina (US): Department of Plant Pathology and Genetic North Carolina University and The United States Agency for International Development.
- Esbenshade PR, Triantaphyllou AC. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *J Nematol.* 22(1):10–15.
- Finley AM. 1981. Histopathology of *Meloidogyne chitwoodi* (Golden *et al.*) on russet burbank potato. *J Nematol.* 13(4):486–491.
- Halimah, Supramana, Suastika G. 2013. Identifikasi spesies *Meloidogyne* pada wortel berdasarkan sikuen nukleotida. *J Fitopatol Indones.* 9(1):1–6. DOI: <http://dx.doi.org/10.14692/jfi.9.1.1>.
- Hikmia Z, Supramana, Suastika G. 2012. Identifikasi spesies *Meloidogyne* spp. penyebab umbi bercabang pada tanaman wortel di Jawa Timur. *J Fitopatol Indones.* 8(3):73–78. DOI: <http://dx.doi.org/10.14692/jfi.8.3.73>.
- Shurtleff MC, Averre CW. 2005. *Diagnosing Plant Disease Caused by Nematodes*. St. Paul, Minnesota (US): APS Press.
- Taher M, Supramana, Suastika G. 2012. Identifikasi *Meloidogyne* penyebab penyakit umbi bercabang pada wortel di Dataran Tinggi Dieng. *J Fitopatol Indones.* 8(1):16–21. DOI: <http://dx.doi.org/10.14692/jfi.8.1.16>.

- Taylor AL, Sasser JN, Nelson LA. 1982. *Relationship of climate and soil characteristics to geographical distribution of Meloidogyne species in agricultural soil*. Nort Carolina (US): Department of Plant Pathology, Nort Carolina University and the United Agency for International Development.
- Wesemael L, Moens M. 2008. Quality damage on carrot (*Daucus carota* L.) caused by the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi*. *J Nematol.* 10(1):261–270. DOI: <http://dx.doi.org/10.1163/156854108783476368>.
- Zijlstra C, Dorine TH, Donkers-Venne M, Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assay. *Nematology.* 2(8):847–853. DOI: <http://dx.doi.org/10.1163/156854100750112798>.