

## DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL NEMATODO FORMADOR DE AGALLAS *Meloidogyne* spp. EN SUELOS AGRÍCOLAS DESTINADOS AL CULTIVO DE *Solanum lycopersicum* MEDIANTE LA TÉCNICA PCR

Natalia Cantuña<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.  
nlcantuna@hotmail.com

---

### RESUMEN

En el Ecuador se destinan grandes extensiones de terreno para el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) debido a sus propiedades alimentarias y a las ganancias en la producción que genera este cultivo. Sin embargo, la producción se ve afectado por el ataque del nematodo del nudo *Meloidogyne* spp. induce la formación de agallas en las raíces de la planta. Los ensayos realizados con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en suelos en San Pedro de Pimampiro, provincia de Imbabura permitieron la detección del género *Meloidogyne* spp. y la identificación de las principales especies que atacan a este cultivo como *M. incognita* y *M. javanica*. A nivel de campo se recolectaron muestras de suelo y raíz mediante un muestreo sistemático en invernaderos de la zona. En el laboratorio, se realizó la extracción de ADN de suelo y de raíz utilizando los kits comercial de la casa de MoBio Laboratories Inc y Qiagen. La técnica PCR se realizó en un volumen de 15 µl y los productos de amplificación se observaron en geles de agarosa con luz UV. La detección del género *Meloidogyne* spp se logró con la utilización del gen *16D10*, cuya región es conservada en las cuatro especies del nematodo. En las muestras de suelo y raíz recolectadas en Pimampiro se evidenció la presencia de un sólo amplicon de 200 pb, lo que indica que el género *Meloidogyne* se encuentra presente en las muestras. La identificación de las especies se realizó con primers diseñados específicos para cada especie. En el caso de *M. javanica* se utilizó el gen del colágeno *Mjcol-3* con el cual se identificó al nematodo en raíz y suelo. La identificación de *M. incognita* se utilizó el gen de la proteína 8D5 de las glándulas esofageales, sin embargo, en las muestras analizadas no se evidenció la presencia del amplicon deseado.

**Palabras clave:** *Meloidogyne* spp., *M. incognita*, *M. javanica*, detección, identificación.

### ABSTRACT

The Andean region is an important domestication centre of *Solanaceae* family. In Ecuador, crop productivity has been limited by *Meloidogyne* spp. nematode attack. However, it was identified that the *Mi-1* gene presence in *Solanum peruvianum* confers resistance against several organisms, which included nematodes, potato aphid and whitefly. Therefore, the study of *Mi-1* homologues in different *Solanaceae* family members represents a great opportunity to find other alternative sources of resistance. A total of 43 *Solanum* accessions were analyzed to find homologues genes, for this reason specific primers were designed to amplify the exon 3 and the functional intron of the *Mi-1* gene. After that, the most representative amplicons were chosen, and they were sequenced and bioinformatically analyzed. As a result, was determined that different *Mi-1* homologues were amplified.

**Key words:** *Meloidogyne* spp., *M. incognita*, *M. javanica*, detection, identification.

---

### INTRODUCCIÓN

En el Ecuador se destinan grandes extensiones de terreno para el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) debido a sus propiedades alimenticias (INEC, 2010). Es un cultivo de ciclo corto cuya producción genera ganancias

relevantes a los agricultores y en la actualidad es la hortaliza más estudiada a nivel mundial (SICA, 2001; Sanguetti, 2003; Ñuño, 2007). Sin embargo la producción se ve afectada por el nematodo del nudo de la raíz *Meloidogyne* spp. que representa una plaga particular debido al desarrollo de una sofisticada interacción con las raíces de la planta hospedera donde inducen la formación de células multinucleadas gigantes y agallas, que sólo pueden ser observadas cuando la planta se desecha, igualmente los síntomas que se presentan en la parte aérea de la planta suelen confundirse con otras enfermedades causadas por bacterias, virus, patógenos y microorganismos (Taylor y Sasser, 1983; Jones *et al.*, 2001; Sánchez, 2007; Rodríguez *et al.*, 2005; Perry *et al.*, 2009). Durante varios años han utilizado estrategias como el control físico, químico, prácticas culturales, y control biológico de forma individual o en conjunto para controlar este nematodo (Escalona *et al.*, 2009; Revelo, 2003; Rahman, 2003). Las técnicas tradicionales para la identificación de especies de nematodos *Meloidogyne* spp se han basado en caracteres morfológicos (Eisenback, 1985), pruebas de rango de hospedero y fenotipos isoenzimáticos (Zouhar *et al.*, 2007). En vista que la identificación de las especies no es precisa mediante los métodos tradicionales se han buscado otras alternativas basados en marcadores moleculares específicos de la especie, tales como sondas de ADN y *primers* de PCR, los cuales se han centrado principalmente en las especies principales como *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* (López, Salazar y Azofita, 1991; Lovic *et al.*, 1995; Velasco, 2005; McCuiston *et al.*, 2007; Qui *et al.*, 2006). Las especies *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* usualmente se encuentran en zonas cálidas o tropicales y son responsables de grandes daños agronómicos. Sin embargo, debido a su linaje evolutivo estrechamente relacionados y su naturaleza genómico poliploides (Sardanelli, 2010), es difícil desarrollar técnicas moleculares para la identificación (Sasser, 1982; Sasser y Freckman, 1987). Informes de identificación molecular de estas especies son relativamente pocos (Qui *et al.*, 2006; Starr, 2011). Se han publicado tres pares de *primers* específicos para las identificaciones de las especies *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*. Esta investigación presenta un producto similar para *M. incognita* y *M. javanica* con *primers* específicos desarrollados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal para detectar al género e identificar las especies presentes en el país proporcionando información con vías al manejo de plagas y enfermedades adecuado al cultivo.

## METODOLOGÍA

**Recolección en campo.-** En invernaderos con cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum*), se recolectaron cuatro muestras de raíz al azar las cuales mostraron un alto grado de agallamiento. Adicionalmente se tomaron 10 muestras de suelo siguiendo un muestreo sistemático de 10 sub muestras que componen una muestra compuesta de 1Kg en la ciudad San José de Pimampiro, provincia de Imbabura. Los puntos geográficos fueron tomados con el GPS (eTrex Garmin) y otra información relevante del sitio de muestreo se encuentran descritos en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Descripción de los puntos de muestreo en la ciudad de San José de Pimampiro, cantón Pimampiro, provincia de Imbabura.

No.	Muestra	Sector	Coordenadas (DDMM.MMM)	Etapas de crecimiento
1	SJ 1	San José	N 00° 23.459' W 077° 56.948'	Plantas de 3 meses
2	SJ 2*	San José	N 00° 23.445' W 077° 56.970'	Cultivo en producción
3	SJ 3	San José	N 00° 23.604' W 077° 56.953'	Cultivo en producción
4	SJ 4	San José	N 00° 23.894' W 077° 57.107'	Plantas de 1 mes
5	SJ 5*	San José	N 00° 23.874' W 077° 57.106'	Cultivo en producción
6	SJ 6	San José	N 00° 23.619' W 077° 57.164'	Plantas de 4 meses

7	SJ 7	San José	N 00° 23.617' W 077° 57.165'	Plantas de 2 meses
8	SJ 8*	San José	N 00° 23.523' W 077° 57.044'	Cultivo en producción
9	SJ 9	San José	N 00° 23.592' W 077° 56.883'	Cultivo en producción
10	R 1*	El Rosal	N 00° 23.316' W 077° 56.783'	Plantas de 2 meses

\*Muestras de raíz recolectadas en campo para los análisis

**Extracción de ADN genómico de raíz.-** En el proceso de extracción de ADN genómico se utilizaron 100mg de raíz de *Solanum lycopersicum* con un alto índice de agallamiento tomado en campo. El aislamiento del material genético se realizó mediante el *DNeasy Plant Mini Kit* de la casa comercial Qiagen®. Todas las muestras fueron luego almacenadas a -20 °C hasta su uso. Las muestras se cuantificaron con espectrofotometría.

**Extracción de ADN genómico de suelo.-** En el proceso de extracción de ADN genómico se utilizaron 0,5g de suelo recolectado en campo de invernaderos de *Solanum lycopersicum*. El aislamiento del material genético se realizó mediante el *Ultraclean soil DNA isolation Kit* de la casa comercial MoBio Inc. Laboratories. Todas las muestras fueron luego almacenadas a -20 °C hasta su uso. Las muestras se cuantificaron con espectrofotometría.

**Primers y condiciones de la PCR.-** Para la detección de *Meloidogyne* spp se utilizó el gen *16D10* que codifica una proteína efectora, los *primers* son 16D10F: 5'-GGCAAAAAGCCTAGTG-3' y 16D10R: 5'-CAGATATAATTTTATTCAG-3'. Los *primers* para la identificación de *M. incognita* y *M. javanica* se diseñaron y analizaron bioinformáticamente. Para *M. javanica* los *primers* son JavF: 5'- TCAAGGCGAAGCAGGACGGC-3' y JavR: 5'- AGGACCTGGCGGCCCTTTGA-3' a partir del gen de colágeno (GenBank: U94492.1) mientras que para *M. incognita* los *primers* son IncF: 5'- CCAGGGCCTTCGCCACACAA-3' y IncR: 5'-GGCCACCAAAAAGGTGGCTGT-3' a partir del gen de las células de la glándula esofageal de la proteína secretora 8D05 (GenBank: HQ728271.1).

En el Cuadro 2 se describen las condiciones óptimas de la *master mix* para la detección e identificación de las especies del genero *Meloidogyne* spp. En las muestras de suelo se utilizó el coadyuvante BSA en la PCR para evitar posibles inhibidores de la muestra, principalmente ácidos húmicos y ácidos fúlvicos.

**Cuadro 2.** Condiciones de la *master mix* empleadas para la detección e identificación del genero *Meloidogyne* spp y de las principales especies descritas en el Ecuador *M. incognita* y *M. javanica*.

Reactivo	Ci	Cf
<b>Buffer</b>	10 X	1 X
<b>MgCl2</b>	50 mM	1,5 mM
<b>dNTPs</b>	10 mM	0,2 mM
<b>Primer f</b>	10 µM	0,5 µM
<b>Primer r</b>	10 µM	0,5 µM
<b>BSA**</b>	700 ng/µl	200 ng/µl
<b>Taq polimerasa</b>	5 U/µl	1,25 U
<b>ADN</b>	Raíz 30 ng/µl	
	Suelo 20 ng/µl	
<b>Volumen final de reacción 15µl</b>		

Ci, concentración inicial, Cf, concentración final

\*\* Reactivo utilizado solo en la amplificación de muestras de suelo

El Cuadro 3 se detalla la amplificación de muestras de suelo y raíz para la detección de *Meloidogyne* spp. en el termociclador ESCO HEALTHCARE Swift·MaxPro® con las siguientes condiciones:

**Cuadro 3.** Programa de PCR estandarizado para la detección del genero *Meloidogyne* spp. mediante el gen *16D10*.

Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos	
1	Denaturación inicial	94	5:00	1
2	Denaturación	95	0:45	35
3	Annealing	50	1:00	
4	Extensión	72	1:00	
5	Extensión final	72	10:00	1
6	Estabilización	4	5:00	1

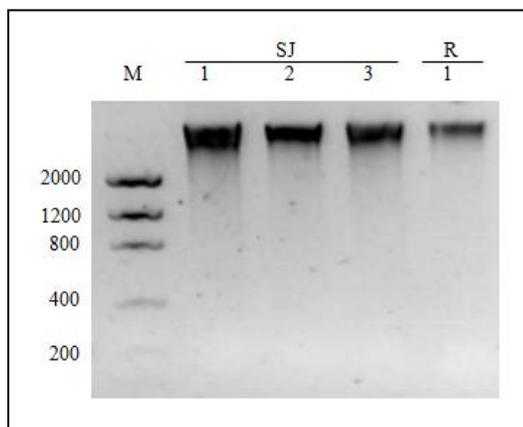
El Cuadro 4 detalla las condiciones térmicas utilizadas para la identificación de las especies de *M. incognita* y *M. javanica* en las muestras de raíz y de suelo mediante el termociclador ESCO HEALTHCARE Swift·MaxPro® con las siguientes condiciones:

**Cuadro 4.** Programa de PCR estandarizado para la identificación de las especies *M. incognita* y *M. javanica* en muestras de suelo y raíz mediante el uso de *primers* específicos.

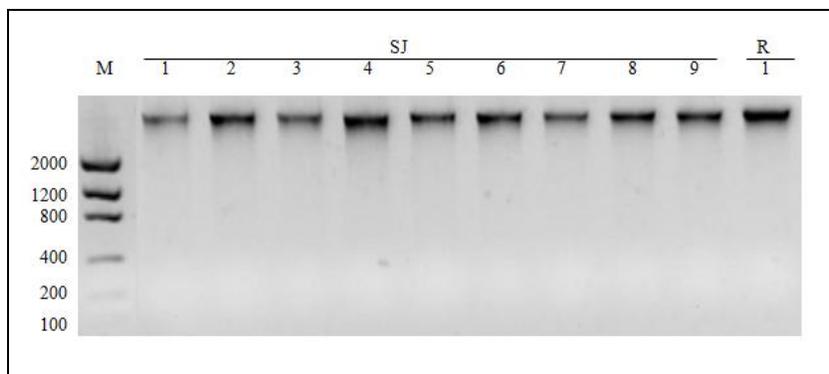
Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos	
1	Denaturación inicial	94	5:00	1
2	Denaturación	95	0:45	35
3	Annealing	Raíz 65 Suelo 59	1:00	
4	Extensión	72	1:00	
5	Extensión final	72	10:00	1
6	Estabilización	4	5:00	1

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de raíz y de suelo empleado para la extracción y cuantificación de ADN se obtuvo de cultivares de *Solanum lycopersicum* provenientes del cantón San Pedro de Pimampiro, provincia de Imbabura, de las cuales se utilizaron 100mg de raíz y 0,5g de suelo. Se cuantificó mediante espectrofotometría. Se obtuvieron concentraciones superiores a los 40g/uL en muestras de raíz y concentraciones superiores de 59ng/uL en muestras de suelo. En la Figura 1 y Figura 2, se observa la presencia de una única banda en cada muestra procesada tanto de raíz como de suelo.



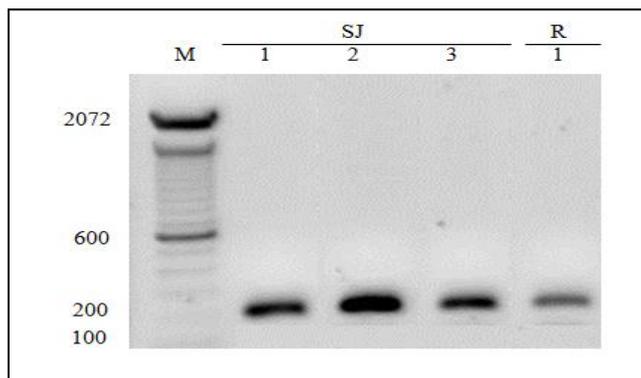
**Figura 1** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del ADN extraído con el protocolo del *DNeasy Plant MiniKit* de Qiagen® de las muestras de raíz recolectadas en los barrios San José y El Rosal. La corrida electroforética se realizó a 110 V, 1h. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de bajo peso molecular de ADN (*Low DNA mass ladder*, Invitrogen ®)



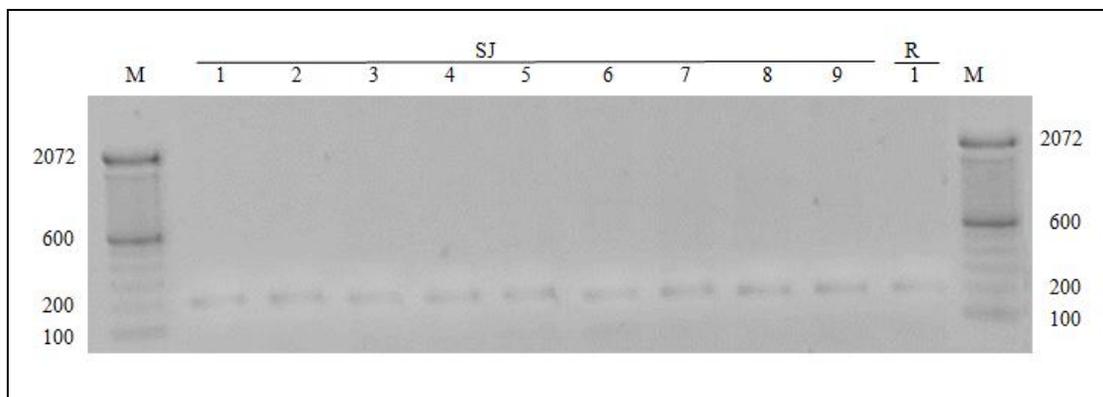
**Figura 2** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del ADN extraído con el protocolo del *Ultraclean™ Soil DNA Isolation kit* (MoBio Laboratories, Inc) de las muestras de suelo recolectadas en San Pedro de Pimampiro en invernaderos de tomate. La corrida electroforética se realizó a 110 V, 1h. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de bajo peso molecular de ADN (*Low DNA mass ladder*, Invitrogen ®)

La media de la concentración de ADN de raíz obtenida con el kit *DNeasy Plant MiniKit (Qiagen®)*, fue de 68,5ng/uL, la cual está ubicada dentro del promedio de rendimiento reportado para el mismo (40-50ng/uL). Mientras que la media para el ADN de suelo fue de 94,5ng/uL con el kit *Ultraclean™ Soil DNA Isolation kit* (MoBio Laboratories, Inc).

Las muestras analizadas de suelo y raíz amplificaron un fragmento de aproximadamente 200pb. Las raíces constituyen la parte más afectada de la planta, sin embargo, es la más crítica de obtener ya que los agricultores no pueden perder la planta para proporcionar este material. Por esta razón se tomaron muestras de suelo para ser analizadas. En la Figura 3 y Figura 4 se puede observar la presencia de un solo amplicon para el gen *16D10*. La amplificación de este fragmento se expresa en las glándulas esofageales de los nematodos del nudo principalmente en *M. incognita*. Sin embargo, Huang y sus colaboradores en el 2006 demostraron que este fragmento es conservado también en las otras tres especies principales de nematodo del nudo como los son *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* las cuales amplifican un fragmento único de 200 pb.



**Figura 3** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón del gel *16D10* de muestras de raíz recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (*Trach™ 100bp DNA Ladder*, Invitrogen ®)



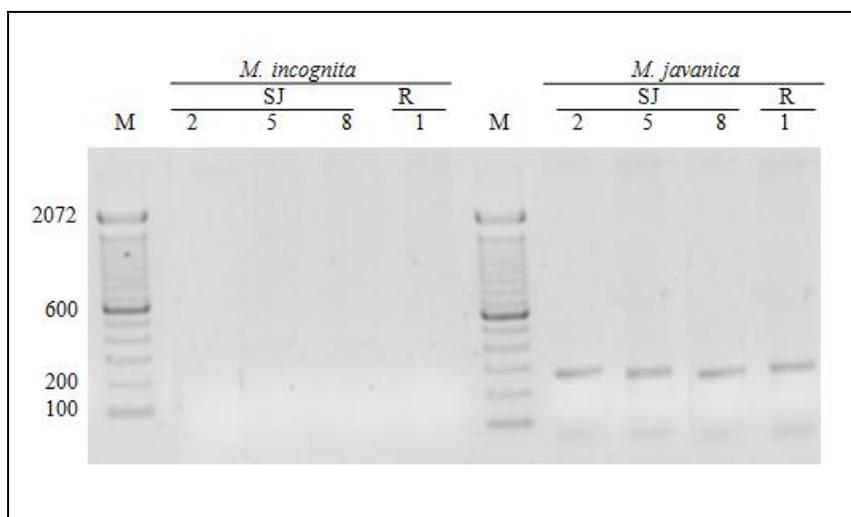
**Figura 4** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón del gen *16D10* de muestras de suelo recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (*TracI<sup>TM</sup> 100bp DNA Ladder*, Invitrogen ®)

La amplificación del fragmento del gen *16D10* en las muestras analizadas de Pimampiro indican un problema fitosanitario originado por el nematodo del nudo *Meloidogyne* spp. en los cultivares de tomate como demuestran estudios realizados por la Universidad Técnica del Norte en Imbabura. La detección de esta plaga en plantas de *Solanum lycopersicum* a diferentes etapas de crecimiento demuestra que no solamente pueden detectarse nematodos durante la etapa de producción del cultivo cuando el nematodo esta activo debido a que la humedad es la apropiada por la constante irrigación como lo indica Taylor y Sasser en 1983.

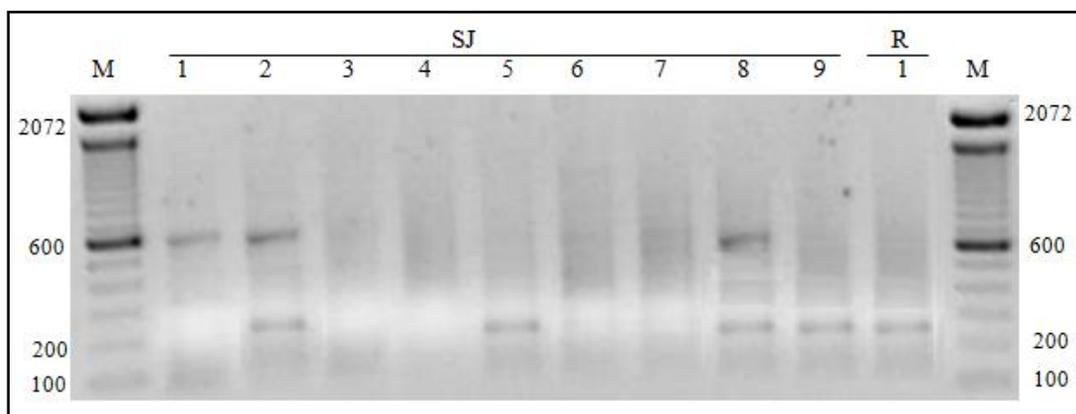
En el Ecuador se encuentran presentes las cuatro especies del género *Meloidogyne* spp. (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*). Siendo la especie más abundante con un 80% de incidencia *M. incognita* seguido de *M. javanica* (Triviño *et al.*, 2003). Trabajos de Revelo y sus colaboradores en el 2007 confirman la existencia de estas dos especies en el cultivo de tomate. Taylor y Sasser en 1983 y Arias y sus colaboradores en el 2008 mencionan a *M. javanica* y *M. incognita* como las principales plagas en zonas tropicales. En base a los análisis anteriores se procedió a identificar las especies de *M. incognita* y *M. javanica* en las muestras recolectadas.

La identificación de *M. incognita* se realizó mediante el gen de la proteína *8D05* secretada por el estilete de los nematodos cuya función modifica drásticamente las células de las plantas en células gigantes para la alimentación del patógeno. Este gen se expresa cuando los juveniles J2 se encuentran dentro de las raíces del hospedero (Xue *et al.*, 2013). Tanto en las muestras de raíz como de suelo no se evidenció la presencia del amplicon deseado posiblemente porque esta especie es la más variable de todo el género como lo confirman Taylor y Sasser en 1983.

La identificación de *M. javanica* se realizó mediante el gen del colágeno *Mjcol-3* de la superficie del nematodo, el cual se caracteriza por poseer un carboxi-terminal más corto que el de otros nematodos. Este gen se expresa principalmente en huevos y juveniles J2 (Koltai *et al.*, 1997). En las muestras de raíz se evidenció la presencia de un solo amplicón de 241pb como se observa en la Figura 6, mientras que en el suelo solamente cinco ejemplares evidenciaron la presencia del amplicon deseado. Tres muestras mostraron un amplicon de 600pb lo cual puede indicar una nueva raza dentro del grupo o un gen similar utilizado al utilizado para la identificación como se observa en la Figura 7.



**Figura 6** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón para el gen del colágeno *Mjcol-3* de *M. javanica* y el gen de la proteína 8D05 de la glándula esofageal para *M. incognita* de muestras de raíz recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (*TracI<sup>TM</sup> 100bp DNA Ladder*, Invitrogen ®)



**Figura 7** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón para el gen del colágeno *Mjcol-3* de *M. javanica* de muestras de suelo recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (*TracI<sup>TM</sup> 100bp DNA Ladder*, Invitrogen ®)

En el Ecuador esta especie se considera como la segunda a nivel poblacional como lo indica Triviño y sus colaboradores en el 2003. *M. javanica* se caracteriza por ser conservada en todas sus poblaciones a nivel mundial. Taylor y Sasser en 1983 y Arias y sus colaboradores en 1998 describen que la frecuencia de *M. javanica* es mayor en el Ecuador.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arias, Y., Gonzales, I., Rodríguez, M., Rosales, C., Suarez, Z y Peteira, B. (2009). Aspectos generales de la interacción de tomate (*Solanum lycopersicum*) – *M. incognita*. *Revista protección vegetal*, 24 (1), 1-13.
2. Arias, Y., Gonzáles, I., Rodríguez, M., Rosales, C., Suarez, Z y Peteira, B. (2009). Patógenos y plantas interacción. *Revista protección vegetal*, 24 (2), 1-13.

3. Eisenback J.D., Hirschmann, H., Sasser, J.N. y Triantaphyllou, A.C. (1981). A Guide to the four most common species of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key. The Departments of Plant Pathology and Genetics North Carolina State University. Estados Unidos, pp. 1 – 31, 45 – 48
4. Escalona, V., Alvarado, P., Monardes, H., Urbina, C. y Martin, A. (2009). Manual del Cultivo de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Chile. pp10-19, 36-54
5. Huang, G., Dong, R., Allen, R., Davis, E., Baum, T. y Hussey, R. (2006). A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor. *The American Phytopathological Society*, 19, 5, 463-470
6. Instituto nacional de estadísticas y censos (INEC). (2010). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC. Extraído el 15 de diciembre de 2012 en <http://www.ecuadorencifras.com/cifras-inec/main.html>.
7. Jones, J. J., Jones, R., Stall J. y Zitter, T. (2001). Plagas y enfermedades del tomate. *The American Phytopathological Society*. Traducido por M. Jiménez y Revisado por R. Jiménez, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp: 25-30.
8. Koltai, H. Chejanovsky, N., Raccach, B. y Spiegel, Y. (1997). The first isolated collagen gene of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* is developmentally regulated. *Gene*, 196 (1-2), 191-199.
9. McCuiston, J. L., Hudson, L. C., Subbotin, S. A., Davis, E. L. y Warfield, Y. C. (2007). Conventional and PCR detection of *Aphelenchoides fragariae* in diverse ornamental host plant species. *Journal of Nematology*, 39, 343 - 355.
10. Ñuño, R. (2007). Manual de Producción de Tomate rojo bajo condiciones de invernadero para el Valle de Mexicali, Baja California. Fundación Produce.
11. Perry, R., Moens, M. y Starr, J. L. (2009). Root-knot nematodes. Reino Unido, 1 - 13, 18 – 23, 55 – 88, 98 – 112
12. Powers, T. O., Mullin, P. G., Harris, T. S., Sutton, L. A. y Higgins, R. S. (2005). Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. *Journal of Nematology*, 37, 226–235.
13. Rodríguez, M., Sánchez, L., Gómez, L., Hidalgo, L., González, E., Gómez, M., Díaz-Viruliche, L., Casanova, A., Cuadra, R., Fernández E. y Hernández, R. (2005). *Meloidogyne* spp. plagas de las hortalizas: Alternativas para su manejo en sistemas de cultivo protegidos. *Revista Protección Vegetal*, 20 (1)
14. Sánchez, G. (2007). Comportamiento de las principales variedades comerciales de tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill) al parasitismo de los nematodos “Nudo de la raíz” (*Meloidogyne incognita*) y “rosario de la raíz” (*Nacobbus aberrans*) en Ibarra – Imbabura. *Proyecto de grado previa a la obtención del Título de tercer nivel. Universidad Técnica del Norte*.
15. Sanguineti, M. (2003). Nueva variante de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* afectando plantas de tomate en invernadero en la V Región. Universidad de Valparaíso. Chile. Recuperado el 10 de enero de 2013 en [http://ucv.altavoz.net/prontus\\_unidacad/site/artic/20061205/pags/20061205174914.html](http://ucv.altavoz.net/prontus_unidacad/site/artic/20061205/pags/20061205174914.html)
16. Sardanelli, S. (2010). Root-knot Nematode. Plant Nematology Resources. College of Agriculture & Natural Resource. University of Maryland.
17. Sasser, J. (1982). Proceedings of the third research & planning conference on root-knot nematodes , *Meloidogyne* spp.
18. Sasser, J. N. & D. W. Freckman, (1987). A world prospective on nematology: the role of the society. *Vistas on Nematology*, editada por J. A. Veech and D. W. Dickson. Society of Nematologists, Hyattsville, MD. pp: 7–14.
19. Starr, J. (2011). Root-knot Nematodes. Texas Plant Disease Handbook. Recuperado el 15 de febrero de 2013 en <http://plantdiseasehandbook.tamu.edu/problems-treatments/problems-affecting-multiple-crops/root-knot-nematodes/>
20. SICA. (2001). El tomate “*Lycopersicon esculentum*”. Ecuador. Recuperado el 3 de enero de 2013, en [http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/perfiles\\_productos/tomate.pdf](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/perfiles_productos/tomate.pdf)

21. Taylor A.L. y Sasser, J.N. (1983). Biología, Identificación y Control de los nematodos de Nódulo de la Raíz (Especies de *Meloidogyne*). Proyecto internacional de *Meloidogyne*. Universidad de Carolina del Norte. Estados Unidos.
22. Triviño, C., León, J., Casco, C., Solano, T., Navia, S., Velasco, L., Guijarro, G., Castro, E., Bustamante, J., Romero, M. y Songor Y. (2003). Control biológico del nematodo agallador *Meloidogyne* spp. con la bacteria *Pasteuria penetrans* en campos de producción. Instituto Nacional Autonomo de Investigaciones agropecuarias, Universidad Técnica de Babahoyo, Universidad Técnica del Norte y Universidad Nacional de Loja.
23. Qiu, J. J., Westerdahl, B. B., Anderson, C. y Williamson, V. M. (2006). Sensitive PCR detection of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica* extracted from soil. *Journal of Nematology*, 38, 434–441.
24. Rahman, L. (2003). Root knot disease and its control. National Wine and Grape Industry Centre. Tercera edición. Wagga Wagga.
25. Revelo, J. (2003). Manejo integrado de plagas para el mejoramiento de la producción sostenible de frutas en la zona andina. Proyecto FONTAGRO 5
26. Revelo, J., Piedadmag, J y Hernandez, M. (2007). Eficiencia de nematicidas biológicos en el control de *Meloidogyne incognita* en tomate de mesa *Lycopersicon esculentum* Mill) bajo invernadero en Socapamba Imbabura. Proyecto de grado previa a la obtención del Título de tercer nivel. Universidad Técnica del Norte.
27. Velasco, R. (2005). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 3, 1.
28. Xue, B., Hamamouch, N., Li, C., Huang, G., Hussey, R., Baum, T. y Davis, E. (2013). The 8D05 Parasitism Gene of *Meloidogyne incognita* is required for successful infection of host roots. *Phytopathology*, 103, 2, 175 (2013)
29. Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazáková, J. y Ryšánek, P. (2007). Conversion of sequence-characterized amplified region (SCAR) bands into high throughput DNA markers based on RAPD technique for detection of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* in crucial plant hosts. *Plant Soil and Environment*, 53, 97–104.