

PRESENCIA DEL MARCADOR Mi-23 DE RESISTENCIA A *Meloidogyne incognita* COMO APOYO A LA CARACTERIZACIÓN DEL GERMOPLASMA DE TOMATE EN VENEZUELA

Iris Pérez-Almeida¹, Ariadne Vegas García¹, Delis Pérez¹, Julio Muñoz² y Sergei Malyshev³

RESUMEN

Especies del género *Meloidogyne* causan daños económicamente significativos en cultivos como el tomate, induciendo agallas en las raíces y causando amarillamiento en las plantas infestadas. El empleo de cultivares resistentes garantiza una agricultura sostenible y productos de alta calidad. Se planteó el uso del marcador co-dominante Mi-23 ligado al gen de resistencia *Mi-1.2*, el cual confiere resistencia a *Meloidogyne* spp. como apoyo a la caracterización de 39 accesiones de germoplasma de tomate del INIA-CENIAP y Lara, incluyendo tomates silvestres *Solanum pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* locales (tipo Cherry, Perita y Margariteño), poblaciones avanzadas y variedades e híbridos comerciales. El ADN se extrajo siguiendo la metodología del CTAB y las amplificaciones de PCR se realizaron con los cebadores Mi23F/R. Los materiales genéticos formaron tres grupos de acuerdo al patrón de amplificación: 1) la población 9, del INIA-Lara, con un fragmento de 400 pb, como el ADN testigo (proveniente de Belarús); 2) Cherry-Lobatera, Perita Agrovitas, poblaciones 5 y 10, Cherry-189, híbridos Mariana y Salad-F1, con dos fragmentos de 450 y 400 pb; y 3) los restantes 31 materiales, entre ellos, tomates silvestres, cultivares locales, poblaciones avanzadas o promisorias, y variedades e híbridos comerciales, con un fragmento de 450 pb. Los dos primeros grupos se pueden correlacionar con genotipos resistentes homocigotos y heterocigotos, respectivamente, y el último con genotipos susceptibles. La utilización del marcador SCAR Mi-23, ligado al gen *Mi-1.2* permitió discriminar las accesiones de tomate del INIA, e identificar ocho de ellas con patrones asociados a genotipos resistentes al nematodo *M. incognita*, incluyendo tres poblaciones avanzadas del INIA-Lara y una local del INIA-CENIAP.

Palabras clave adicionales: Marcadores moleculares, nematodos agalladores, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium*

ABSTRACT

Presence of marker Mi-23 for resistance to *Meloidogyne incognita* as support to tomato germplasm characterization in Venezuela

Meloidogyne species cause economically significant damage to crops such as tomatoes, inducing galls on roots and causing yellowing of infested plants. The use of resistant cultivars ensures sustainable agriculture and high quality products. We proposed the use of co-dominant marker Mi-23, linked to the resistance gene *Mi-1.2*, which confers resistance to *Meloidogyne* spp. to support the characterization of 39 accessions of tomato germplasm from INIA-CENIAP and Lara, including wild tomatoes *Solanum pimpinellifolium*, and *S. lycopersicum* local types (Cherry, Pera and Margariteño), advanced populations, and commercial hybrids and varieties. DNA was extracted following CTAB methodology, and PCR amplifications using Mi23F/R primers. Genetic materials formed three groups according to the amplification patterns: 1) population 9, from INIA-Lara, with a fragment of 400 bp, as the DNA control from Belarus; 2) Cherry-Lobatera, Perita Agrovitas, populations 5 and 10, Cherry-189, Mariana and Salad-F1 hybrids, with two fragments of 450 and 400 bp; and 3) the remaining 31 materials, among them, wild tomatoes, locals, advanced populations, and commercial varieties and hybrids, with amplification of a single 450 bp fragment. The first two groups can be correlated to homozygous and heterozygous resistance genotypes, respectively, and the last group to susceptible ones. By using the SCAR marker Mi-23, linked to gen *Mi-1.2*, we were able to discriminate the INIA tomatoes accessions, and identify eight of them associated with the resistance genotypes to nematode *M. incognita*, including three advanced populations from INIA-Lara and one local from INIA-CENIAP.

Additional key words: Molecular markers, root-knot nematodes, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium*

Recibido: Agosto 27, 2014

Aceptado: Febrero 18, 2015

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas INIA-CENIAP. Apdo. 4653. Maracay 2101. Venezuela. e-mail: iperez@inia.gob.ve ; ibperez1@gmail.com

² Posgrado de Agronomía, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: julio.munoz@ucla.edu.ve

³ Instituto de Genética y Citología, Minsk, Belarús

INTRODUCCIÓN

Los nematodos del género *Meloidogyne* son responsables de grandes pérdidas en cultivos de importancia económica (Sasser et al., 1987; Bleve et al., 2007). Entre las especies más importantes económicamente se encuentran *Meloidogyne incognita* (Kofoed y White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood y *M. arenaria* (Neal) Chitwood (Castagnone, 1999). *M. incognita* habita en climas tropicales y es posiblemente el parásito más dañino de los cultivos en el mundo (Trudgill y Blok, 2001). Se presenta en la actualidad como plaga del tomate (*Solanum lycopersicum*), tanto en plantaciones cultivadas por los métodos tradicionales, como en las cultivadas con tecnologías más modernas: sistemas de cultivos protegidos, hidropónicos, huertos intensivos, invernaderos y organopónicos (Cuadra et al., 2005). Se considera el nematodo de mayor distribución en Venezuela y el que mayores daños causa en muchos cultivos (Crozzoli, 2002).

El control de nematodos se realiza usualmente por la combinación de varias estrategias de manejo. El control cultural es una práctica extendida, pero la rotación de cultivos tiene valor limitado para nematodos del género *Meloidogyne*, por su amplia gama de hospedantes (Trudgill, 1997; Arias et al., 2009) y no es práctico para los productores (Bleve et al., 2007). El control químico se ha vuelto difícil debido a que los nematicidas efectivos han sido prohibidos por ser peligrosos para el ambiente y la salud humana. Es por esto que el empleo de variedades resistentes y otras medidas amigables al ambiente deben ser implementadas para el control de estos parásitos (Yuji y Cohen, 2001; Arias et al., 2009).

Muchos de los genes de resistencia (genes R) codifican proteínas caracterizadas por la presencia de un sitio de unión nucleotídica y una región rica en leucina y ocurren en grupos de genes relacionados, en los genomas de plantas. Estas proteínas median el reconocimiento de la infección del patógeno e inician señales de defensa que llevan a su resistencia. La región *Mi* (1 Mb) localizada en el brazo corto del cromosoma 6, contiene dos genes de resistencia llamados *Mi1-1* y *Mi1-2*, y un pseudogen (Milligan et al., 1998). *Mi1-2*, es suficiente para conferir resistencia específica a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*, áfidos y

mosca blanca en *Solanum* y codifica una proteína de 1.257 aminoácidos (Rossi et al., 1998; Nombela et al., 2003; Seah et al., 2007a). La región de ADN con este gen y otras seis secuencias relacionadas fueron introgresadas al tomate a partir de *Solanum peruvianum* en los años 40's usando rescate de embriones, para obtener un híbrido de estas dos especies incompatibles (Smith, 1944). No se han identificado genes de avirulencia en nematodos de forma concluyente, aunque se han alcanzado progresos en el área (Williamson y Gleason, 2003). Adicionalmente, los análisis mendelianos de avirulencia y patogenicidad en especies de nematodos para los cuales es efectivo *Mi* han sido imposibles de lograr pues estos parásitos no presentan reproducción sexual. Se plantea que el gen *Mi1-2* en tomate suprime el desarrollo y reproducción de los nematodos formadores de agallas *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica* (Bleve et al., 2007; Verdejo y Sorribas, 2007), y que en la actualidad, se encuentra presente en las variedades comerciales de tomate.

Una de las desventajas de la resistencia basada en este gen es la inactivación del mismo a temperaturas por encima de los 28 °C (Jablonska et al., 2007) y la preocupación acerca de la durabilidad de la resistencia por el uso intensivo del mismo, junto con la variabilidad patogénica de los nematodos formadores de agallas (Castagnone, 1999). Se han encontrado biotipos virulentos del nematodo que sobrepasan la resistencia proporcionada por el gen *Mi1-2* en zonas productoras de tomate en el mundo (Ornat et al., 2001). En Cuba existen evidencias de que la especie *M. enterolobii* Yang & Eisenback (Sin. *M. mayaguensis* Rammah y Hirschmann) fue capaz de vencer la resistencia conferida por dicho gen en diferentes variedades de tomate que eran portadoras del mismo (Rodríguez et al., 2007; Arias et al., 2009). Recientemente se señaló que la región *Mi* también confiere resistencia al mildiú polvoriento del tomate (Seifi et al., 2011), lo que ha vuelto aún más interesante el estudio de los procesos de reconocimiento de los diferentes patógenos por *Solanum* spp., y cómo utiliza estos homólogos en las reacciones de defensa o resistencia.

Se han descrito marcadores basados en PCR ó moleculares para la detección específica de gen *Mi-1*, entre ellos, marcadores co-dominantes

CAPS (secuencias polimórficas amplificadas digeridas) tales como REX-1 (Williamson et al., 1994) y Cor-Mi (Fundación Universidad de Cornell, Ithaca, NY), pero ambos dieron falsos positivos en germoplasma resistente a begomovirus (Seah et al., 2007a). Por lo anterior, otros marcadores han sido desarrollados pero que sólo amplifican un fragmento PCR cuando el gen *Mi-1.2* está presente, tales como un marcador dominante que no distingue entre plantas homocigotas y heterocigotas (Milligan et al., 1998) y más recientemente uno co-dominante *Mi-23* tipo SCAR (secuencia amplificada de una región conocida) ligado a este gen (Seah et al., 2007b). Al utilizar este marcador *Mi-23*, un fragmento de 430 pb se correlaciona con los fenotipos susceptibles de líneas de *S. lycopersicum* (mi/mi), otro de 380 pb con los resistentes (Mi/Mi) y ambos fragmentos (Mi/mi) con los heterocigotos. Este marcador tiene la ventaja de que no se necesita emplear enzimas de restricción, no se amplifican falsos positivos en líneas resistentes a begomovirus, introgresadas de *S. habrochaites* y *S. chilense*, y pueden utilizarlo mejoradores que hayan introgresado otras características de resistencia ubicadas en la región *Mi* (Seah et al., 2007a; Foolad y Panthee, 2012).

Arens et al. (2010) señalan que los marcadores moleculares tienen como ventaja sobre las pruebas biológicas que se pueden identificar individuos

homocigotos y heterocigotos resistentes, y determinar la heterogeneidad de los lotes de semillas o de plántulas en primeros estados de desarrollo.

Debido al desarrollo alcanzado con los marcadores específicos en la interacción *Meloidogyne incognita*-tomate es posible producir cultivares resistentes por mejoramiento genético tradicional en conjunto con la selección asistida por marcadores moleculares para detectar el gen *Mi-1*, el cual hasta el presente, es la única fuente de resistencia conocida a este parásito (Seah et al., 2007 a,b).

En la presente investigación se planteó el uso del marcador co-dominante SCAR *Mi-23* como base para la caracterización de 39 materiales pertenecientes al germoplasma de tomate de INIA-CENIAP y Lara, en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 39 cultivares de tomate representantes del germoplasma silvestre (*S. pimpinellifolium* o tomate 'Cagón'), locales (*S. lycopersicum*, tipos Cherry, Pera y Margariteño), poblaciones avanzadas, y variedades e híbridos comerciales (*S. lycopersicum*), procedentes de los estados Aragua, Carabobo, Lara, Miranda, Nueva Esparta, Portuguesa, Táchira, Trujillo y Vargas, e importados de otros países (Cuadro 1).

Cuadro 1. Acciones de tomate del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) utilizadas en la validación del gen *Mi 1-2*, asociado a la resistencia a *Meloidogyne* spp.

Acciones de tomate (<i>Solanum</i> spp.)		Procedencia (estado: localidad)
<i>S. pimpinellifolium</i> tipo Cagon	Silvestres	Aragua: Turmero, Maracay, Castaño, La Morita, La Gruta, Montaña Lisa. Carabobo: Guigue. Miranda: San Antonio de los Altos. Portuguesa: Biscucuy, Selección Rosado Biscucuy. Táchira: Las Aguadas. Trujillo: Tirandá, Grande Tirandá. Vargas: Galipán; Desconocido: Muestra N°6 (OSP-339)
<i>S. lycopersicum</i> , tipo Cherry	Cultivares locales	Aragua: INIA-CENIAP. Lara: Cherry. Táchira: Lobatera.
<i>S. lycopersicum</i> , tipo Pera		Lara: Pueblo Nuevo, Cusa II, Surrero, Simón Planas, Pera gigante de Quíbor
<i>S. lycopersicum</i> , tipo Margariteño		Nueva Esparta: Margariteño 1, Margariteño 2
<i>S. lycopersicum</i>	Poblaciones avanzadas INIA	Lara: P5, P7, P8, P9, P10
<i>S. lycopersicum</i>	Variedades e híbridos comerciales	Aragua: Alba. Carabobo: Rio Grande, Agrovitas; Internacionales: Halyana (Hazera Genetics), Mariana (Sakata Seeds), Ramo, Salad F1, Royalty F1 (Zeta Seeds), Cherry-189 (UPV)

El ADN se extrajo a partir de hojas jóvenes colectadas en casas de cultivo y de plántulas de 10 días crecidas en cápsulas Petri a partir de semillas, utilizando la metodología CTAB 2X (CIAT, 1999). Para cuantificar el ADN se utilizó un Nanodrop ND 1000. Las amplificaciones se realizaron en termocicladores PTC-100, de uno o dos bloques, y Eppendorf, en un volumen total de 12,5 µL que contenía 1,5mM MgCl₂, 10X Buffer GoTaq Promega, 200 µM dNTPs, 1 µM de cada iniciador, 1U GoTaq polimerasa Promega y 25 ng de ADN genómico, con el marcador SCAR Mi-23, Mi23F (5'- TGGAAAAATGTTGAATTTC TTTTG-3') y Mi23R (5'-GCATACTATATGGC TTGTTTACCC-3') (Seah et al., 2007a).

El programa de PCR utilizado fue el siguiente: desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C por 30s, alineación de los iniciadores a 45 °C por 30s, extensión a 72 °C por 1 min), extensión final a 72 °C por 7 min, según Seah et al. (2007b). Se incluyó el ADN del testigo Mi-1 homocigoto resistente aportado por el Instituto de Genética y Citología de la República de Belarús. Las amplificaciones se replicaron tres veces para garantizar la repetitividad de los resultados.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1,5 %, con bromuro de etidio (0,5µg·mL⁻¹), a 45 mA y 100 V, durante 2,5 h en buffer TBE 0,5X, pH 8,3; las imágenes se digitalizaron en un Chemidoc BIORAD. Para la determinación del tamaño de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de ADN de 50 pb de Promega.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la utilización del marcador co-dominante Mi-23, ligado al gen de resistencia *Mi-1.2*, fue posible discriminar las 39 accesiones de tomate del INIA, en tres grupos, de acuerdo al patrón de amplificación: la población 9, con un fragmento de 400 pb, como el ADN testigo proveniente de Belarús; Cherry-Lobatera, Perita Agrovitas, poblaciones 5 y 10, Cherry-189, híbridos Mariana y Salad-F1, con dos fragmentos de 450 y 400 pb (Figura 1); y los restantes 31 materiales, entre ellos, tomates silvestres, locales (Cherry, Pera y Margariteño), poblaciones avanzadas, y variedades e híbridos comerciales, con un fragmento de 450 pb. Los dos primeros grupos se

correlacionan con genotipos resistentes homocigotos (Mi/Mi) y heterocigotos (Mi/mi), respectivamente, y el último con genotipos susceptibles (mi/mi) (Cuadro 2), según Seah et al. (2007b).

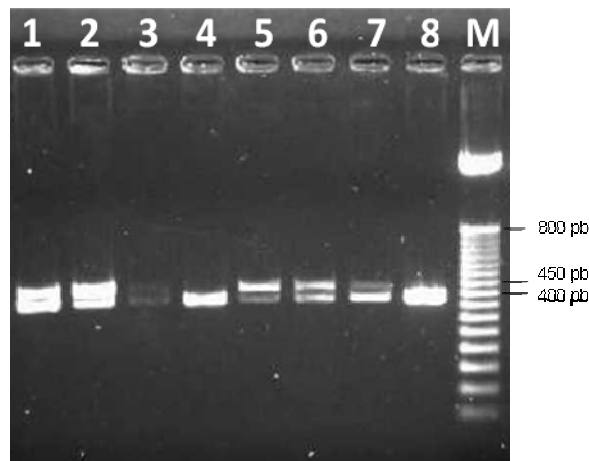


Figura 1. Productos de amplificación PCR con el marcador Mi-23 mostrando patrones asociados a genotipos resistentes: homocigotos (carriles 4 y 8: Población 9 y testigo Mi-1), con un fragmento de 400 pb; heterocigotos. (carriles 1 = Cherry-Lobatera, 2 = Perita Agrovitas, 3 = Población 5, 5 = Población 10, 6 = Híbrido Mariana, 7 = Cherry-189, con dos fragmentos de 400 y 450 pb; M= Marcador de peso molecular de 50 pb

Para el gen de resistencia al nematodo *Mi-1.2*, el fenotipo observado en los ensayos biológicos se corresponde en un 100 % con el genotipo indicado en las pruebas moleculares con el marcador asociado a dicho gen de resistencia *Mi-1.2*, aun cuando se conoce que los síntomas causados por enfermedades están, en la mayoría de los casos, influenciados por el ambiente (Arens et al., 2010). Aunque los fragmentos amplificados bajo nuestras condiciones se visualizaron en tamaños ligeramente diferentes al reporte original de Seah et al. (2007b), se mantuvo una diferencia de aproximadamente 50 pb entre las bandas, tal como fue descrito por Foolad y Panthee (2012). Es importante destacar que fue posible identificar ocho accesiones asociadas a genotipos resistentes, de las cuales, cuatro fueron desarrolladas o colectadas en INIA (poblaciones avanzadas y Cherry-Lobatera), y las demás fueron híbridos introducidos comercialmente.

Cuadro 2. Genotipos identificados en las 39 accesiones de tomate del INIA, de acuerdo al patrón de amplificación obtenido con el marcador Mi-23, asociado a la resistencia a especies de *Meloidogyne*, según Seah et al. (2007b)

Genotipos	Fragmentos amplificados (pb)	Tipos de tomate
Homocigotos resistentes (Mi/Mi)	400	P9
Heterocigotos resistentes (Mi/mi)	450 y 400	Cherry-Lobatera, Perita Agrovitas, P5, P10, Cherry-189, Híbridos Mariana y Salad F1
Homocigotos susceptibles (mi/mi)	450	Los 31 tipos de tomate restantes

CONCLUSIONES

Se logró discriminar las 39 accesiones de tomate en tres grupos. Dos de ellos correlacionados con ocho genotipos resistentes, homocigotos y heterocigotos, respectivamente, y el otro grupo con genotipos susceptibles.

Este trabajo brinda una herramienta de análisis molecular eficaz que permite identificar de forma rápida y confiable, accesiones de tomate, de acuerdo al patrón de amplificación con el marcador co-dominante SCAR Mi-23, y su asociación con genotipos resistentes y susceptibles a la acción del nematodo *M. incognita*, lo cual implica un considerable ahorro de tiempo y dinero en los programas de mejoramiento genético.

AGRADECIMIENTO

Proyecto Convenio de Cooperación Técnica y Científica entre los Gobiernos de Venezuela y Belarús: "Desarrollo de marcadores moleculares en la identificación de secuencias de ADN de genes de importancia agronómica para utilizar en la selección de plantas y animales".

Proyecto INIA-FONACIT PEII N° 2012001528 "Desarrollo de germoplasma de tomate para la generación de cultivares resistentes a estreses bióticos en el logro de la sustentabilidad y soberanía agroalimentaria del rubro".

Agradecimiento al Profesor Mauro Albarracín, de la Facultad de Agronomía, de la Universidad Central de Venezuela, por la donación de los materiales de *Solanum pimpinellifolium*.

LITERATURA CITADA

1. Arens, P., C. Mansilla, D. Deinum, L. Cavellini, A. Moretti, S. Rolland, H. van der Schoot, D. Calvache, F. Ponz, C. Collonnier, R. Mathis, D.

Smilde, Caranta C. y B Vosman. 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. Theor. Appl. Genet. 120: 655-664.

2. Arias, Y., I. González, M. Rodríguez, C. Rosales, Z. Suárez y B. Peteira. 2009. Aspectos generales de la interacción tomate (*Solanum lycopersicum* L.) *Meloidogyne incognita*. Rev. Protección Veg. 24(1): 1-13.
3. Bleve-Zacheo, T., M.T. Melillo y P. Castagnone-Sereno, P. 2007. Biotechnology and root-knot nematode control in tomato. Pest Technology 1: 1-16.
4. Castagnone-Sereno, P. 1999. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes. Euphytica. 124:193-199.
5. CIAT. 1999. Protocolo para marcadores moleculares. González D.O., N. Palacios, G. Gallegos y J. Tohme (comps. y eds.). Publicaciones CIAT, Cali. 82 p.
6. Crozzoli, R. 2002. Especies de nematodos fitoparásitos en Venezuela. Interciencia 27: 354-364.
7. Cuadra, R., X. Cruz, J. Ortega T. Shagardsky y M. González. 2005. Respuesta de *Lycopersicon* spp. frente al ataque del nematodo de las agallas (*Meloidogyne incognita*). Rev. Protección Veg. 20(2):114-121.
8. Foolad, M.R. y D.R. Panthee. 2012. Marker-assisted selection in tomato breeding. Crit. Rev. Plant Sci. 31:93-123.
9. Jablonska, B., S. Jetty, K. Kishor, O. Martinez de Ilarduya, P.A. Roberts y I. Kaloshian. 2007. The *Mi-9* gene from *Solanum arcanum* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes is a homolog of *Mi-1*. Plant Physiol. 143: 1044-1054.

10. Milligan, S., J. Bodeau, J. Yaghoobi, I. Kaloshian, P. Zabel y V. Williamson. 1998. The root-knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10: 1307-1320.
11. Nombela, G., V.M. Williamson y M. Muñoz. 2003. The root-knot nematode resistance gene *Mi1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 645-649.
12. Ornat, C., S. Verdejo-Lucas y F. Sorribas. 2001. A population of *Meloidogyne javanica* from Spain virulent to the *Mi* resistance gene in tomato. *Plant Dis.* 85: 271-276.
13. Rodríguez, M., L. Gómez y B. Peteira. 2007. *Meloidogyne mayaguensis* Rammah y Hirschmann, plaga emergente para la agricultura tropical y subtropical. *Rev. Protección Veg.* 22: 183-198.
14. Rossi, M., F.L. Goggin, S.B. Milligan, I. Kaloshian, D.E. Ullman y V.M. Williamson. 1998. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 9750-9754.
15. Sasser, J., K. Hartmen y D. Freckman. 1987. Summary of Preliminary Crop Germplasm Evaluation for Resistance to Root-Knot Nematodes. Raleigh NC, Editor. North Carolina State University and US Agency for International Development. pp. 1-88.
16. Seah, S., A. Telleen y V. Williamson. 2007a. Introgressed and endogenous *Mi-1* gene clusters in tomato differ by complex rearrangements in flanking sequences and show sequence exchange and diversifying selection among homologues. *Theor. Appl. Genet.* 114: 1289-1302.
17. Seah, S., V. Williamson, B. Garcia, L. Mejia, M. Salus, C. Martin, D. Maxwell. 2007b. Evaluation of a co-dominant SCAR marker for detection of the *Mi-1* locus for resistance to root-knot nematode in tomato germplasm. *TGC Report* 57: 37-40.
18. Seifi A., I. Kaloshian, J. Vossen, D. Che, K.K. Bhattarai, J. Fan, Z. Naher, A. Goverse, W.F. Tjallingii, P. Lindhout, R.G. Visser, y Y. Bai. 2011. Linked, if not the same, *Mi-1* homologues confer resistance to tomato powdery mildew and root-knot nematodes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 441-450.
19. Smith, P.G. 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 44: 413-416.
20. Trudgill, D. 1997. Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range? *Plant Pathol.* 46: 26-32.
21. Trudgill, D. y V. Blok. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Rev. Phytopathol.* 39: 53-77.
22. Williamson, V.M., J.Y. Ho, F.F. Wu, N. Miller y I. Kaloshian. 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene *Mi* in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 87: 757-763.
23. Williamson, V.M. y C.A. Gleason. 2003. Plant-nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 327-333.
24. Yuji, O. y Y. Cohen. 2001. Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL-amino-*n*-butyric acid. *Eur. J. Plant. Pathol.* 107: 219-227.