التحري عن جينات المقاومة Mi لنيماتودا تعقد الجذور في عدد من السلالات النقية للطماطة غير محدودة النمو

عناد ظاهر عبود هند شاكر ياسين
استاذ مساعد باحث
قسم وقاية النبات – كلية زراعه– جامعة بغداد
Shakirhind@gmail.com

المستخلص

تضمنت هذه الدراسة التحري عن الجينات المسؤولة عن ظهور صفة المقاومة في الطماطة ضد نيماتود تعقد الجذور *Meloidogyne spp* في *46* سلالة نقية من الطماطة غير محدودة النمو، إذ أظهرت 10سلالات مقاومتها للإصابة بديدان تعقد الجذور وذلك بعد مرور 60 يوماً على عملية التلقيح بـ 5000 بيضة/كغم تربة، بينما أظهرت 31 سلالة أخرى من الطماطة حساسية تجاه الإصابة بنيماتود تعقد الجذور إذ لوحظ إن عدد العقد على الجذور قد تجاوز الدرجة 5 من الدليل المرضي المستخدم في البحث أي أكثر من 100 عقدة على جذورها، تم تشخيص جينات المقاومة باستخدام تقانة التحليل الجزيئي حيث تم عزل الحامض النووي DNA لسلالات الطماطة الحساسة والمقاومة باستخدام طريقة CTAB ثم تطبيق مؤشرات الـ Simple Sequence Repeat DNA(SSR) على DNA الكلي المعزول من السلالات الحساسة والمقاومة، باستخدام خمسة بادئات ترتبط بمواقع مختلفة لجين المقاومة، اثنان منها صممها الباحث بوساطة برنامج Primer3 (HSM1 و HSM2) وقد أثبتت فعاليتها في الكشف عن جينات المقاومة Mi من خلال إنتاجها حزم DNA، و ثلاثة بادئات أخرى (REX و C2S4 وMi12) أثبتت فعاليتها عالميا في التحري عن جينات المقاومة من خلال إنتاج كل زوج منها حزم DNA.

الكلمات المفتاحية: مؤشرات التتابعات البسيطة المتكررة، تفاعل البلمرة التسلسلي، تعقد الجذور.

* البحث مستل من رسالة ماجستير الباحث الثاني.

DETECTION RESISTANCE GENES OF ROOT KNOT NEMATODE MI IN SOME OF PURE LINES OF TOMATO INDETERMINATE GROWTH

I. D. Abood H. SH. Yassien
Assistnt Prof. Researcher
Dept. of plant protection –coll. of Agric. Univ. of Baghdad
Shakirhind@gmail.com

ABSTRACT

This study was included investigation of the resistance genes Mi which is responsible for the appearance of resistance feature in tomato against root knots Nematode *Meloidogyne spp* in 46 pure lines of tomato indeterminate growth, ten of tomato pure lines showed resistance to root knots nematode infection after 60 days of the inoculation by 5000 egg/ kg of soil . While 31 pure lines of tomato showed sensitivity for these nematode infection, which root knot numbers had exceeded 100 knots. Then the genes has diagnosed by using the technology of molecular analysis the DNA of the purelines of sensitive and resistance tomato was isolated by the CTAB method then apply the indicators of Simple Sequence Repeat (SSR) DNA on the total DNA isolated from sensitive and resistant pure lines and using five primers connected with different locations of the resistance lines, two of them were designed by reasrcher and NCBI-Primer-Blast program (HSM1and HSM2) proved effective in the investigation of resistance genes Mi by production DNA bands, and three other primers (REX and C2S4 and Mi1-2) also proved their international effectiveness in the detection of resistance genes by production DNA bands for each pairs of them.

Key Words: Simple sequence repeated (SSR), Polymerase chain reaction (PCR),Root-knot.

المقدمة

يعد العراق بيئة مناسبة لانتشار نيماتود تعقد الجذور، وذلك لتوفر المناخ المعتدل والعائل المناسب خلال فصول السنة، وتزداد أعداد وأضرار النيماتود تحت ظروف الزراعة المحمية لما توفره هذهِ الطريقة الزراعية من ظروف مواتية لنشاط النيماتود(2)، ونتيجة لتزايد المخاوف البيئية والصحية من استخدام المبيدات المتخصصة على النيماتود، ولتقليل استخدام هذهِ المبيدات كان التوجه نحو استخدام المقاومة الوراثية genetic resistance، إذ تعد حلاً فعالاً لحماية النباتات من المسببات الممرضة والآفات الحشرية وأثبت المقاومة الوراثية فعاليتها كوسيلة للسيطرة على النيماتود من خلال تقليل كثافة النيماتود وإعدادها في التربة(13)، لذلك فإن استنباط أصناف طماطة مقاومة لنيماتود تعقد الجذور تعد طريقة آمنة وفعالة للسيطرة على هذه الافه و التي تسبب خسائر اقتصادية كبيرة في الطماطة في البيوت البلاستيكية (3 و 9). أن مجموعة جينات المقاومة Mi منشؤها الطماطة البرية الجنس *Solanum peruvianum* تمنح المقاومة للطماطة ضد نيماتود تعقد الجذور *M. incognita*، *M. arenaria* ، *M. Javanica* إذ توجد تسعة جينات Mi (Mi1–9) في الطماطة البرية(1)، ومن الجدير بالذكر وجود أكثر من 40 زوجا من الجينات المقاومه تم تحديدها على الخارطة الجينية في الأنواع البرية للطماطة (4 و 7)، ولوحظ ان نباتات الطماطة الحاملة لجينات المقاومة Mi مقاومة للذبابة البيضاء *Bemisia tabacis* (6 و 12) وأن هذهِ المقاومة تكون على درجة عالية من التخصص وفعالة تجاه بعض سلالات من البطاطا *Macrosiphum euphorblae* (5)، ولتطوير أصناف طماطة مقاومة للإصابة بنيماتود تعقد الجذور يجب التحري عن المصادر الوراثية الحامله للمقاومة شرط أساسي في برامج التربيه و التحسين ومن هنا جاء الهدف من هذهِ الدراسة و الذي هو التحري عن جينات المقاومة Mi لنيماتود تعقد الجذور *Meloidogyne spp* في بعض الخطوط النقية للطماطة غير محدودة النمو. تم التحري عن المصادر الوراثية للمقاومة في نباتات الطماطة من خلال اختبار الخطوط الوراثية و تحديد إصابتها بنيماتود تعقد الجذور من عدمه حقليا ثم استخدام تقانه PCR للتحري عن جينات المقاومه MI باستعمال بادئات مختلفه ومتخصصه ترتبط بالمواقع المختلفه لجينات Ml (17). يعد هذا البحث جزء من برنامج عمره أربعة وثلاثون سنة والهدف منه الوصول إلى سلالات طماطة مقاومة لنيماتود تعقد الجذور اضافة الى الخصائص النباتيه المرغوبه.

المواد وطرائق العمل:

إكثار اللقاح النيماتودي:

تم الحصول على نباتات طماطه مصابه من حقول زراعيه في محافظة بابل و التي تم استخلاص اللقاح منها في مختبرات كلية الزراعه /جامعة بغداد حيث استعملت بيوض ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp* لتلقيح نباتات طماطة صنف super marmande الحساس للإصابة بمرض تعقد الجذور لغرض تهيئة اللقاح وبكميات كبيرة على نباتات الطماطة الحساسة جرى تحضير لقاح النيماتود باستخلاص البيوض ويافعات الطور الثاني من نباتات الطماطة المصابه إذ تم غسل الجذور جيداً من التربة العالقة بها ومن ثم استخلصت منها النيماتود (البيوض ويافعات الطور الثاني) باستخدام المصافي والترويق وذلك حسب طريقة Hussey و Barker (8) تمت إضافة اللقاح إلى تربة نباتات الطماطة المزروعة في الأصص بواقع 5000 بيضة لكل كغم تربة.

سلالات الطماطة غير محدودة النمو:

استعملت في هذهِ الدراسة 46 سلاله نقية من الطماطة غير محدودة النمو، إذ تمت زراعة هذه السلالات وبعد 4 أسابيع من الزراعة وبتاريخ 2015/10/10 تم نقلها إلى أصص بلاستيكية حاويه على تربه معقمه وزن 200 غم بطريقة التعقيم الفيزيائي باستخدام جهاز الموصدة تحت ضغط 1بار ودرجة حراره 121 درجه مئويه وسمح للنباتات بالنمو في الأصص لمدة أسبوع قبل إجراء العدوى. تم إجراء التجربة في البيت البلاستيكي ضمن ظروف بيئية مسيطر عليها حيث كانت درجة الحرارة تتراوح بين 20–27 درجة مئوية، تمت الزراعة في ثلاث مكررات وكان عدد الاصص في كل مكرر 3 حاويه على نبات\اصيص لكل معامله تم توزيعها عشوائياً بطريقة التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD)، وتم معاملة تربة جميع الطماطة بلقاح النيماتود بتركيز 1000 بيضة/ 200غم رمل

حيث تستخدم أنبوبه ماصة معقمة و مدرجة لسحب اللقاح ثم إضافته إلى التربة بعد عمل حفرتين متقابلتين حول النبات بعمق 5-3 سم وتبعد 2-1 سم من النبات بتاريخ 2015/10/18 وبعد إجراء العدوى سقيت النباتات بانتظام وتم تسميدها بأستخدام سماد سائل عباره عن مزيج من (Triselement + Microelement + 6MG + NPK 20:20:20) وبعد مرور 45- 60 يوماً على العدوى تم أخذ القراءات وذلك من خلال حساب عدد العقد المتكونه على الجذور حسب مقياس Taylor و Sasser (14) مع مراعاة غسل الجذور بماء هادىء الجريان للتخلص من التربة العالقة بها قبل إجراء عملية عدّ العقد الجذرية. عدت السلالات النباتية التي كان عدد العقد عليها ضمن التدرج من 0-2 كسلالات مقاومة ومن 3-5 عدت سلالات حساسة ثم جرى الكشف الجزيئي اللاحق الدقيق للتميز بين السلالات المقاومة والحساسة.

التحري عن جينات المقاومة Mi بتقنية PCR باستخدام بادئات (Primers) متخصصة لهذا الجين:

1- تصميم بادئات (Primers) متخصصة لجينات Mi:

صممت بادئات اعتماداً على تسلسل القواعد النتروجينية لـ جين المقاومة Mi الموجود في موقع الـ NCBI وباستخدام برنامج Primer 3 وبمساعدة أحد المختصين في علم الحياة الجزيئي ألدكتور أحمد عبد ألجبار سليمان كلية ألعلوم/جامعة ألأنبار. فضلاً عن ذلك تم التوصل إلى وجود ثلاثة مؤشرات مرتبطة بجين المقاومة في الطماطة اثبتت فعالتيها في التحري عن جينات Mi وكما موضح في الجدول1.

جدول 1: المؤشرات وتسلسلها وأوزانها الجزيئية ومصادرها العلمية

اسم المؤشر	التسلسل 5 to 3 تسلسل القواعد النتروجينية 5-3	درجة حرارة التلدين (م°)	الوزن الجزيئي لـ Product (bp) Length	المصدر
REX-F	5 TCGGAGCCTTGGTCTGAATT 3	50	720	17
REX-R	5 GCCAGAGATGATTCGTGAGA 3			
Mi 12F	5 ATCATTCTTTGGGGATGCTG 3	50	1450	15
Mi 12R	5 AGCAATCGAAGGTCAAGAGG 3			
C1/2F	5 CAGTGAAGTGGAAGTGATGA 3	50	1600	11
C2S4R	5 CTAAGAGGAATCTCATCACAGG 3			
HSM1F	5CGAGCTAGATGAGGATGAACACAAT3	50	695	موقع NCBI
HSM1R	5GCTCAGCAGCATCCCCAAAG 3			
HSM2F	5CAAGCCATGCTTGCTTCACT 3	50	656	
HSM2R	5TTGATCCTTTGTTAGACACAAACAG 3			

استخدمت مؤشرات الـ (Simple Sequence Repeat) SSR لغرض التحري عن جينات المقاومة Mi لما تتميز به هذهِ المؤشرات من خصوصية في طبيعة مناطق DNA والتي تتوافق مع تتابعات البادئات الخاصة بجينات المقاومة في نبات الطماطة.

2- استخلاص الدنا: DNA extraction

تمت عمليات عزل DNA على وفق طريقة CTAB (10)، يتم طحن 50 ملغم من الأوراق النباتية الغضة بالنتروجين السائل وتوضع العينات في Tubes حجم 1.5 مل وتم إضافة GP1 Buffer 400µL، RNaseA 5µL، GP2 Buffer 100µL ، 750µL من GP3 Buffer، W1 Buffer 400µL، Wash Buffer 600µL تمت إضافة Elution Buffer 50 µL ثم يتم قياس العينات بجهاز nanodrop لغرض معرفة تركيز ونقاوة DNA.

3- تحضير تفاعلات الـ SSR بالاعتماد على Weising و Grander (16):

اضيف (3µL) من DNA العينات إلى Tube حجم (0.5mL) ثم وزعت(5µL) من محتويات الـ Master Mix لكل Tube ثم اضيف(2µL) من Primer R , Primer F وأخيراً يضاف حجم (13µL) من (Deionized Water) D.W لكل Tube وتعرض على Centrifuge ثم وضعت الأنابيب في جهاز PCR.

4-عملية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز

حضر هلام الاكاروز بإذابة الكمية المطلوبة من مسحوق هلام الاكاروز (1.5) غم في 100 مليلتر من محلول (1X) TBE ثم سخن المزيج مع التحريك إلى أن يذوب تماماً، ويترك لمدة مع التحريك ليبرد إلى حدود 50 – 55 درجة مئوية ثم صب في وعاء خاص بهلام الاكاروز بعد تثبيت المشط لصنع حفر التحميل مع مراعاة صب الهلام بهدوء وباستمرار لمنع تكون الفقاعات وإن تكونت تسحب بهدوء بالماصة الدقيقة، وترك إلى أن تصلب، بعد تصلب الهلام وضع في حوض الترحيل وغمر في محلول TBE بتركيز 1X، وخلطت الكمية المطلوبة من عينة DNA مع 2) µL (3 – من محلول الترحيل وحملت في الحفر الخاص بها ثم مرر تيار كهربائي بفرق جهد 3v/cm. بعد انتهاء عملية الترحيل صبغ الهلام في محلول صبغة بروميد الايثديوم

بتركيز نهائي (1µg/mL) مدة 20 دقيقة، ثم فحص على مصدر للأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 366 نانوميتر، مع Ladder 100.

النتائج والمناقشة:

تهيئة اللقاح وبكميات كبيرة على نباتات الطماطة الحساسة:

أظهرت نتائج تجربة البيت البلاستيكي على نباتات الطماطة الحساسة صنف super marmande حسب مقياس Taylor و Sasser بعد تلقحيها ببيوض نيماتود تعقد الجذور نسبة إصابة عالية (100%) على جذور نباتات الطماطة من خلال ملاحظة عدد العقد المتكونه على الجذور والذي تجاوز 100 عقدة/نبات بعد التلقيح بـ 60 يوم.

انتخاب 10 سلالة نقية من الطماطة غير محدودة النمو:

بعد زراعة 46 سلاله نقية من الطماطة غير محدودة النمو وبعد تلقيحها ببيوض نيماتود تعقد الجذور 1000 يضة/200 غم تربة وبعد مرور 60 يوم على إجراء العدوى، وسجلت القراءات حسب مقياس Sasser, Taylor ظهرت النتائج الموضحه في الجدول 2 وكالآتي:-

جدول2. مستويات المقاومة في سلالات الطماطة غير محدودة النمو بعد 60 يوم من العدوى بيافعات الطور الثاني والبيوض بمعدل 1000 بيضة/ 200غم تربة

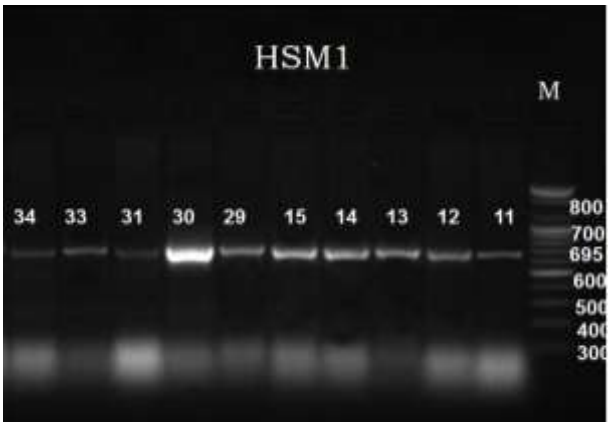
Reaction	Breeding Line	Root – Knot Index
HIGH Resistant	—	0
Resistance	30	1
Resistance	11 , 12 , 13 , 14 , 15 , 29 , 31 , 33 , 34	2
Susceptible	18 , 20 , 21 , 22 , 27	3
High Susceptible	—	4
High Susceptible (31 pure lines)		5

من خلال ملاحظة النتائج المدونه في جدول 2 يمكن ملاحظة أن السلالات (11، 12، 13، 14، 15، 29 30، 31، 33، 34) تميزت بمقاومتها لمرض تعقد الجذور إذ كان معدل الدليل المرضي يتراوح بين (2-1) .

النتائج المختبرية:

نتائج تجارب مؤشرات الـ SSR :- تم استخدام خمسة أزواج من بادئات مؤشرات SSR المرتبطة بجين المقاومة للنيماتود في محصول الطماطة وكانت النتائج كما يلي:

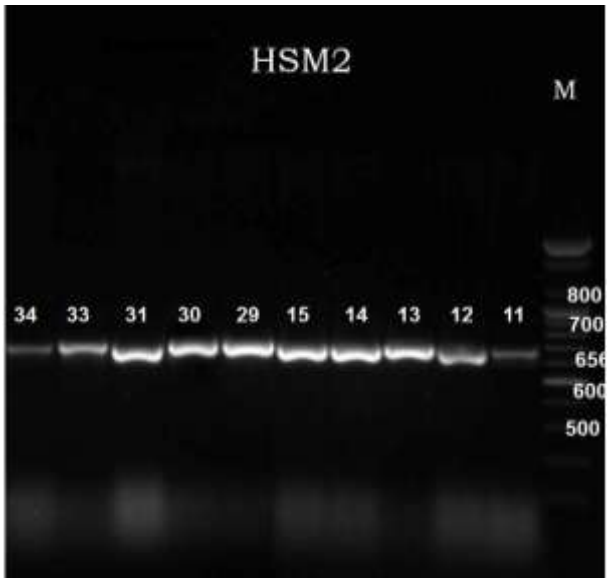
1 البادیء HSM1 نتج عن تطبيق هذا البادئ مع DNA سلالات الطماطة ظهور الحزم ذات الوزن الجزيئي (695 bp) في جميع السلالات عدا (11) وارتبط فيها البادئ مع الشريط المفرد من DNA لجود تتابعات من القواعد النتروجينيه المكملة له في شريط DNA القالب كما يوضح الشكل1:



الشكل 1. يمثل البادیء HSM1 (25bp) الذي يؤشر بوجود جين المقاومة ذي الطول 695bp (موقع NCBI) في سلالات الطماطة

2- البادیء HSM2

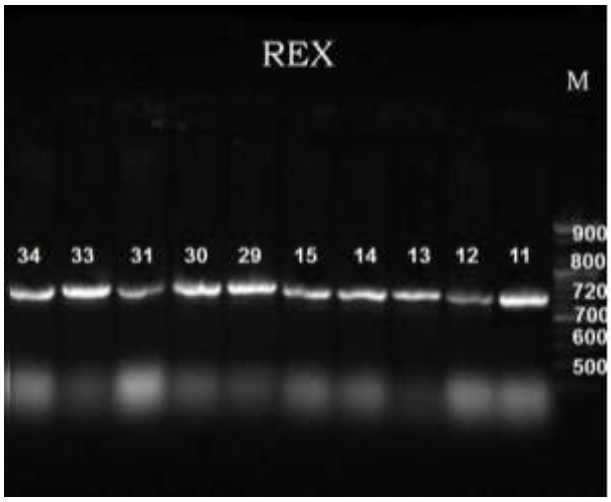
نتج عن تطبيق هذا البادئ مع DNA سلالات الطماطة ظهور الحزم ذات الوزن الجزيئي (656 bp) في جميع السلالات وارتبط فيها البادئ مع شريط DNA لوجود تتابعات من القواعد النتروجينية مكملة له في الشريط المفرد ل DNA القالب كما يوضح الشكل2.



الشكل 2. يمثل البادیء HSM2 (25bp) الذي يؤشر بوجود جين المقاومة ذي الطول 656bp (موقع NCBI) في سلالات الطماطة.

3- الباديء REX

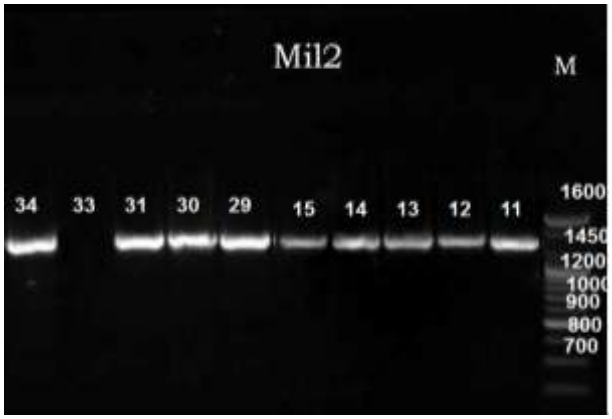
نتج عن تطبيق هذا البادئ مع DNA سلالات الطماطة ظهور الحزم ذات الوزن الجزيئي (720 bp) في جميع السلالات وارتبط فيها الباديء مع شريط DNA لوجود تتابعات من القواعد النتروجينيه مكملة له في شريط DNA القالب كما يوضح الشكل3:



الشكل 3. يمثل الباديء REX (20bp) الذي يؤشر بوجود جين المقاومة ذي الطول 720bp (Williamson وآخرون، 1994) في سلالات الطماطة.

4 الباديء Mi12

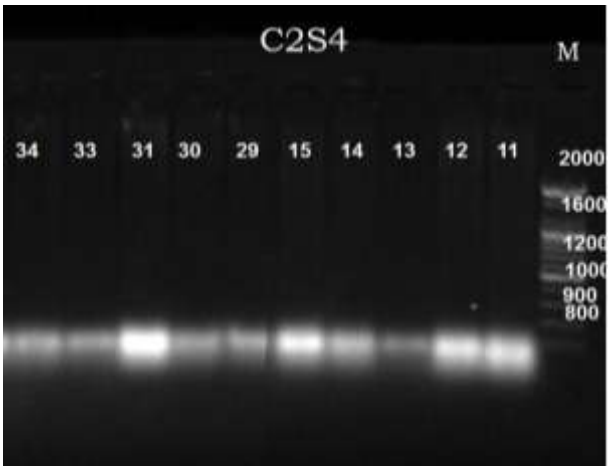
نتج عن تطبيق هذا البادئ مع DNA سلالات الطماطة ظهور الحزم ذات الوزن الجزيئي (1450 bp) في جميع السلالات عدا (33) كما يوضح الشكل 4:



الشكل4. يمثل الباديء Mi12 الذي يؤشر بوجود جين المقاومة ذي الطول 1450bp (Whitham وآخرون، 1996) في سلالات الطماطة.

5-الباديء C2S4

لم تُظهر أي من السلالات المستخدمة في الدراسة حزم DNA عند تطبيق هذا البادئ مع DNA سلالات الطماطة لعدم وجود تتابعات من القواعد النتروجينية مكملة للبادئ في الشريط المفرد من DNA القالب و هذا يعني ان البادئ غير متخصص على جينات المقاومة Mi كما يوضح الشكل 5. وبالأشاره الى الجدول 3 نلاحظ أن السلالات 14, 15 13,11 كانت أكثر السلالات مقاومة لمرض تعقد الجذور والذي أوضحته نتائج تجارب الـ PCR بأمتلاكها لجينات المقاومة وتميزت حقلياً بمقاومتها لمرض تعقد الجذور وذلك بالاعتماد على معدل الدليل المرضي حسب تدريج Taylor و Sasser مما يدل على أن هذه السلالات تمتلك مواقع جينية سائدة مما يمنحها صفة المقاومة، أما السلالة 12 فلم تظهر مقاومة لمرض تعقد الجذور اذ تجاوز فيها معدل الدليل المرضي 2.9 كما يوضح الجدول 3 وعلى الرغم من وجود أربعة أزواج من جينات المقاومة في هذه السلالة مما يدل أن بعض هذهِ الجينات ليس لها فعالية، فهي إما مواقع ذات اليلات متنحية يكشف عنها الباديء أو أنها جينات موجودة في DNA المايتوكوندريا أو البلاستيدات الموجودة في السايتوبلازم وذات تعبير جيني غير مؤثر في اليات المقاومة لنيماتود تعقد الجذور.



الشكل 5. يمثل الباديء C2S4 (22bp) الذي لم يؤشر بوجود جين المقاومة (Milligan وآخرون، 1998) في سلالات الطماطة.

و بالأشاره الى الجدول 4 نلاحظ ان السلالات (30 , 34) تحوي 4 أزواج من الجينات المقاومة تميزت هذهِ السلالات بمقاومتها لنيماتود تعقد الجذور إذ تكونت على جذورها عقد جذرية منخفضة لا تتجاوز عشرة عقد بعد مضي 45 يوم من تاريخ العدوى ولكن السلالة 34 بعد مضي 60 يوم ازداد عدد العقد لتصل إلى أكثر من 11-30 عقدة في حين بقيت السلالة 30 ضمن معدل عدد العقد التي تصنف السلالة من

نستنتج من هذه الدراسة بأن الجينات التي تتحكم بصفة المقاومة لنيماتود تعقد الجذور هي اكثر من جين و قد تم الكشف عنها بتقنية PCR اذ اثبتت مؤشرات الSSR فعاليتها في إظهار التباين بين السلالات في مقاومة الاصابة بالنيماتود حسب أحتواءها على جينات المقاومة.

خلالها على أنها مقاومة، في حين أن السلالة (29, 31 و 33,) التي احتوت عدد عقد كثيرة في الاختبارات الحقلية بعد مضي 60 يوم من موعد العدوى واقتربت من 100 عقدة في الجذور مما يدل على حساسيتها للإصابة وهذا ربما يؤكد إلى عدم فاعلية هذه الجينات وقد يعود إلى مواقعها المتنحية.

جدول 3. السلالات الشقيقة للسلالة $SH-17-\frac{17m}{B}$ وأعداد جينات Mi الموجودة في هذه السلالات ومعدل الدليل المرضي Sasser & Tylor المكون من 5 درجات

رمز التركيب الوراثي	الاسم الصريح للتركيب الوراثي	HSM1	HSM2	REX	Mi12	C2S4	معدل الدليل المرضي بعد 45 يوم	معدل الدليل المرضي بعد 60 يوم
11	$SH-17-\frac{17m}{B}$	*	*	*	*	-	2	2.1
12	$SH-17-\frac{17m}{C}$	*	*	*	*	-	2.3	2.9
13	$SH-17-\frac{17m}{D1}$	*	*	*	*	-	2.2	2.1
14	$SH-17-\frac{17m}{E}$	*	*	*	*	-	2.3	2.4
15	$SH-17-\frac{17m}{D2}$	*	*	*	*	-	2	2
LSD							0.33	

الدليل المرضي (0 = لا توجد عقد على الجذور، 1 = عدد العقد 1–2 على الجذور، 2 = عدد العقد 3–10 ، 3 = عدد العقد 11–30 ، 4 = عدد العقد 31–100 ، 5 = أكثر من 100 عقدة على الجذر).

جدول 4. السلالات الشقيقة للسلالة SH – 15A – 25C وأعداد جينات Mi الموجودة في هذه السلالات ومعدل الدليل المرضي.

رمز التركيب الوراثي	الاسم الصريح للتركيب الوراثي	HSM1	HSM2	REX	Mi12	C2S4	معدل الدليل المرضي بعد 45 يوم	معدل الدليل المرضي بعد 60 يوم
29	SH – 15A – 25C	*	*	*	*	-	2.4	3.6
30	SH – 15A – 25D	*	*	*	*	-	1.6	2.1
31	SH – 15A – 25E	*	*	*	*	-	2.2	4.2
33	SH – 15A – 25EZ	*	*	*	?	-	2.3	4
34	SH – 15 – 25E – M	*	*	*	*	-	2	2.5
LSD							0.93	

? : فشل الاختبار في الكشف عن الجينات في السلالة المؤشرة إزاءها بعد الإعادة لأكثر من مرة.

الدليل المرضي (0 = لا توجد عقد على الجذور، 1 = عدد العقد 1–2 على الجذور، 2 = عدد العقد 3–10 ، 3 = عدد العقد 11–30 ، 4 = عدد العقد 31–100 ، 5 = أكثر من 100 عقدة على الجذر).

REFERENCES

1.Ammiraju, S., C. Veremis, X. Huang, A. Roberts and I. Kaloshian. 2003. The heat – stable root knot nematode resistance gene Mi – 9 from *lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome. Theoretical and Applied Genetics. 106: 478 – 484.

2.Cook, R.J. 2000. Advances in Plant Health Management in the Twentieth Century. Annu. Rev. phytopathol. 38: 95 – 116.

3.Devran, Z., M.A. Sogut and N. Mutlu. 2010. Response of tomato root stocks with the Mi resistance gene to *meloidogyne incognita* race 2at different soil temperatures. Phytopathol. Mediterr. 49: 11 – 17.

4.Foolad, M.R. and D.R. Panthee. 2012. Marker assisted selection in tomato breeding . Cr.T. Rev. Plant. Sci. 31: 93 – 123.

5.Goggin, F.L., V.M. Williamson and D.E. Ullman. 2001. Variability in the response of macrosiphum euphorbiae and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) to the tomato resistance gene Mi. Environ. Entomol. 30: 101 – 106.

6.Hanna, H.Y. 2000. Double cropping muskmelons with nematode resistant tomatoes increase yield but mulch color has no effect. Hort Science. 35: 1213 – 1214.

7.Hajjar, R. and T. Hodgkin. 2007. The use of wild relative in crop improvement: A survey of development over the last 20 years. Euphytica. 156: 1 – 13.

8.Hussey, R.S. and K.R. Barker. 1973. A comparison of methods of collecting inoculum of *Meloidogyne spp*., including a new technique plant disease. 57: 8–1025.

9.Kie Wnick, S. and R.A. Sikora. 2006. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. Biological Control. 38: 179 – 187.

10.Lodhi, M. A., G. N. Ye, N. F. Weeden and B. I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and vitis species. Plant Molecular Biology Reporter. 12: 6 – 13.

11.Milligan, S. B., J. Bodeau, J. yaghoobi, I. Kaloshian, P. Zabel and V. M. 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. The Plant Cell. 10: 1307 – 1319.

12.Nombela, G., F. Beitia and M. Muniz. 2000. Variation in tomato host response to *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in relation to acyl sugar content and presence of the nematode and potato aphid resistance gene Mi. Bull. Entomol. Res. 90: 161 – 167.

13.Starr, J. L., J. Bridge and R. Cook. 2002 Resistance to Plant Parasitic Nematodes: History, Current Use and Future Potential. In: Starr, J. L., R. Cook and T. Bridge. (eds) Plant Resistance to Parasitic Nematodes. CAB International. Wallingford. PP.1 – 22.

14.Taylor A. L. and J. N. Sasser. 1978. Biology. Identification and Control of Root – Knot Nematodes (*Meloidogyne spp*.) Coop. Pub. Dep. Plant pathol. North Carolina State Univ., and U.S. Agency. In. T. Dev. Raleigh, N. C. PP. 111.

15.Whitham, S., S. Mccormick and B. Baker. 1996. The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 8776 – 8781.

16.Weising, K. and R. C. Gardener. 1999. A set of conserved PCR primers for simple sequence repeat polymorphism in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome. 42: 9-19.

17.Williamson, V. M., J. Y. Ho, F. F. Wu, N. Miller and I. Kaloshian. 1994. A PCR. based marker tightly linked to the nematode resistance gene,Mi, in tomato. Theor. Appl. Genet. 87: 757 – 763.