

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 زراعة - 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 10 سلالات مقاومتها للإصابة ببديان 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 تقنية 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 بواسطة 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 و Mi12) أثبتت فعاليتها عالمياً 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.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 47(5):1321-1327, 2016

Abood & Yassien

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 rearscher 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 هذه الطريقة الزراعية من ظروف مواتية لنشاط النيماتود (2)، ونتيجة لتزايد المخاوف البيئية والصحية من استخدام المبيدات المتخصصة على النيماتود، ولتقليل استخدام هذه المبيدات كان التوجه نحو استخدام المقاومة الوراثية *genetic resistance*، إذ تعد حلاً فعالاً لحماية النباتات من المسببات الممرضة والآفات الحشرية وأثبتت 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 الآفة والتي 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* (9-1) في الطماطة البرية (1)، ومن الجدير بالذكر وجود أكثر من 40 زوجاً من الجينات المقاومه تم تحديدها على الخارطة الجينية في الأنواع البرية للطماطة (4 و 7)، ولو حظ ان نباتات الطماطة الحاملة لجينات المقاومة *Mi* مقاومة للذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* (6 و 12) وأن هذه المقاومة تكون على درجة عالية من التخصص وفعالة تجاه بعض سلالات من الباطا *Macrosiphum euphorblae* (5)، ولتطوير أصناف طماطة مقاومة للإصابة بنيماتود تعقد الجذور يجب التحري عن المصادر الوراثية الحاملة للمقاومة شرط أساسي في برامج التربية و التحسين ومن هنا جاء الهدف من هذه 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 حقلياً ثم استخدام تقانه PCR للتحري عن جينات المقاومه MI

باستعمال بادئات مختلفه ومتخصصه ترتبط بالمواقع المختلفه لجينات *Mi* (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 طماطة مصابه من حقول زراعيه في محافظة بابل و التي تم استخلاص اللقاح منها في مختبرات كلية الزراعة /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 ويافاعات الطور الثاني من نباتات الطماطة المصابه إذ تم غسل الجذور جيداً من التربة العالقة بها ومن ثم استخلصت منها النيماتود (البيوض ويافاعات الطور الثاني) باستخدام المصافي والترقيق 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 هذه الدراسة 46 سلالة 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 حاوية على تربه معقمه وزن 200 غم بطريقة التعقيم الفيزيائي باستخدام جهاز الموصدة تحت ضغط 1 بار ودرجة حراره 121 درجة مئوية 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 حاوية على نبات الصيص لكل معاملة تم توزيعها عشوائياً بطريقة التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD)، وتم معاملة تربة جميع الطماطة بلقاح النيماتود بتركيز 1000 بيضة/ 200غم رمل

استخدمت مؤشرات الـ (Simple Sequence Repeat) SSR لغرض التحري عن جينات المقاومة Mi لما تتميز به هذه 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 GP2، RNaseA 5µL، GP1 Buffer 400µL، Buffer 100µL، GP3 Buffer 750µL، W1، Buffer 400µL، Wash Buffer 600µL، تم 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 F، Primer R، 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

حيث تستخدم أنبويه ماصة معقمة ودرجة لسحب اللقاح ثم إضافته إلى التربة بعد عمل حفرتين متقابلتين حول النبات بعمق 3-5 سم وتبعد 1-2 سم من النبات بتاريخ 2015/10/18 وبعد إجراء العدوى سقيت النباتات بانتظام وتم تسميدها باستخدام سماد سائل عباره عن مزيج من (Microelement + 6MG + NPK 20:20:20) (Triselement) 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 هاديء 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 للتمييز بين السلالات المقاومة والحساسة.

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

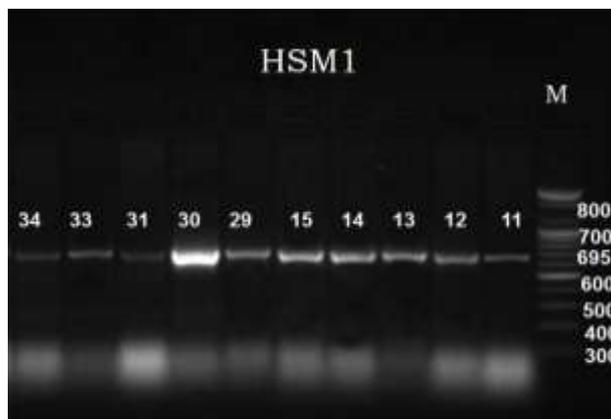
1- تصميم بادئات (Primers) متخصصة لجينات Mi: صممت بادئات اعتماداً على تسلسل القواعد النروجينية لجين المقاومة Mi الموجود في موقع الـ NCBI وباستخدام برنامج 3 Primer وبمساعدة أحد المختصين في علم الحياة الجزيئي الدكتور أحمد عبد الجبار سليمان كلية العلوم/جامعة الأنبار. فضلاً عن ذلك تم التوصل إلى وجود ثلاثة مؤشرات مرتبطة بجين المقاومة في الطماطة اثبتت فعاليتها في التحري عن جينات Mi وكما موضح في الجدول 1.

جدول 1: المؤشرات وتسلسلها وأوزانها الجزيئية ومصادرها

العلمية

اسم المؤشر	تسلسل القواعد النروجينية 5' to 3'	درجة حرارة (التجمد) °C	الوزن الجزيئي لـ Product (bp) Length	المصدر
REX-F	5 TCGGAGCCTTGGTCTGAATT 3	50	720	17
REX-R	5 GCCAGAGATGATTCGTGAGA 3			
Mi11F	5 ATCATTCTTTGGGATGCTG 3	50	1450	15
Mi11R	5 AGCAATCGAAGGTCAGAGG 3			
C12F	5 CAGTGAAGTGAAGTGATGA 3	50	1600	11
C15R	5 CTAAGAGGAATCTCATCAGG 3			
HSMIF	5 CGAGCTAGATGAGGATGAACAAAT 3	50	695	موقع NCBI
HSMIR	5 GCTCAGCAGCATCCCAAG 3			
HSMIF	5 CAAGCCATGCTTGTCTACT 3	50	656	
HSMIR	5 TTGATCTTTGTAGACACAAAACAG 3			

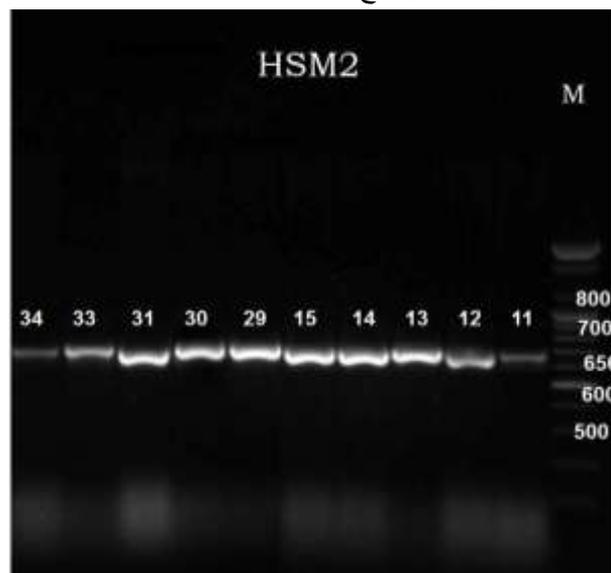
HSM1 نتج عن تطبيق هذا البادئ مع DNA سلالات الطماطة ظهور الحزم ذات الوزن الجزيئي (695 bp) في جميع السلالات عدا (11) وارتبط فيها البادئ مع الشريط المفرد من DNA لوجود تناوبات من القواعد النتروجينية المكمل له في شريط DNA القالب كما يوضح الشكل 1:



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

2- البادئ 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 تناوبات من القواعد النتروجينية مكمل له في الشريط المفرد ل DNA القالب كما يوضح الشكل 2.



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

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

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 تلقحها 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 سلالة نقية من الطماطة غير محدودة النمو وبعد تلقحها ببيوض نيماتود تعقد الجذور 1000 بيضة/200 غم تربة وبعد مرور 60 يوم على إجراء العدوى، وسجلت القراءات حسب مقياس Sasser, Taylor. ظهرت النتائج الموضحة في الجدول 2 وكالاتي:-

جدول 2. مستويات المقاومة في سلالات الطماطة غير

محدودة النمو بعد 60 يوم من العدوى ببيافات 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

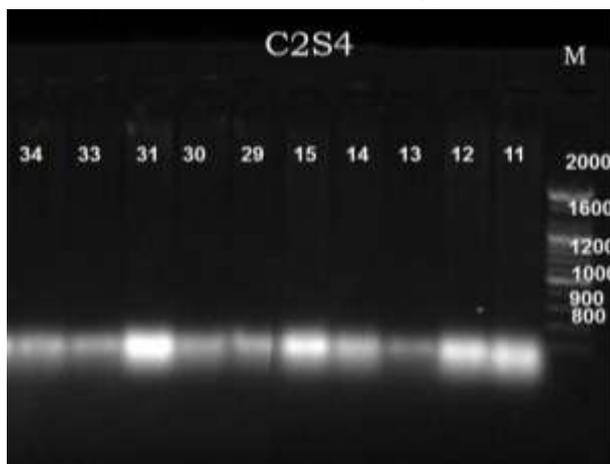
من خلال ملاحظة النتائج المدونه في جدول 2 يمكن ملاحظة أن السلالات (11، 12، 13، 14، 15، 29، 30، 31، 33، 34) تميزت بمقاومتها لمرض تعقد الجذور إذ كان معدل الدليل المرضي يتراوح بين (1-2) .

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 البادئ

الشريط المفرد من DNA القالب و هذا يعني ان البادئ غير متخصص على جينات المقاومة Mi كما يوضح الشكل 5. وبالأشارة الى الجدول 3 نلاحظ أن السلالات 14, 15 و 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 تدرج 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 هذه الجينات ليس لها فعالية، فهي إما مواقع ذات اليات متتحة يكشف عنها البادئ أو أنها جينات موجودة في DNA المايكوبلازما أو البلاستيدات الموجودة في السايكوبلازم وذات تعبير جيني غير مؤثر في اليات المقاومة لنيماتود تعقد الجذور.

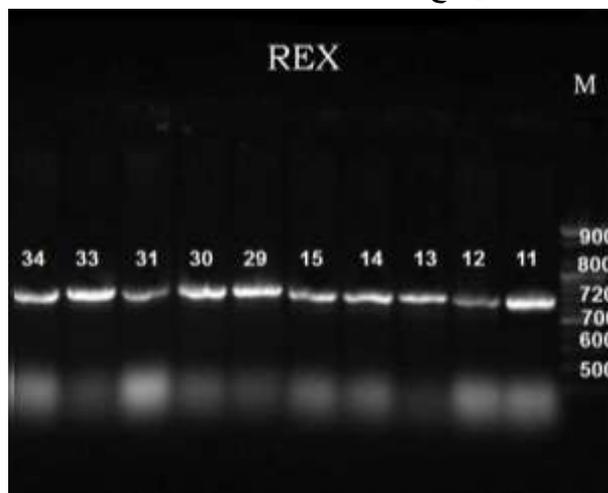


الشكل 5. يمثل البادئ C2S4 (22bp) الذي لم يؤشر بوجود جين المقاومة (Milligan وآخرون، 1998) في سلالات الطماطة.

و بالأشارة الى الجدول 4 نلاحظ ان السلالات (30 , 34) تحوي 4 أزواج من الجينات المقاومة تميزت هذه 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

3- البادئ REX

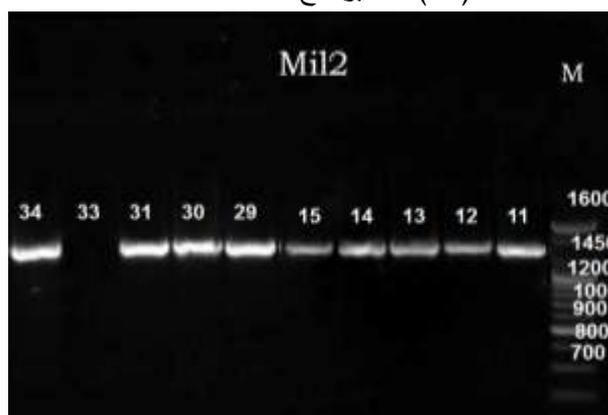
نتج عن تطبيق هذا البادئ مع DNA سلالات الطماطة ظهور الحزم ذات الوزن الجزيئي (720 bp) في جميع السلالات وارتبط فيها البادئ مع شريط DNA لوجود تتابعات من القواعد النتروجينية مكتملة له في شريط DNA القالب كما يوضح الشكل 3:



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

4 البادئ 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:



الشكل 4. يمثل البادئ Mi12 الذي يؤشر بوجود جين المقاومة ذي الطول 1450bp (Whitham وآخرون، 1996) في سلالات الطماطة.

5- البادئ 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 مكتملة للبادئ في

نستنتج من هذه الدراسة بأن الجينات التي تتحكم بصفة المقاومة لنيما تود 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 بالنيما تود حسب أحتواءها على جينات المقاومة.

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 عقد على الجذور).

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 عقد على الجذور).

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.