

MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLERİN DAYANIKLILIK ISLAHINDA KULLANILMASI

Zübeyir DEVRAN

Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, Antalya

ÖZET

Bitkiler; virüs, bakteri, fungus, nematod ve böcekler tarafından saldırıya uğramaktadırlar. Bitkiler bunlara karşı kendilerini koruyacak bağışıklık sistemlerine sahip değillerdir. Bununla birlikte kendilerini korumak için ya devamlı yada teşviklenme durumunda faaliyete geçen antimikrobial savunma mekanizmaları ve dayanıklılık genleri (R) taşımaktadırlar. Dayanıklılık ıslahının amacı, dayanıklı genlerinin belirlenmesi, kültür bitkilerine aktarılması ve klonlanmasıdır. Dayanıklılık genlerinin belirlenmesi, geleneksel yöntemlere göre uzun zaman almakta ve gözlemlemek zordur. Moleküler markörler kullanılarak bu zorluklar ortadan kaldırılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Dayanıklılık, RFLP, RAPD, SSR, AFLP.

USE OF MOLECULAR MARKERS IN RESISTANCE BREEDING

ABSTRACT

Plants are attacked by viruses, bacteria, fungi, nematodes and insects. Plants haven't immune system to protect themselves against pathogens and pests. However, they have carried mechanisms of antimicrobial defense which are either constitutive or inducible and resistance (R) genes. The purpose of resistance breeding is determined resistant genes, transferred to cultivar plants and cloned. Determination of resistance genes are time consuming and difficult in tradition breeding. These can be eliminated using molecular markers.

Key words: Resistance, RFLP, RAPD, SSR, AFLP.

1. GİRİŞ

Bitkiler yaşadıkları ortamda çeşitli hastalık ve zararlı etmenler (virüs, bakteri, fungus, nematod vb) tarafından saldırıya uğramaktadırlar (Baker ve ark., 1997). Bir bitki, bir patojenin veya ırkının konukçusu olurken başka bir patojenin konukçusu olmamaktadır. (Staskawicz ve ark., 1995). Bitki, konukçusu olduğu hastalık ve zararlı etmenin hücre içine girmesini engelleyici veya hücre içine girmeyi başarmış etmenin çoğalması ve yayılmasını önleyebilecek kimyasal maddelere (antimikrobial bileşikler, enzimler, yapısal savunma engelleyicileri vb) sahiptirler (Dixon ve ark., 1994). Bununla birlikte, bitkilerde en etkili savunma mekanizması dayanıklılık genleri (Resistance, R) tarafından sağlanmaktadır (Dixon ve

ark., 1994; Parker ve Coleman, 1997). Dayanıklılık genleri, patojene karşı dayanıklılığı kontrol eden en önemli yapısal proteinlerdir (Staskawicz ve ark., 1995; Van der Biezen ve Jone, 1998; Feys ve Parker, 2000).

Dayanıklılık ıslahının amacı; üzerinde çalışılan hastalık veya zararlı etmene karşı dayanıklılığı sağlayan gen veya genleri belirlemek, bunları ıslah programında kullanarak dayanıklı bireyler elde etmektir. Dayanıklılık ıslah programında en büyük zorluk ebeveynlerin (duyarlı ve dayanıklı bireyler) melezlenmeleri sonucu elde edilen dayanıklı bireylerin belirlenmesidir. Bu durum, klasik olarak ıslah sonucu elde edilen bitkilerin patojenle testlenmeleriyle ortaya koyulmaktadır. Bu uygulamalar zaman almakta, fazla iş gücü gerektirmekte ve oldukça güç olmaktadır. Ayrıca aynı

anda bir bitkiyi birden fazla patojenle testleme imkansız olmaktadır. Bütün bu olumsuzluklar moleküler markörlerin (belirteçlerin) kullanılması ile aşılabilmektedir. Üzerinde çalışılan dayanıklılık genleri ile ilgili moleküler markör veya markörler oluşturulduğu zaman, ıslahın her aşamasında dayanıklı ve duyarlı bitkiler birbirlerinden hızlı ve güvenli şekilde ayrılabilirdiğinden, zaman ve işgücü kaybı azaltılmaktadır. Birden fazla dayanıklılık genini de aynı anda belirlemek mümkün olmaktadır. Bununla birlikte moleküler markörler kullanılarak dayanıklılık genleri haritalanmakta ve klonlanmaktadır (Milligan ve ark., 1998; Rossi ve ark., 1998). Bu dayanıklılık genleri duyarlı bitkilere aktararak transgenik bitkiler elde edilmekte, buda ıslah programı kısaltmaktadır.

Bu makalede, yaygın olarak kullanılan moleküler markörler ve bunların dayanıklılık ıslahında kullanılmaları hakkında bilgi vermek amaçlanmıştır.

2. MOLEKÜLER MARKÖRLER

Moleküler markörler, genomda herhangi bir gen bölgesi yada gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasıdır. Bu markörler, polimeraz zincir reaksiyonuna bağlı olmayanlar (RFLP) ve bağlı olanlar (RAPD, AFLP, SSR) olarak adlandırılmaktadır (Staub ve ark., 1996; Ridout ve Donini, 1999).

2.1. Kesilen Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP)

İlk keşfedilen moleküler markör sistemidir. Üzerinde çalışılan bitkinin DNA'sı çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilir ve agorozda bir güç kaynağı yardımı ile yürütülür. DNA'lar southern

blot tekniği kullanılarak naylon membrana aktarılır. Markör olarak kullanılan DNA parçacıkları P^{32} veya biotin ile işaretlenir ve membran da bulunan kesilmiş DNA'lar ile eşleşmeye (hibridizasyona) tabi tutulur. Film geliştirilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilerek dayanıklı ve duyarlı bitkiler arasında farklılık (polimorfizm) bulmaya çalışılır. Çok fazla DNA'ya ihtiyaç duyulması, pahalı ve fazla zaman alması tekniğin dezavantajını; sonuçların güvenilirliği ve kodominat marker sistemine sahip olması ise avantajını oluşturmaktadır (Tanksley ve ark., 1992; Ahn ve Tanksley, 1993; Staub ve ark., 1996).

2.2. Değişken DNA Dizilerinin Tesadüfen Çoğaltılması (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)

RFLP metodundaki zorlukları aşmak ve PCR tekniğinin getirdiği avantajlardan yararlanmak amacıyla RAPD tekniği geliştirilmiştir (Williams ve ark.1990). Sistemin temeli, dayanıklı ve duyarlı bitkiler rasgele üretilmiş 6-10 baz uzunluğundaki RAPD primerleriyle PCR yapılması ve bireyler arasında farklılığın belirlenmesidir. PCR esnasında primerler tesadüfi olarak genoma bağlanmakta ve bağlanılan bölgeler çoğaltılmaktadır. PCR ürünleri, elektroforesis edildikten sonra ethidium bromide ile boyanarak oluşan polimorfik bantlar dikkate alınarak dayanıklı ve duyarlı bireyler birbirlerinden ayrılmaktadır. Kullanılan her RAPD primeri için oluşan PCR ürünleri iki grup içerisinde incelenmektedir. Birincisi değişken olarak adlandırılırlar ve bunlar nükleotitlerdeki inversiyon, delesyon (silinme) ve primer bağlanma bölgelerindeki nükleotit değişikliğinden kaynaklanmaktadır. İkincisi değişken olmayanlar (monomorfik) olarak

adlandırılmaktadırlar (Williams ve ark., 1990)

RAPD analizi temelde basittir ve tekniği kullanmak için dizilim (sekans) analizine gerek yoktur. Uygulanması hızlı ve kolaydır. Çoğaltma işlemi normal PCR koşullarından farklı olmakta, primer bağlanma sıcaklığı çok düşük (35-37 °C) tutulmakta ve tek bir primer kullanılmaktadır. Markörün uygulamasının hızlı ve kolay olması avantajını; yalnızca dominant markerler oluşturulması, PCR esnasında yanlış eşleşmelerin oluşu, PCR şartlarındaki küçük bir değişimin bile sonuçları etkilemesi ve laboratuvarlar arasında tekrarlanma problemlerine neden olması tekniğin dezavantajını oluşturmaktadır (Williams ve ark., 1990; Santos ve ark., 1994; Thormann ve ark., 1994).

2.3. Çoğaltılan Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphisms, AFLP)

Yeni bir markör sistemi olarak geliştirilmiştir (Vos ve ark., 1995). Ebeveynler ve ıslah sonucu elde edilen bireylerin DNA'ları iki restriksiyon enzimiyle (4 baz ve 6 baz) kesilmekte ve DNA'nın kesilmesi sonucu oluşan bu DNA parçacıkları adaptörlerle birleştirme (ligasyon) yapılmaktadır. Ligasyon ürünleri birer baz ilave edilmiş primerlerle PCR yapılmakta ve elde edilen PCR ürünleri 3 baz ilave edilmiş primerlerle (primerlerin birisi radyoaktif veya floresent ile işaretlenmekte) secici PCR tabi tutulmaktadır. PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütülerek oluşan polimorfizme göre sonuçlar değerlendirilmektedir. Tek bir reaksiyonda 30-150 bölge tanımlanabilmesi, sonuçların tekrarlanabilir olması en önemli avantajını oluşturmaktadır. Dezavantajı ise pahalı olması, laboratuvar ekipmanına gereksinim duyulması ve dominant

markör olmasıdır (Vos ve ark., 1995; Ridout ve Donini, 1999).

2.4. Basit Tekrarlı Diziler (Simple Sequence Repeats SSR)

Canlı genomunda çok sıklıkla tekrarlanan DNA dizileri bulunmaktadır. Bu diziler belirli sayılarda tekrarlanmaktadır. Dizilerin genomun neresinde bulunduğu ve kaç defa tekrarlandığı türden türe değişiklik göstermektedir. Aynı tür içindeki fertler arasında da bu dizilerin bulunup bulunmamasına dayalı olarak SSR tekniği geliştirilmiştir. Tekrarlanan bölgelere özgü spesifik primerler geliştirilmekte ve bu primerler ile PCR yapılmaktadır. PCR ürünleri, elektroforesis yapıldıktan sonra ethidium bromide veya gümüş nitrat kullanılarak boyandıktan sonra polimorfizm aranmaktadır. Tekniğin, kodominant yapı göstermesi ve tekrarlanabilir olması en önemli avantajını; genom bilgisine ve dizilim analizine ihtiyaç duyulması dezavantajını oluşturmaktadır (Rangwen ve ark., 1995; Ridout ve Donini, 1999).

3. MOLEKÜLER MARKÖRLERİN GÖRÜNÜŞLERİNE GÖRE SINIFLANDIRILMASI

3.1. Dominant markörler : Alleller arası ilişkide dominantlık söz konusu olduğundan heterozigot bireyleri (Aa) belirlemek mümkün değildir.

3.2. Kodominant markörler: Alleller arası ilişkide dominantlık söz konusu olmadığı için heterozigot bireyleri (Aa) homozigot dominant (AA) bireylerden ayırt etmek mümkündür. Bu yüzden herhangi bir noktadaki marker için üç ayrı şekil (AA, Aa ve aa) elde edilebilir ve bunlar birbirlerinden ayrılabilirlerdir.

4. MOLEKÜLER MARKÖRLERİN ÖZELLİKLERİ

Moleküler markörler morfolojik ve biyokimyasal markörlere göre bir çok avantajlara sahiptirler (Botstein ve ark., 1980; Helentjaris ve ark., 1985; Williams ve ark., 1990). Bunlar;

- a. Genoma bağlı olduklarından güvenilirlerdir,
- b. Tekrarlanabilir ve laboratuvarlar arasında standardize edilebilirler,
- c. Genomda birden fazla bölgeyi belirleme imkanına sahiptirler,
- d. Çevre koşullarından etkilenmemektedirler,
- e. Dominat ve kodominat özellik göstermektedirler,
- f. Bütün dokularda tanımlanabilmektedirler,
- g. Markörler öldürücü etkiye sahip değildir.

5. MOLEKÜLER MARKÖRLERİN DAYANIKLILIK ISLAHINDA KULLANILMASI

Dayanıklılık, hastalık ve zararlı etmeninin çoğalma ve gelişmesinin bitki tarafından engellenmesidir (Roberts 2002). Bitkinin hastalık ve zararlı etmenine karşı dayanıklılığı; düşük, orta ve yüksek düzeyde gerçekleşmektedir. Bitki yüksek düzeyde dayanıklı ise patojen hiç çoğalamamakta veya çok az düzeyde çoğalabilmekte, orta ve düşük dayanıklılıkta ise hastalık ve zararlı etmeni belli düzeyde çoğalabilmektedir (Roberts 2002). Buna karşın duyarlı bitkide dayanıklılığın tam tersi olaylar görülmektedir. Bu durumda hastalık ve zararlı etmeni tamamen çoğalmakta ve yoğun enfeksiyonlarda bitkinin ölümüne neden olmaktadır.

Dayanıklılık kalıtsal olarak; tek gen (monogenic), birkaç gen (oligogenic) ve

çok gen (polygenic) tarafından idare edilmektedir (Roberts 2002). Dayanıklılığın tek gen, birkaç gen ve çok gen tarafından idare edilmesinin bilinmesi ıslah çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. Tek gen tarafından idare edilen dayanıklılık ıslahı çalışmaları, diğerlerine göre oldukça basit ve sonuç elde edilmesi daha kolaydır. Çok gen tarafından yönetilen dayanıklılıkta genomda bir çok bölge etkili olduğundan genel olarak Mendel'in genetik açılım oranlarına uygun olmayabilmektedir (Geiger, 1989). Bu durum kantitatif olarak ölçülebilmekte ve bunlar QTL (Quantitative Trait Loci) olarak adlandırılmaktadırlar (Young, 1996) QTL üzerine çevre ve genler arası interaksiyonlar büyük rol oynamaktadır. Bu bölgelerin her birinin etki dereceleri birbirlerinden farklı olmakta ve çevre şartlarından fazla etkilenmektedirler. Çevrenin etkisinin fazla olması bu gibi dayanıklılık durumlarını belirlemeyi güçleştirmektedir (Tanksley 1993).

Başta çok gen olmak üzere, birkaç gen ve tek gen tarafından idare edilen dayanıklılık özelliklerini (karakterleri) normal olarak geleneksel ıslah yöntemleri ile belirlemek zaman almakta, fazla iş gücü gerektirmekte ve çok güç olmaktadır. Bununla birlikte bir bitkiyi aynı anda birden fazla hastalık veya zararlı etmenle testlemek geleneksel yöntemlere göre hemen hemen imkansızdır. Bütün bu zorluklar moleküler markörlerin devreye girmesiyle aşılabilmektedir (Ballvora ve ark., 1995; Bradshaw ve ark., 1998; Lu ve ark., 1999).

Moleküler markörlerin uygulamaya aktarılabilmesi için ilk önce üzerinde çalışılan hastalık ve zararlı etmenine karşı dayanıklılıktan sorumlu gen kaynağının klasik yöntemlerle belirlenmesi gerekmektedir. Hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık genleri

çoğunlukla bitkilerin yabani formlarında bulunmakta ve bu genler melezleme çalışmaları ile yabani bitkilerin kültür formlarına aktarılmaktadır (Boerma ve Hussey, 1992). Kimi durumlarda dayanıklılık geni veya genlerini taşıyan yabani türler ile bunların kültür formları arasındaki melezlemeler başarılı olmamakta ve istenilen dayanıklılık geni aktarılamamaktadır. Bu durum dayanıklılık ıslahı çalışmalarına sınırlama getirmektedir. Bu sınırlamalar, doku kültürü ve gen aktarım yöntemleri (*Agrobacterium tumefaciens*, biyolistik, elektroporasyon, mikroenjeksiyon vb.) kullanılarak aşılmaya çalışılmaktadır (Boerma ve Hussey, 1992; Vrain, 1999).

Dayanıklılık ıslahı çalışmalarında moleküler markörler: a) Dayanıklılık geni ile ilgili markör oluşturulmuş veya gen klonlanmış b) Dayanıklılık geni ile ilgili markör oluşturulmamış veya gen klonlanmamış ise uygulamada farklılıklar göstermektedir. Dayanıklılık geni ile ilgili moleküler markör veya markörlerin daha önceden oluşturulması veya genin klonlanması dayanıklılık ıslahı çalışmalarına büyük kolaylıklar getirmektedir. Üzerinde çalışılan dayanıklılık geniyle ilgili markör veya gene özgü primerler kullanılarak ebeveynler ve ıslah sonucu elde edilen bireyler (F₁, F₂ vb) fide döneminde PCR ile hızlı ve güvenli şekilde belirlenmektedir. Moleküler markörlerin bu gibi uygulamaları ıslah çalışmalarında, Markör Yardımcı Seleksiyon (MAS) olarak adlandırılmaktadır (Staub, 1996; Baird ve ark., 1996). MAS kullanılarak dayanıklı bireyler hızlı şekilde belirlendiği için ıslah çalışmalarına büyük bir ivme kazandırmakta ve yalnızca istenilen bireylerle yola devam etmeyi sağlamaktadır.

Moleküler markörlerin bir diğer uygulama alanı ise üzerinde çalışılan dayanıklılık geniyle ilgili markörlerin

olmadığı veya genin klonlanmadığı durumlarda başvurulmaktadır. Bu durumda, ilk önce dayanıklılık geniyle ilgili moleküler markör oluşturulmakta ve gen haritalanmaktadır. Bunun için ıslah yöntemleri kullanılarak F₂, BC ve rekombinat inbred hatlar oluşturulmaktadır. Daha sonra moleküler markörler kullanılarak gen ile ilgili moleküler markör veya markörler oluşturularak gen haritalanmaktadır. Gen klonlama yöntemleri kullanılarak da (cDNA kütüphanelerin oluşturulması, kromozom üzerinde yürüme ve transposon mimleme) gen izole edilmektedir (Yaghoobi ve ark., 1995; Rossi ve ark., 1998; Milligan ve ark., 1998). Bu tür uygulamalar belli zaman ve işgücü gerektirmektedir. Bununla birlikte oluşturulan markör veya genin izolasyonu daha sonra yapılan ıslah çalışmalara büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Çünkü elde edilen sonuçlar birebir ıslah uygulamalarına aktararak, ıslahı kısaltmakta ve kolaylaştırmaktadır.

Sonuç olarak; moleküler markörler, dayanıklılık ıslahı çalışmalarının hedefine daha hızlı ve güvenli şekilde ulaşmasını ve dayanıklılıktan sorumlu genlerin klonlanmasını sağlayan en önemli tekniklerdir.

KAYNAKLAR

- Ahn, S. and S.D. Tanksley. 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 7980-7984
- Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz and S.P. Dinesh-Kumkar. 1997. Signalling in plant-microbe interactions. Science. 276: 726-733.
- Baird, W.V., R.E. Ballard, S. Rajapakse and A.G. Abbott. 1996. Progress in Prunus mapping and application of molecular markers to germplasm improvement. HortScience. 31:1099-1106.
- Ballvora, A., J. Hesselbach, J. Niewöhner, D. Leister, F. Salamini, and C. Gebhardt. 1995. Marker enrichment and high-

- resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene Gro1. *Mol. Gen. Genet.* 249: 82-90.
- Boerma, H.R. and R.S. Hussey. 1992. Breeding plants for resistance to nematodes. *Journal of Nematology.* 24: 242-252.
- Bonierbale, P., Broun, T.M., Fulton, J.J., Giovannoni, S., Grandillo, G.B., Martin, R., Messeguer, J.C., Miller, L., Miller, A.H., Paterson, O., Pineda, M.S., Roder, R.A., Wing, W., Wu, and N.D. Young. 1992. High density molecular maps of the tomato and potato genomes. *Genetics.* 132:1141-1160.
- Botstein, D., R. White, M. Skolnick, and R. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Amer. J. Human Genet.* 32:314-331.
- Bradshaw, J.E., C.A. Hackett, R.C. Meyer, D. Milbourne, J.W. McNicol, M.S. Philips and R. Waugh. 1998. Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 97: 202-210.
- Dixon, R.A., M.J. Harrison and C.J. Lamb. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:479-501.
- Feys, B.J. and J.E. Parker. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *TIG.* 16:449-455.
- Helentjaris, T., G. King, M. Slocum, D. Siedenstrang, and S. Wegman. 1985. Restriction fragment length polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol.* 5:109-118.
- Lu, Z.-X., K. Sossey-Alaoui, G.L. Reighard, Wm.V. Baird, and A.G. Abbott. 1999. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. *Theor. Appl. Genet.* 99:115-122.
- Milligan, S.B., J. Bodeau, J., Yahoobi, 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.
- Parker, J.E. and M.J. Coleman. 1997. Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. *TIBS.* 22: 291-296.
- Rangwen, R., M.S. Akkaya, A.A. Bhagwar, U. Lavi, and P.B. Cregan. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90:43-48.
- Ridout, C.R. and P. Donini. 1999. Use of AFLP in cereals research. *Trends in Plant Science.* 4:76-79.
- Roberts, P.A. 2002. Concept and consequences of resistance in plant resistance to parasitic nematodes (eds J.L. Starr, R. Cook and J. Bridge). CAB International Pub. UK.
- Rossi, M., F.L. Goggin, S.B. Milligan, I. Kaloshian, D.E. Ullman, and V.M. Williamson 1998. The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 9750-9754.
- Santos, J.B.D., J. Nienhuis, P. Skrouch, and M.K. Slocum. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 87:909-915.
- Staub, J.E., F.C. Serquen and M. Gupta. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience.* 31: 729-740.
- Staskawicz, B., F.M. Ausubel, B.J. Baker, J.G. Ellis and J.D.G. Jones. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268:661-667.
- Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 27:205-233.
- Tanksley, S.D., M.V. Ganai, J.P. Prince, M.C. de Vicente, M.W. Bonierbale, P. Broun, T.M. Fulton, J.J. Giovannoni, S. Grandillo, G.B. Martin, R. Messeguer, J.C. Miller, L. Miller, A.H. Peterson, O. Pineda, M.S. Roder, R.A. Wing, W. Wu and N.D. Young. 1992. High density molecular maps of the tomato and potato genomes. *Genetics.* 132:1141-1160.
- Thormann, C.E., M.E. Ferreira, L.E. Camargo, J.G. Tivang, and T.C. Osborn. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.* 88:973-980.

- Van der Biezen and J.D.G. Jones. 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *TIBS*. 23: 454-456.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijnders, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 21: 4407-4414.
- Vrain, T.C. 1999. Engineering natural and synthetic resistance for nematode management. *Journal of Nematology*. 31: 424-436.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Yaghoobi, J., I. Kaloshian, Y. Wen, V.M. Williamson. 1995. Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor Appl Genet.* 91:457-464.
- Young, N.D. 1996. QTL Mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:479-501