



Fot. J. Sobolewski

Procedura identyfikacji genu *Frl* warunkującego odporność pomidora na *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Schoemaker przy użyciu markerów DNA, przydatnych do selekcji materiałów hodowlanych

Autor: dr Mirosława Staniaszek

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 6.6**

"Identyfikacja markerów DNA sprzężonych z genami warunkującymi odporność na choroby stanowiące istotne zagrożenie w uprawie roślin warzywnych, przydatnych do selekcji genotypów odpornych"

Programu Wieloletniego

„Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodniczej w celu zapewnienia wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodniczych oraz zachowania bioróżnorodności środowiska i ochrony jego zasobów”
finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Skierniewice 2014

Fuzaryjna zgorzel szyjki i podstawy łodygi pomidora

patogen: *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Schoemaker

Marker RAPD OPC08_{1100,790}

Sekwencje startera:

5' TGGACCGGTG 3'

Reakcja PCR

Mieszanka reakcyjna o objętości 20µl zawierająca:

- 1x PCR bufor
- 0.001% żelatynę
- po 0.1mM każdego z dNTP
- 3.0 mM MgCl₂
- 0.3µM startera
- 1U Taq polimerazy (Thermo Scientific, Fermentas, Sigma Aldrich, Invitrogen, Life Technologies)
- 20 ng DNA

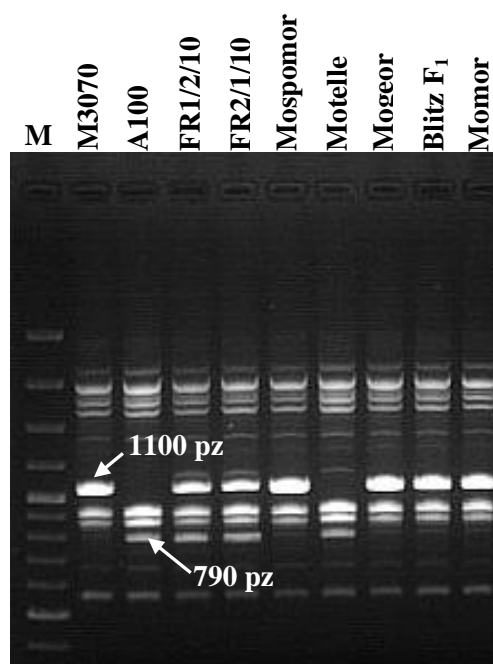
Profil termiczny amplifikacji:

1. 94°C – 1 min,
 2. 92°C – 15 sec,
 3. 36°C – 25 sec,
 4. 72°C – 74 sec,
 5. 72°C – 5 min
- } 45 x

Elektroforeza: 1.4% żel agarozowy w buforze TBE (Tris-Boran-EDTA) po barwieniu bromkiem etydydy.

Wyniki (fot.1)

- obecność fragmentu DNA o długości 1100 par zasad (pz) świadczy o odporności badanych genotypów (odmiana/linia hodowlana, mieszańiec F₁)
- fragment DNA o długości 790 pz specyficzny dla odmiany/linii podatnej
- obecność dwóch fragmentów DNA: 1100 pz i 790 pz, odmiana/linia odporna (heterozygotyczne locus odporności)



Fot. 1. Identyfikacja markera RAPD OPC08_{1100,790} w liniach hodowlanych, odmianach i mieszańcach F₁ pomidora.

M3070 – linia odporna

A100 – linia podatna

M – wzorzec mas DNA, 100 pz.

→ polimorficzny fragment DNA

Marker CAPS C2-25₁₁₀₀

Sekwencje starterów:

F: 5' ATGGGCGCTGCATGTTTCGTG 3'

R: 5' ACACCTTTGTTGAAAGCCATCCC 3'

Reakcja PCR

Mieszanina reakcyjna o objętości 20µl zawierająca:

- 1x PCR bufor
- po 0.1mM każdego z dNTP
- 1.5 mM MgCl₂
- starter F – 0.4 µM
- starter R – 0.4 µM
- 1U Taq polimerazy (Thermo Scientific, Fermentas, Sigma Aldrich, Invitrogen, Life Technologies)
- 30 ng DNA

Profil termiczny amplifikacji:

1. 94°C – 1 min,
 2. 94°C – 25 sec,
 3. 55°C – 35 sec,
 4. 72°C – 90 sec,
 5. 72°C – 5 min
- } 40 x

Trawienie produktu amplifikacji o długości 1100 pz enzymem restrykcyjnym *XapI*

- trawienie wykonać w oddzielnych probówkach zgodnie z zaleceniami producenta enzymu

- inkubacja: *XapI* – temp. 37⁰C przez 3 godziny

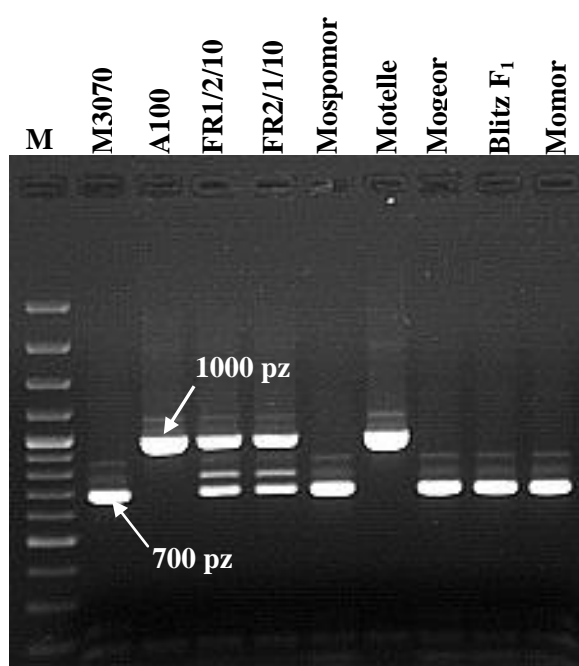
Elektroforeza: 1.4% żel agarozowy w buforze TBE (Tris-Boran-EDTA) po barwieniu bromkiem etydyny.

Wyniki (Fot.2)

W wyniku amplifikacji DNA z dwoma starterami otrzymamy produkt o wielkości 1100 pz

Po trawieniu produktu DNA 1100 pz enzymem restrykcyjnym *XapI* otrzymamy:

- fragment DNA o długości 700 pz dla odmiany/ linii odpornej
- fragment DNA o długości 1000 pz dla odmiany/linii podatnej
- dwa fragmenty: 1000 pz i 700 pz dla odmiany/linii odpornej (heterozygotyczne locus odporności)



Fot. 2. Identyfikacja markera CAPS C2-25 po trawieniu enzymem restrykcyjnym *XapI* w liniach hodowlanych, odmianach i mieszańcach F₁ pomidora.

M3070 – linia odporna

A100 – linia podatna

M – wzorzec mas DNA, 100 pz.

→ polimorficzny fragment DNA