



Fot. U. Kłosińska

**Procedura identyfikacji QTL warunkujących odporność ogórka na
Pseudoperonospora cubensis (Berk. et Curt.) Rostovzev przy użyciu
markerów DNA, przydatnych do selekcji materiałów hodowlanych**

Autor: mgr Wojciech Szczechura

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

Mączniak rzekomy ogórka

patogen: *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.)

Rostovzev

MARKER RAPD OPAM14₂₅₀₀

Sekwencja startera:

5' TGGTTGCGGA 3'

Reakcja PCR

Mieszanina reakcyjna o objętości 20µl zawierająca:

- 1x PCR bufor
- 0.001% żelatynę
- po 0.1mM każdego z dNTP
- 2.5mM MgCl₂
- 0.3µM startera
- 1U Taq polimerazy (Thermo Scientific, Fermentas)
- 20ng DNA

Profil termiczny amplifikacji:

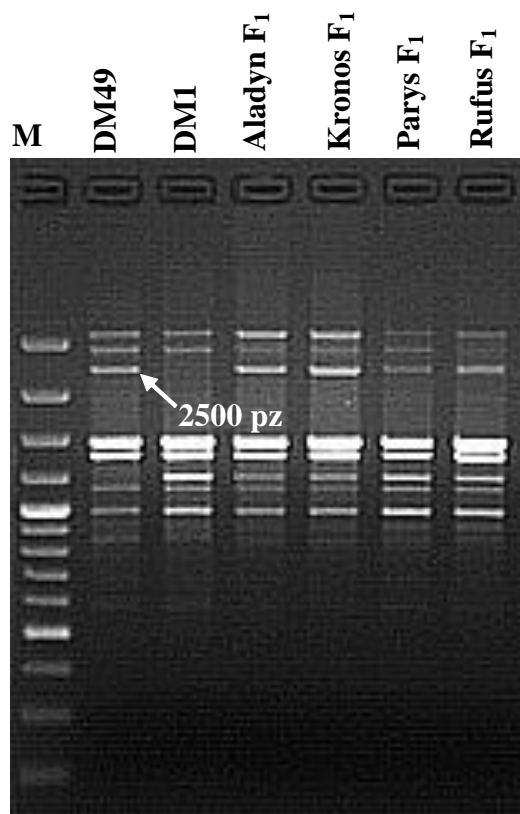
1. 94°C – 1 min,
 2. 92°C – 15 sec,
 3. 36°C – 25 sec,
 4. 72°C – 74 sec,
 5. 72°C – 5 min
- } 45 x

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

Wyniki (fot.1)

Po amplifikacji ze starterem OPAM14 otrzymamy:

- fragment DNA o długości 2500 pz specyficzny dla form odpornych



Fot.1. Identyfikacja markera OPAM14₂₅₀₀ w liniach hodowlanych i mieszańcach F₁ ogórka

DM49 – linia odporna

DM1 – linia podatna

M – wzorzec mas DNA, 100 pz

→ polimorficzny fragment DNA

MARKER RAPD OPAS05₈₅₀

Sekwencja startera:

5' GTCACCTGCT 3'

Reakcja PCR

Mieszanina reakcyjna o objętości 20µl zawierająca:

- 1x PCR bufor
- 0.001% żelatynę
- po 0.1mM każdego z dNTP
- 2.5mM MgCl₂
- 0.3µM startera
- 1U Taq polimerazy (Thermo Scientific, Fermentas)
- 20ng DNA

Profil termiczny amplifikacji:

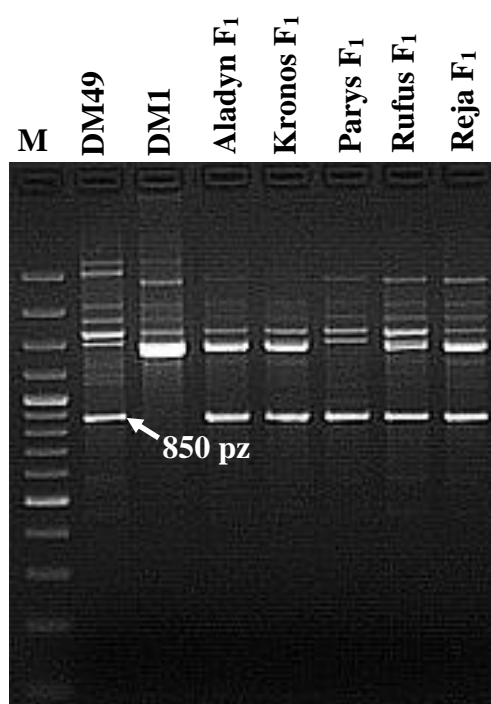
1. 94°C – 1 min,
 2. 92°C – 15 sec,
 3. 36°C – 25 sec,
 4. 72°C – 74 sec,
 5. 72°C – 5 min
- } 45 x

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

Wyniki (fot.2)

Po amplifikacji ze starterem OPAS05:

- fragment DNA o długości 850 pz specyficzny dla form odpornych



Fot.2. Identyfikacja markera OPAS05₈₅₀ w liniach hodowlanych i mieszańcach F₁ ogórka

DM49 – linia odporna

DM1 – linia podatna

M – wzorzec mas DNA, 100 pz

→ polimorficzny fragment DNA

MARKER SCAR AW14₈₅₀

Sekwencje starterów:

F: 5' GGTTCCTGCTCTTCATTCATTTTCA 3'

R: 5' GGTTCCTGCTCTAAATAACCAAAAA 3'

Reakcja PCR

Mieszanina reakcyjna o objętości 20μl:

- 1x PCR bufor
- po 0.2mM każdego z dNTP
- 3mM MgCl₂
- 0.4μM starter F
- 0.4μM starter R
- 2U Taq polimerazy (Thermo Scientific, Fermentas)
- 20ng DNA

Profil termiczny amplifikacji:

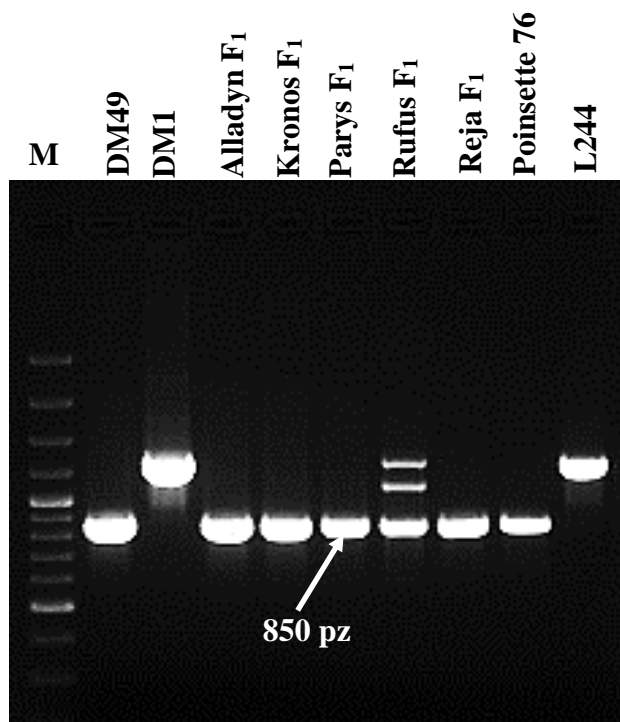
1. 94°C – 3 min,
 2. 92°C – 30 sec,
 3. 60°C – 60 sec,
 4. 72°C – 90 sec,
 5. 72°C – 5 min
- } 40 x

Elektroforeza: 1.6% żel agarozowy w buforze TBE (Tris-Boran-EDTA) po barwieniu bromkiem etydy.

Wyniki (fot.3)

Po amplifikacji ze starterem SCAR AW14 otrzymamy:

- fragment DNA o długości 850 pz specyficzny dla form odpornych



Fot. 3. Identyfikacja markera SCAR AW14₈₅₀ w liniach hodowlanych, odmianach i mieszańcach F₁ ogórka

DM49 – linia odporna

DM1 – linia podatna

M – wzorzec mas DNA, 100 pz

→ polimorficzny fragment DNA