

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2020

Ročník XXIV, číslo 3/2020

Brno 2020

Obsah

- 1 Stanovení glyfosátu po derivatizaci**
Petra Kosubová, Klára Ondreášová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský,
Odbor NRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno 1

- 2 Zavedení kvalitativní detekce transgenů MON 88701 u bavlny**
Jana Stehlíková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,
Hroznová 2, 656 06 Brno 9

- 3 Zavedení kvalitativní detekce transgenů VCO-01981-5 u kukuřice**
Jana Stehlíková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,
Hroznová 2, 656 06 Brno 22

- 4 Zavedení metody pro identifikaci odrůd ječmene pomocí SSR markerů**
Jitka Klemková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,
Hroznová 2, 656 06 Brno 33

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení glyfosátu po derivatizaci

Petra Kosubová, Klára Ondreášová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Glyfosát patří mezi celosvětově nejvíce používané herbicidy. Kvůli jeho masivnímu používání je nutné sledovat jeho výskyt nejen v životním prostředí, ale také v rámci potravního řetězce. Doporučená metodika QuPPE evropské referenční laboratoře neposkytuje s využitím dostupného vybavení dostatečně nízké limity stanovení, a to hlavně pro kontrolu ekologické produkce. Analýza derivatizovaného glyfosátu umožnila snížit limit stanovení na 0,006 mg/kg. Vybraná metodika zahrnující tento derivatizační krok byla testována a poté validována pomocí obohacených vzorků rostlinného materiálu a interních referenčních materiálů krmných surovin.

2 Teoretická část

2.1 Úvod

Glyfosát, [N-(fosfonomethyl)glycin], je širokospektrální, systémový herbicid používaný celosvětově pro kontrolu plevelů. V zemědělství se používá při pěstování geneticky modifikovaných plodin odolných proti glyfosátu, ale také se často využívá na zahradách a dalších místech s nezemědělským využitím (1). Glyfosát se aplikuje na povrchové části rostlin, ze kterých je rozveden cévními svazky a následně způsobuje odumření rostliny. V půdě se glyfosát sorbuje a degraduje a jeho hlavním metabolitem je kyselina aminomethylfosfonová (AMPA) (2).

Glyfosát je méně toxický než jiné herbicidy, ale přesto může být nebezpečný pro lidské zdraví. Jeho výskyt je proto legislativně limitován v potravinách a krmivech. Vzhledem k jeho intenzivnímu používání při zemědělských i nezemědělských aplikacích se výskyt glyfosátu a jeho metabolitů sleduje také v dalších složkách životního prostředí, např. ve vodě.

Stanovení reziduí glyfosátu a AMPA je analyticky náročné pro jejich amfoterní a vysoce polární charakter, jejich nízkou hmotnost a nedostatek funkčních skupin, které by mohly usnadnit jejich detekci (3). V půdních vzorcích a rostlinném materiálu je stanovení komplikováno složitostí matrice a s tím souvisejícím množstvím matričních interferentů. Proto jsou ve většině případů metody pro stanovení glyfosátu a AMPA obtížné, zahrnují zdlouhavou přípravu vzorku vedoucí k eliminaci rušivých koextraktů a derivatizační krok pro zvýšení citlivosti detekce a zlepšení chromatografické separace. Nejčastěji se k derivatizaci využívá fluorenylmethylchloroformát (FMOC), který poskytuje fluoreskující derivát snadno stanovitelný metodou kapalinové chromatografie (LC) s fluorescenční detekcí. Tento přístup je v současnosti zpracován v podobě normy ČSN ISO 21458, která je určena pro analýzu vzorků vod (4). U složitějších materiálů rostlinného či živočišného původu může být průběh derivatizace ovlivněn matričními koextrakty. Rozvoj techniky LC s tandemovou hmotnostně-spektrometrickou detekcí (MS/MS) umožnil zlepšení předchozí metodiky založené na konvenčních detektorech, neboť FMOC deriváty snadno ionizují v elektrospreji a poskytují dobrou odezvu při MS/MS detekci. Dalším důvodem derivatizace glyfosátu je dosažení dostatečné retence na běžně používaných reverzních fázích C18, na kterých jsou nativní glyfosát a AMPA eluovány v mrtvém objemu kolony (5).

Cílem práce bylo zavést metodu pro stanovení glyfosátu po derivatizaci činidlem FMOC v krmivech a rostlinách a tím dosáhnout nižších kvantifikačních limitů, které umožní provádět kontroly přítomnosti glyfosátu v produktech ekologického zemědělství.

3 Praktická část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Standardy a referenční materiály

Standardy pesticidů v pevném nebo kapalném skupenství s deklarovanou čistotou:

Glyphosate ($C_3H_8NO_5P$), CAS [1071-83-6] (Sigma-Aldrich).

Vnitřní isotopově značené standardy (ILIS):

Glyphosate- $^{13}C_2$, ^{15}N ($^{13}C_2CH_{815}NO_5P$), $c = 1 \text{ mg/ml H}_2O$.

Interní referenční materiál (IRM): Vzorky získané v rámci účasti v evropských testech způsobilosti (EUPT) pořádané Referenčními laboratořemi Evropské Unie (EURL) pro rezidua pesticidů.

3.1.2 Chemikálie

Voda (ultračistá), methanol (CH_3OH , pro HPLC a pro LC-MS), kyselina mravenčí ($HCOOH$), hydroxid sodný ($NaOH$), kyselina boritá (H_3BO_3), chlorid draselný (KCl), dichloromethan (CH_2Cl_2 , chromasolv), acetonitril (CH_3CN , chromasolv), derivatizační činidlo FMOC-Cl, octan amonný (CH_3COONH_4).

3.1.3 Laboratorní pomůcky a vybavení pro přípravu vzorku

Analytické váhy, horizontální třepačka (300 kmitů/min), centrifuga (5000 ot/min), centrifugační zkumavky plastové se šroubovacím víčkem (15 ml; 50 ml), SPE kolonky Oasis HLB 200 mg (Waters), SPE manifold, vývěva, vysokorychlostní míchadlo (např. Vortex), termovap, filtrační materiál (stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů $0,2 \mu m$), vialky (2 ml).

3.1.4 Postup přípravy

Vzorek byl k analýze připraven podle práce K. Banerjee (6). Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační zkumavky. Navážka se liší v závislosti na povaze materiálu, např. u suchých vzorků, jako jsou obiloviny, luštěniny a olejnatá semínka se navažuje 2,5 g, u vzorků rostlin se také navažuje 2,5 g, ale u vzorků s vysokým obsahem vody (tj. zelenina), např.

brambor, je navážka 5 g. Ke vzorku se přidá 20 ml 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě a 20 ml dichlormethanu (DCM). Vzorek se extrahuje třepáním 10 min při 300 kmitech/min. Poté se vzorek odstředí 5 min při 4000 ot/min, při 5 °C. 4ml podíl vodného supernatantu se převede do čisté 50ml centrifugační zkumavky a přidá se k němu ILIS, 4 ml borátového pufru a 4 ml 20mM roztoku FMOC-Cl. Směs se třepe 30 min při 300 kmitech/min a poté se doplní do 50 ml 1% kyselinou mravenčí a odstředí se při 4000 ot/min. Následuje čištění metodou SPE. Kolonky se nejprve promyjí 3 ml methanolu a 3 ml 1% kyselinou mravenčí. Pak se na kolonky nanese vzorek. Poté následuje promytí 10 ml vody a 5 ml DCM. Eluce se provede 5 ml methanolu. Eluát se následně odfouká pod dusíkem téměř do sucha a rekonstituuje 1 ml 50 % methanolu. Po promíchání na Vortexu následuje ultrazvuk po dobu 1 min a filtrace vzorku do vialky.

3.1.5 Přístrojové vybavení a podmínky pro koncové stanovení

Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (např. ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters) nebo LC-MS/MS 6420 (Agilent)), vybavený UPLC kolonou (např. ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters)) nebo UHPLC kolonou (např. ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD, 100 mm × 2,1 mm × 1,8 μm (Agilent)).

Chromatografická separace proběhla podle práce S. Gosciny gradientovou elucí mobilní fáze A složené z vody a methanolu v poměru 90 : 10 modifikované 5 mM roztokem octanu amonného, a mobilní fáze B složené z vody a methanolu v poměru 10 : 90 při průtoku 0,45 ml/min a teplotě kolony 45 °C (7). Objem nástřiku byl 2,5 μl. Ionizace byla provedena elektrosprejem v pozitivním módu při teplotě iontového zdroje 150 °C, desolvační teplotě 450 °C a průtoku desolvačního plynu 900 L/hr. Analyty byly detekovány v módu sledování vybraných přechodů (MRM). Detailní informace k proceduře, chemikáliím a analýze jsou zpracovány v JPP ÚKZÚZ, postup č. 10606.1 (8).

Tabulka 1. Sledované MRM přechody.

	MRM (m/z)	Napětí na konusu (V)	Kolizní energie (V)
Glyfosát-FMOC	392→88	20	20
Glyfosát-FMOC	392→179	20	30
ILIS-glyfosát-FMOC	395→91	20	20
ILIS-glyfosát-FMOC	395→179	20	30

3.2 Výsledky

3.2.1 Prvotní testování

V první fázi byl testován postup popsáný v práci S. Gosciny (7), kde se vzorek extrahuje směsí vody, methanolu a DCM a po odstředění DCM se celý supernatant odpaří téměř k suchu, rekonstituuje 1 ml vody, derivatizuje FMOC v prostředí borátového pufru a nadbytek činidla se nakonec odstraní DCM. Výhodou této procedury při použití ILIS byla možnost kvantifikaci reálných vzorků pomocí solventové kalibrace. Shodnost matriční a solventové kalibrace vypočtená v SW Effvalidation porovnáním kalibračních přímek byla 100,2 %. Metoda však vykazovala také řadu nevýhod, jako např. časově náročné zkoncentrování supernatantu a nedostatečné odstranění nadbytku derivatizačního činidla, které při finální LC-MS/MS analýze silně kontaminuje iontový zdroj.

Druhý testovaný postup podle K. Banerjee (6) není časově výhodnější, ale zahrnuje efektivnější odstranění FMOC pomocí extrakce na pevnou fázi (SPE) s využitím kolonek HLB Oasis. Nejprve byla ověřena použitelnost tohoto postupu pro rutinní analýzu různorodého rostlinného materiálu a poté byl tento postup validován.

3.2.2 Validační experiment

Metoda byla validována pomocí interních referenčních materiálů a vícenásobných stanovení obohacených vzorků obilovin (kukuřičná mouka) a rostlin (směsný vzorek). Vybrané matrice bez přítomnosti glyfosátu byly obohaceny na hladinách 0,006 mg/kg (kukuřičná mouka) a 0,040 mg/kg (rostliny) v minimálně pěti opakováních. Stanovená přesnost (opakovatelnost) a správnost (výťažnost) postupu vyhovovala validačním kritériím podle SANTE/11945/2015, tj. výťažnost v rozmezí (70 – 120) % a opakovatelnost ≤ 20 % (9). Výsledky validace jsou zobrazeny v tabulce 2.

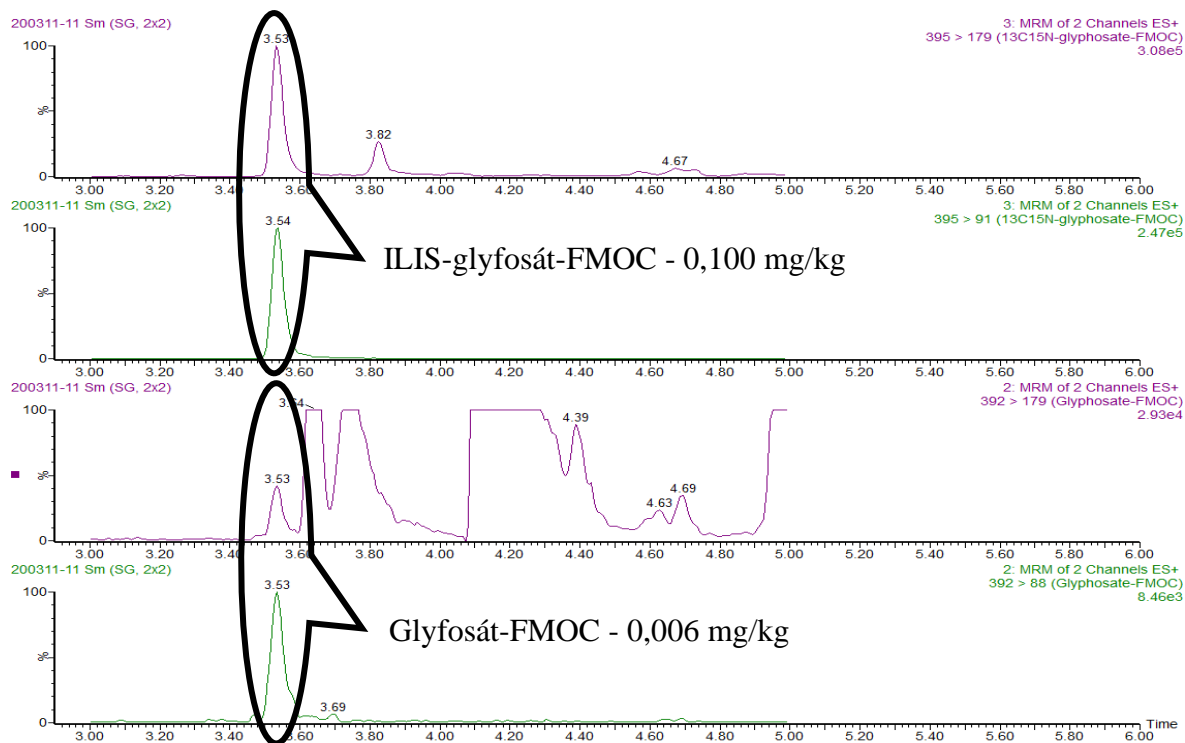
Tabulka 2. Přesnost a správnost opakovaných stanovení validovaných materiálů.

Materiál	Obohacení/ obsah v IRM (mg/kg)	Naměřený obsah (mg/kg)	Výťažnost (%)	Opakovatelnost (%)	Počet opak.
Kukuřičná mouka- SP	0,006	0,0066	105,2	6,6	6
Rostlinný směsný materiál-SP	0,040	0,0339	84,7	9,2	5

Materiál	Obohacení/ obsah v IRM (mg/kg)	Naměřený obsah (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Opakovatelnost (%)	Počet opak.
Kukuřičná mouka- IRM	0,568	0,5873	103,4	0,4	6
Čočka-IRM	0,827	0,8763	106,0	1,1	6
Brambor-IRM	0,340	0,3618	106,4	4,9	6

Nejnižší validovaná hladina označovaná také jako reportovací limit byla 0,006 mg/kg a na protokolu se uvádí jako mez stanovitelnosti postupu s derivatizací. Tento reportovací limit umožňuje kontrolovat jak konvenční, tak ekologickou zemědělskou produkci. Na obrázku 1 je uveden chromatogram derivatizovaného glyfosátu-FMOC na hladině reportovacího limitu v kukuřici.

Obrázek 1. Chromatogram derivatizovaného glyfosátu a příslušného ILIS v kukuřici



K identifikaci látek byla použita konfirmační kritéria, tj. retenční čas (RT) a poměr sledovaných, kvantifikačních a konfirmačních iontů. Pro správnou kvantifikaci je nutné používat izotopově značený vnitřní standard (ILIS) nebo metodu standardního přídatku.

Na obrázku 1 je uveden chromatogram derivatizovaného ILIS-glyfosátu-FMOC na hladině 0,100 mg/kg v kukuřici.

3.2.3 Ověření metody

Nově zavedená metoda s derivatizací FMOC byla v roce 2017 a 2018 ověřena účastí v EUPT-SRM (10, 11).

Tabulka 3. Přehled výsledků testů EUPT-SRM.

EUPT	Rok	Testovací vzorek	Vztažná hodnota (mg/kg)	Stanovená hodnota (mg/kg)	z-skóre
SRM12	2017	Jahodové pyré	0,306	0,297	-0,1
SRM13	2018	Sojová mouka	0.903	0,954	0,2

4 Závěr

Zavedená metoda, která zahrnuje derivatizaci FMOC, představuje citlivější metodu stanovení glyfosátu v porovnání s původní postupem (12), založeným na metodice QuPPE (13), určeným pro analýzu nativního glyfosátu v konvenčních krmných surovinách a poškozeném rostlinném materiálu s mezí stanovitelnosti (0,1 – 0,5) mg/kg. V rámci validace byly požadavky na správnost a přesnost nové metody s derivatizací splněny na hladině 0,006 mg/kg, který tedy představuje mez stanovitelnosti této metody a umožňuje její využití při kontrole ekologické produkce. Metoda se dále využívá při analýze složitějších krmných surovin, jako jsou např. luštěniny a olejnin. Správnost validované metody byla potvrzena účastí v kruhových testech EUPT-SRM.

5 Literatura

1. COX, C. Herbicide Factsheet: Glyphosate. *Journal of Pesticide Reform*. 2004, roč. 24, č. 4, s. 10–15.
2. BOTERO-COY, A.M., M. IBÁÑEZ, J.V. SANCHO a F. HERNÁNDEZ. Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2013, vol. 1292, s. 132-141. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.007.

3. BOTERO-COY, A.M., M. IBÁÑEZ, J.V. SANCHO a F. HERNÁNDEZ. Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. *Journal of Chromatography A*. 2013, vol. 1313, s. 157-165. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.07.037.
4. ČSN ISO 21458. *Jakost vod: Stanovení glyfosátu a AMPA - Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorimetrickou detekcí*. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010.
5. PEREIRA, L. LC/MS of Glyphosate and AMPA. *Thermo Fisher Scientific*, Application note 20029. 2006.
6. BANERJEE, K., D.P. OULKAR a P.G. ADSULE. Development and validation of a novel residue analysis method for glyphosate and AMPA in plant matrices by LC-MS/MS. Prezentace na konferenci EPRW 2012, Vídeň.
7. GOSCINNY, S., H. UNTERLUGGAUER, J. ALDRIAN, V. HANOT a S. MASSELTHER. Determination of Glyphosate and Its Metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in Cereals After Derivatization by Isotope Dilution and UPLC-MS/MS". DOI: 10.1007/s12161-011-9361-7. ISBN 10.1007/s12161-011-9361-7. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-011-9361-7>.
8. JPP ÚKZÚZ, postup č. 10606.1.
9. SANTE/11945/2015 – Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residue analysis in food and feed.
10. ANNASTASSIADES, M., et al.: EU Proficiency test: Residues of pesticides requiring single residue methods in strawberry purée, EUPT-SRM12 final report, 2017.
11. ANNASTASSIADES, M., et al.: EU Proficiency test on the analysis of pesticides residues requiring single residue methods in soybean flour, EUPT-SRM13 final report, 2018.
12. JPP ÚKZÚZ, postup č. 10605.3.
13. ANNASTASSIADES, M., et al. QuPPE. Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement (version 9.3, April 2017).

Zavedení kvalitativní detekce transgenu MON 88701 u bavlny

Jana Stehlíková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdMB Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
jana.sehlikova@ukzuz.cz

1 Úvod

Geneticky modifikovaný organismus (GM organismus, GMO) je organismus, jehož genetický materiál byl úmyslně změněn, a to způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací. Dotčené techniky jsou uvedeny v Zákonu o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty č. 78/2004 Sb.

Geneticky modifikované (GM) plodiny jsou takové rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál (DNA) pomocí genových technologií. Jedná se o šlechtitelské metody z oblasti biotechnologií, které mimo jiné umožňují mezidruhový přenos genů. Nejedná se však o tvorbu a vnášení uměle vytvořených genů.

MON 88701 je geneticky modifikovaná bavlna, jejíž DNA obsahuje gen *bar* a gen *dmo*. V případě genu *bar* byl zdrojem *Streptomyces hygroscopicus*, produktem je phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) enzym a výsledkem je tolerance vůči glufosinátu amonnému.

U genu *dmo* byl zdrojem *Stenotrophomonas maltophilia* kmene DI-6, produktem je enzym dicamba mono-cyklooxygenáza a výsledkem je tolerance k herbicidu dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoová kyselina).

2 Cíl

Cílem práce je rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u bavlny o kvalitativní stanovení MON 88701 a určení meze detekce stanovení.

Součástí zavádění stanovení transgenů MON 88701 bude ověření detekce screeningového elementu bar.

3 Princip

Základem metody detekce genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o běžně používanou metodu, při které dochází k mnohonásobnému zmožení konkrétního požadovaného úseku DNA. V tomto případě se jedná o klasickou PCR s elektroforetickou detekcí amplikonu na agarózovém gelu.

4 Materiál a metody

Pro zavedení byly použity certifikované referenční materiály (CRM) American Oil Chemist's Society (AOCS)

0113A: Cotton Monsanto MON88701 Powder (> 98,45 % GM), laboratorní značení: CRM 9/2018

0804A: Cotton Monsanto Company Non modified Powder (0,1% GM), laboratorní značení: CRM 17/2014.

Izolace byla provedena pomocí zavedeného komerčního kitu (NucleoSpin® Food – MACHEREY-NAGEL). U izolátů DNA byla změřena koncentrace, byla otestována kvalita i amplifikovatelnost DNA.

4.1 Přístroje a pomůcky

Extrakce DNA

Váhy s přesností 0,01 g.

Vodní lázeň nebo termoblok, přednostně s vibrací, třepáním.

Centrifuga.

Minishaker, vortex.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Přenosná UV lampa.

Digestoř.

pHmetr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2 – 2,5) ml.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Nízkoobjemový spektrofotometr, vlnové délky (230; 260; 280) nm.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

pHmetr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2 – 2,5) ml.

Elektroforetická vana, zdroj napětí, elektroforetické hřebínky.

Fotodokumentační zařízení se software.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

PCR reakce – amplifikace

PCR box.

Minishaker, vortex.

Termální cykler.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l a sterilní špičky s filtrem i bez filtru.

Plastové sterilní zkumavky, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.

Výrobník ledu.

Lednice.

Mrazicí box.

Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby,

nádoba na uchování ledu.

4.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

Extrakce DNA: NucleoSpin[®] Food, výrobce Macherey – Nagel, kit pro izolaci genomické DNA z potravin a krmiv.

Lysis Buffer CF.

Buffer C4.

Wash buffer CQW.

Wash buffer C5 (koncentrát).

Elution buffer CE.

NucleoSpin[®] Food Columns (plus Collection Tubes).

Proteinase K (lyofilizát).

Proteinase buffer PB.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Agaróza pro molekulární biologii.

Pracovní roztok 1 × TAE pro elektroforézu.

1% Pracovní roztok interkalačního barviva (ethidium bromid).

EZ Load Precision Molecular Mass Standard, BIO-RAD.

6 × Loading Dye Solution.

Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. EZ LoadTM Molecular Ruler 50 bp PCR Biorad).

Ribonuklease A 10 mg/ml (DNase and protease free).

PCR reakce – amplifikace

REDTaq[®] ReadyMixTM PCR Reaction Mix with MgCl₂, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDTaq).

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.

PCR voda.

Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů.

Voda vhodná pro PCR.

Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.

Amplifikační primery:

Pro analýzy byly použity amplifikační primery od firmy Generi-Biotech:

VG bavlna (Alkohol dehydrogenáza C): KVM157/KVM158

F: CAC ATG ACT TAG CCC ATC TTT GC

R: CCC ACC CTT TTT TGG TTT AGC

bar: RapB-F1/RapB-R1

F: ACA AGC ACG GTC AAC TTC C

R: GAG GTC GTC CGT CCA CTC

MON88701: MON88701 primer 1/MON88701 primer 2

F: CAT ACT CAT TGC TGA TCC ATG TAG A

R: AGT GTT AAA CAA GTT ATG TTC TAG AGC

4.3 Pracovní postup

Pro zavádění byly použity postupy JPP 10252.1 Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR-kit Nucleospin Food, JPP 10255.1 Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO, JPP 10257.1 Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR a JPP 10259.1 Vyhodnocení výsledků stanovení GMO metodou PCR.

Tabulka č. 1. Složení reakční směsi pro PCR pomocí kitu REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (jednoduchá PCR), vnitřní gen kukuřice, bar i MON88701.

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			6,5
RedTaq PCR MIX	2 ×	1 ×	12,5
Primer F	20 μM	0,4 μM	0,5
Primer R	20 μM	0,4 μM	0,5
Templátová DNA	10 ng/μl	50 ng	5
Objem směsi vč. templátu			25

Vnitřní gen bavlny (Alkohol dehydrogenáza C)

Primery: KVM157/KVM158

Délka amplikonu: 73 bp

Tabulka č. 2. Amplifikační program.

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
UNG	50	120	1
Denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing a extenze	60	60	

bar gen

primery: RapB-F1/RapB-R1

délka amplikonu: 60 bp

Tabulka č. 3. Amplifikační program.

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	900	1
Denaturace	95	10	45
Annealing a extenze	60	15	

MON 88701

primery: MON88701 primer 1/MON88701 primer 2

délka amplikonu: 84 bp

Tabulka č. 4. Amplifikační program.

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing a extenze	60	60	

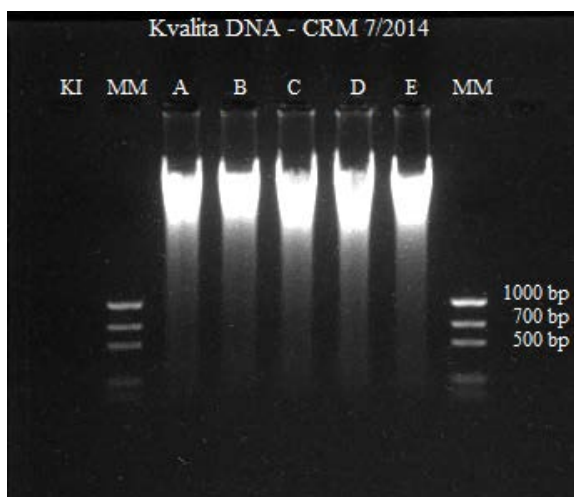
5 Výsledky a diskuse

Kvalita DNA

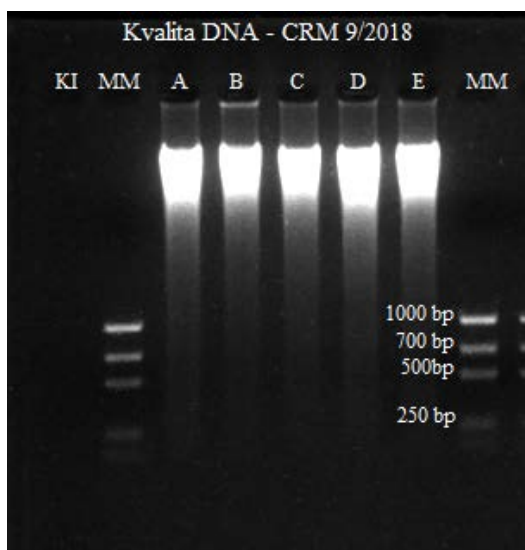
Pro zavádění, byla vyextrahována DNA z CRM GM negativní bavlny (CRM 17/2014) a z CRM bavlny MON88701 (CRM 9/2018). U všech izolátů byla změřena koncentrace (tabulka č. 5), otestována kvalita i amplifikovatelnost DNA (obrázky č. 1, 2).

Tabulka č. 5. CRM 17/2014 a CRM 9/2018 – hodnoty naměřených koncentrací a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.

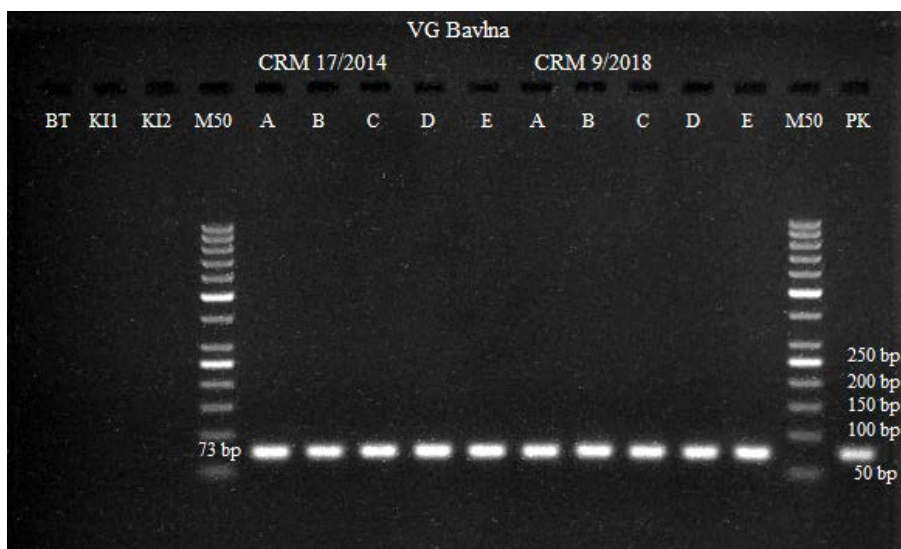
CRM		Koncentrace ng/μl	A 260/A 280	A 260/230
Bavlna CRM 17/2014	A	335,4	1,86	1,79
	B	278,9	1,85	1,81
	C	500,9	1,84	1,93
	D	352,0	1,88	2,17
	E	593,4	1,86	1,82
Bavlna CRM 9/2018 MON 88701 > 98,45 % GM	A	187,6	1,90	2,20
	B	196,8	1,89	2,11
	C	172,6	1,89	2,23
	D	166,9	1,88	2,15
	E	157,3	1,88	2,16



Obr. č. 1. Kvalita izolátů DNA, CRM 7/2014 izoláty A, B, C, D, E. MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.



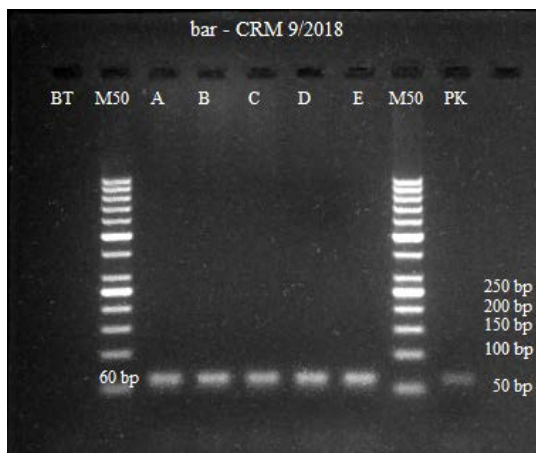
Obr. č. 2. Kvalita izolátů DNA, CRM 9/2018, izoláty A, B, C, D, E. MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.



Obr. č. 3. Vnitřní gen bavlna (73bp) - CRM 7/2014 a 9/2018, izoláty A, B, C, D, E. M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI1, KI2 – kontrola izolace, PK-CRM 27/2012.

Screening

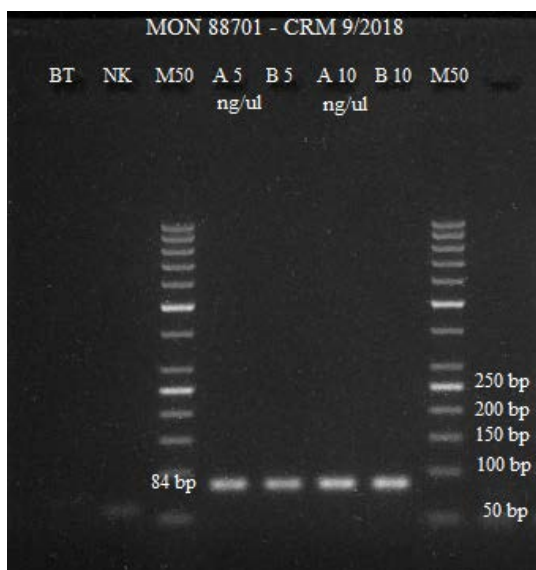
Byl stanoven screeningový element bar s pozitivním výsledkem (obrázek č. 4)



Obr. 4. Screening bar (60 bp), CRM 9/2018 (A, B, C, D, E), M50 – hmotnostní marker 50 bp, BT–beztemplátová kontrola, PK-CRM 2/2008.

Správnost stanovení MON 88701

Byl stanoven MON 88701 z izolátů (A, B) CRM 9/2018 s koncentrací DNA 5ng/μl a s koncentrací DNA 10 ng/μl. Zkoušky byly pozitivní. (obrázek č. 5)



Obr. č. 5. Stanovení MON88701 (84 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 17/2014, M50-marker 50 bp, CRM 9/2018: Izoláty A, B v koncentracích 5 ng DNA/ul a 10 ng DNA/ul.

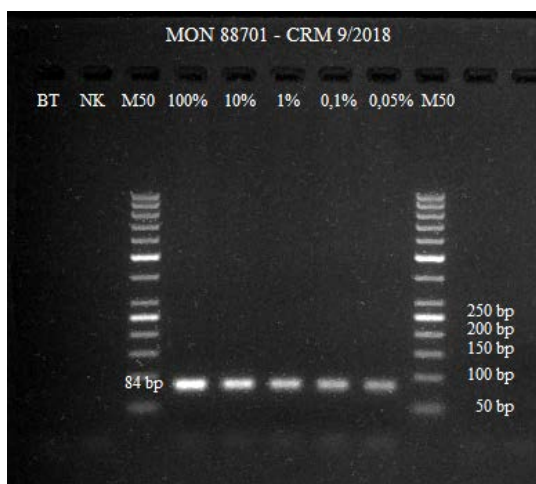
Mez detekce stanovení MON 88701

Mez detekce byla stanovena metodou ředící řady s použitím izolátu nemodifikované genomické DNA bavlny (CRM 17/2014). Nejprve byla otestována ředící řada 100 % - 0,05 % GM. (Obrázek č. 6.) Následně byly provedeny amplifikace izolátu CRM 9/2018 o obsahu modifikace 1 %; 0,1 % a 0,05 %.

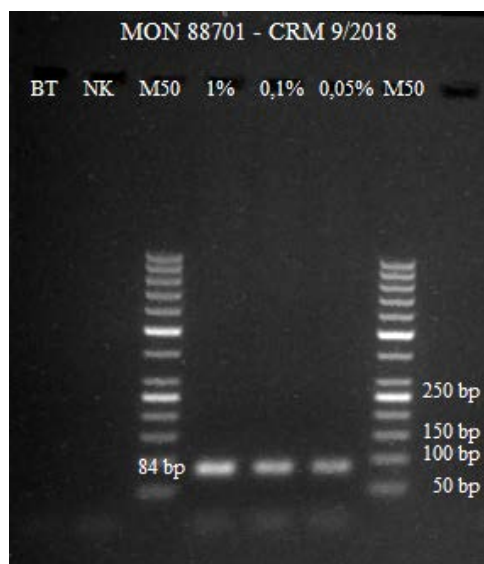
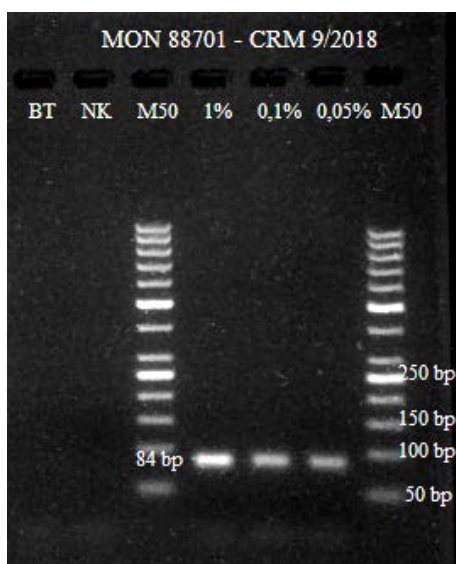
K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních (obrázky č. 7–10).

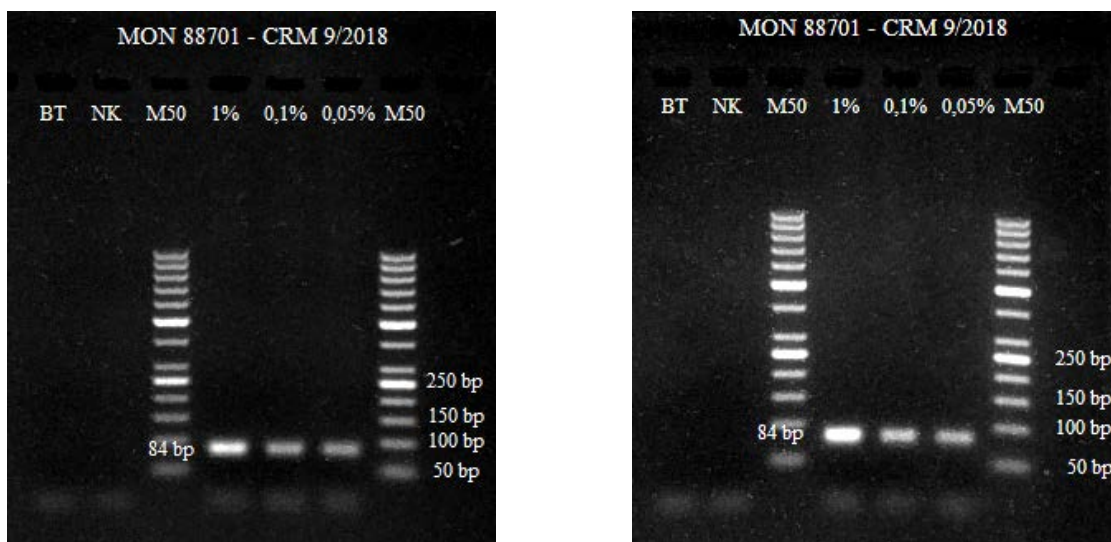
Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace MON 87427 lze detekovat na hladině 0,05 %.

Mez detekce se ověřila provedením pěti nezávislých PCR (amplifikací) zaváděné modifikace.



Obr. č. 6. Stanovení MD transgenu MON88701 (84 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 17/2014, M50-marker 50 bp. CRM 9/2018: 100 (> 98,45) %; 10 %; 1 %; 0,1 %; 0,05 %. Amplifikační kit REDTaq. PCR proběhla do koncentrace 0,05 %.





Obr. č. 7-10. Stanovení MD transgenu MON88701 (84 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 17/2014, M50-marker 50 bp. CRM 9/2018: 1 %; 0,1 %; 0,05 %. Amplifikační kit REDTaq. PCR proběhla do koncentrace 0,05 %.

Během verifikace se postupovalo podle metody JPP (postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1) a metody validované EURL. Zachovaly se jednotlivé objemy a složky PCR reakce, sekvence primerů i amplifikační programy.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaný certifikovaný referenční materiál vykazuje pruh v příslušném místě.

Detekovatelnost pruhů DNA je závislá zejména na koncentraci templátové DNA, kvalitě templátové DNA (závisí na způsobu izolace, skladování apod.), kvalitě amplifikačních primerů, kvalitě gelu, použitém interkalačním barvivu a provedení elektroforézy.

6 Závěr

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci nové genetické modifikace bavlny MON 88701 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OMB.

Metoda stanovení kukuřice MON 88701 byla zavedena s mezí detekce 0,05 % GM.

Tato metoda se zařadí jako další parametr při zkoušení přítomnosti genetických modifikací ve vzorcích krmiv a osiv.

7 Literatura

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1.
2. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2011.
3. Event-Specific Method for the Quantification of Cotton MON 88701 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2016.

Zavedení kvalitativní detekce transgenu VCO-01981-5 u kukuřice

Jana Stehlíková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdMB Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
jana.sehlikova@ukzuz.cz

1 Úvod

VCO-01981-5 je geneticky modifikovaná kukuřice, jejíž DNA byla modifikována pomocí syntetického genu, podobnému genu *epsps grg23* z půdní bakterie *Arthrobacter globiformis*. Produktem je protein 5-enolpyruvylshikimat-3-fosfátsyntáza (EPSPS) nebo EPSPS ACE5 protein. Výsledkem je tolerance ke glyfosátovým herbicidům.

2 Cíl

Cílem práce bylo rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u kukuřice o kvalitativní stanovení VCO-01981-5 a určení meze detekce stanovení.

3 Princip

Základem metody detekce genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce, dále PCR. Jedná se o běžně používanou metodu, při které dochází k mnohonásobnému zmnožení konkrétního požadovaného úseku DNA. V tomto případě se jedná o klasickou PCR s elektroforetickou detekcí amplikonu na agarózovém gelu.

4 Materiál a metody

Pro zavedení byly použity certifikované referenční materiály (CRM) od IRMM Institute for reference Material and Measurements (IRMM).

ERM® - BF438a: VCO – 01981-5 maize (< 0,006 % GM), laboratorní značení: CRM 6/2018

ERM® - BF438c: VCO – 01981-5 maize (0,1 % GM), laboratorní značení: CRM 7/2018

ERM® - BF438d: VCO – 01981-5 maize (1 % GM), laboratorní značení: CRM 8/2018

Izolace byla provedena pomocí zavedeného komerčního kitu (NucleoSpin® Food – MACHEREY-NAGEL). U izolátů DNA byla změřena koncentrace, byly otestovány na kvalitu i amplifikovatelnost DNA.

4.1 Přístroje a pomůcky

Extrakce DNA

Váhy s přesností 0,01 g.

Vodní lázeň nebo termoblok, přednostně s vibrací, třepáním.

Centrifuga.

Minishaker, vortex.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Přenosná UV lampa.

Digestoř.

pHmetr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2 – 2,5) ml.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Nízkoobjemový spektrofotometr, vlnové délky (230; 260; 280) nm.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

pHmetr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2 – 2,5) ml.

Elektroforetická vana, zdroj napětí, elektroforetické hřebínky.

Fotodokumentační zařízení se softwarem.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

PCR reakce – amplifikace

PCR box.

Minishaker, vortex.

Termální cykler.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky s filtrem i bez filtru.

Plastové sterilní zkumavky, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.

Výrobník ledu.

Lednice.

Mrazicí box.

Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování ledu.

4.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

Extrakce DNA: NucleoSpin® Food, výrobce Macherey – Nagel, kit pro izolaci genomické DNA z potravin a krmiv.

Lysis Buffer CF.

Buffer C4.

Wash buffer CQW.

Wash buffer C5 (koncentrát).

Elution buffer CE.

NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).

Proteinase K (lyofilizát).

Proteinase buffer PB.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Agaróza pro molekulární biologii.

Pracovní roztok 1 × TAE pro elektroforézu.

1% Pracovní roztok interkalačního barviva (ethidium bromid).

EZ Load Precision Molecular Mass Standard, BIO-RAD.

6 × Loading Dye Solution.

Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. EZ Load™ Molecular Ruler 50 bp PCR Biorad).

Ribonuklease A 10 mg/ml (DNase and protease free).

PCR reakce – amplifikace

REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl₂, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDTaq).

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.

PCR voda.

Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů .

Voda vhodná pro PCR.

Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.

Amplifikační primery:

Pro analýzy byly použity amplifikační primery od firmy Generi-Biotech.

VG kukuřice: IVRI-F / IVRI-R

F: CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC

R: GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C

VCO-01981-5: VCO-1981-5 primer F / VCO-1981-5 primer R

F: CCA CTG AAC GTC ACC AAG AAG A

R: GCC GCT ACT CGA GGG ATT TA

4.3 Pracovní postup

Pro zavádění byly použity postupy JPP 10252.1 Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR-kit Nucleospin Food, JPP 10255.1 Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO, JPP 10257.1 Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR a JPP 10259.1 Vyhodnocení výsledků stanovení GMO metodou PCR.

Tabulka 1. Složení reakční směsi pro PCR pomocí kitu REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (jednoduchá PCR), vnitřní gen kukuřice i VCO-01981-5.

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			6,5
RedTaq PCR MIX	2 ×	1 ×	12,5
Primer F	20 μM	0,4 μM	0,5
Primer R	20 μM	0,4 μM	0,5
Templátová DNA	10 ng/μl	50 ng	5
Objem směsi vč. templátu			25

Vnitřní gen kukuřice (škrobová invertáza)

primery: IVRI-F / IVRI-R

délka amplikonu: 225 bp

Tabulka č. 2. Amplifikační program.

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	50	35
Annealing	68	110	
Extenze	72	120	
Závěrečná extenze	72	300	1

VCO-01981-5

primery: VCO-1981-5 primer F / VCO-1981-5 primer R

délka amplikonu: 85bp

Tabulka č. 3. Amplifikační program.

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing a extenze	60	60	

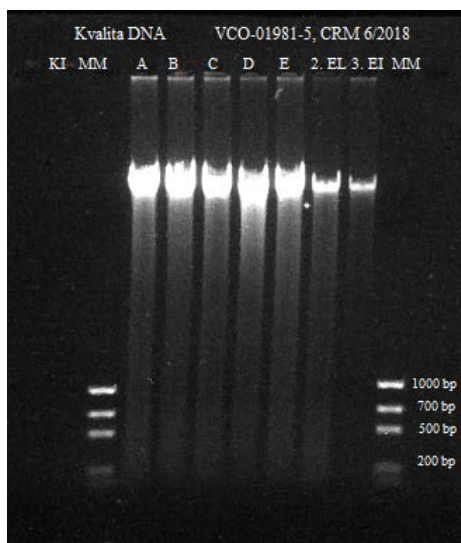
5 Výsledky a diskuse

Kvalita DNA

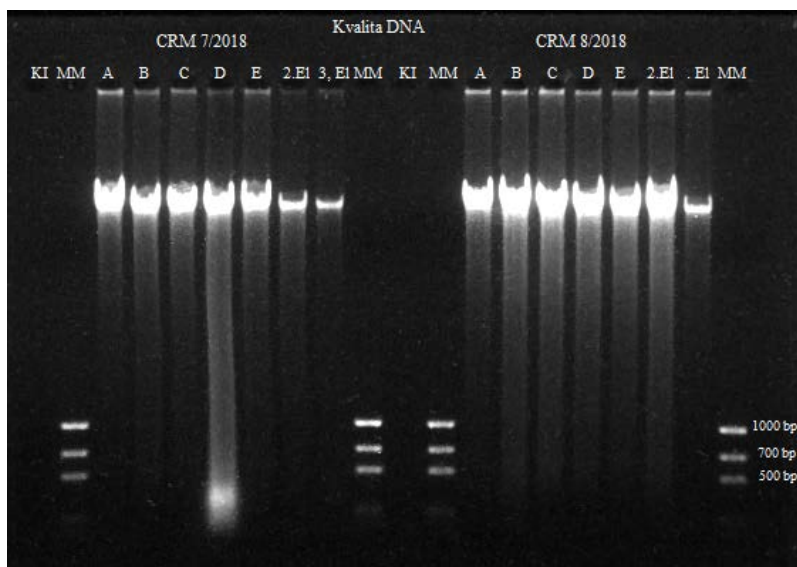
Pro zavádění byla extrahována DNA z CRM GM negativní kukuřice (CRM 6/2018) a z CRM kukuřice VCO-01981-5 (CRM 7/2018, CRM 8/2018). U všech izolátů byla změřena koncentrace (tabulka č. 4), otestována kvalita i amplifikovatelnost DNA (obrázky č. 1, 2, 3, 4, 5).

Tabulka č.4. CRM 14/2016, CRM 13/2016 a CRM 16/2016 – hodnoty naměřených koncentrací a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.

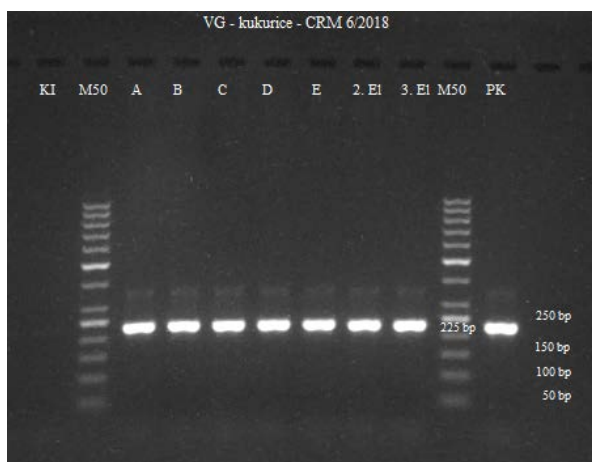
CRM		Koncentrace ng/μl	A 260/A 280	A 260/230
Kukuřice CRM 6/2018	A	94,8	1,86	2,25
	B	103,2	1,85	2,25
	C	84,4	1,86	2,25
	D	107,3	1,87	2,23
	E	92,3	1,85	2,21
Kukuřice CRM 7/2018 VCO-01981-5 0,1 % GM	A	74,4	1,89	2,23
	B	67,9	1,88	2,20
	C	67,4	1,88	2,25
	D	191,1	1,95	2,00
	E	62,1	1,87	2,14
Kukuřice CRM 8/2018 VCO-01981-5 1 % GM	A	67,2	1,83	2,15
	B	106,1	1,86	2,18
	C	95,3	1,86	2,18
	D	95,2	1,88	2,24
	E	81,7	1,85	2,22



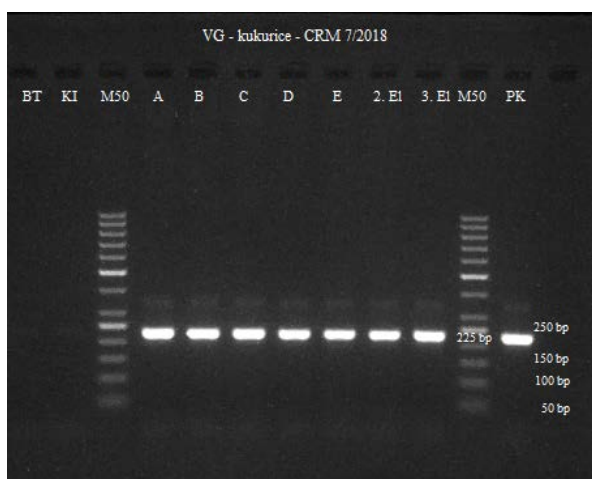
Obr. č. 1. Kvalita izolátů DNA, CRM 6/2018 izoláty A, B, C, D, E, směs z 2. a 3. eluce. MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.



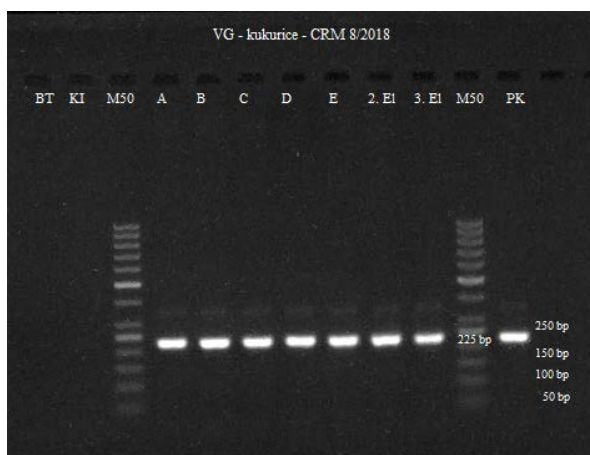
Obr. č. 2. Kvalita izolátů DNA, CRM 7/2018 a CRM 8/2018, izoláty A, B, C, D, E, směs z 2. a 3. eluce. MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.



Obr. č. 3. Vnitřní gen kukuřice (225bp) - CRM 6/2018, izoláty A, B, C, D, E, směs z 2. a 3. eluce, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-CRM 15/2014.



Obr. č. 4. Vnitřní gen kukuřice (225bp) - CRM 7/2018, izoláty A, B, C, D, E, směs z 2. a 3. eluce, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-CRM 15/2014.



Obr. č. 5. Vnitřní gen kukuřice (225bp) - CRM 8/2018, izoláty A, B, C, D, E, směs z 2. a 3. eluce, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-CRM 15/2014.

Správnost stanovení VCO-01981-5

Bylo provedeno stanovení VCO-01981-5 z izolátů (A, B) CRM 7/2018 a CRM 8/2018 s koncentrací DNA 5ng/μl a s koncentrací DNA 10 ng/μl. Zkoušky byly pozitivní. (obrázek č. 6)



Obr. č. 6. Stanovení VCO-01981-5 (85 bp), BT – beztemplátová kontrola, M50-marker 50 bp, CRM 7 a 8/2018: Izoláty A, B v koncentracích 5 ng DNA/ul a 10 ng DNA/ul.

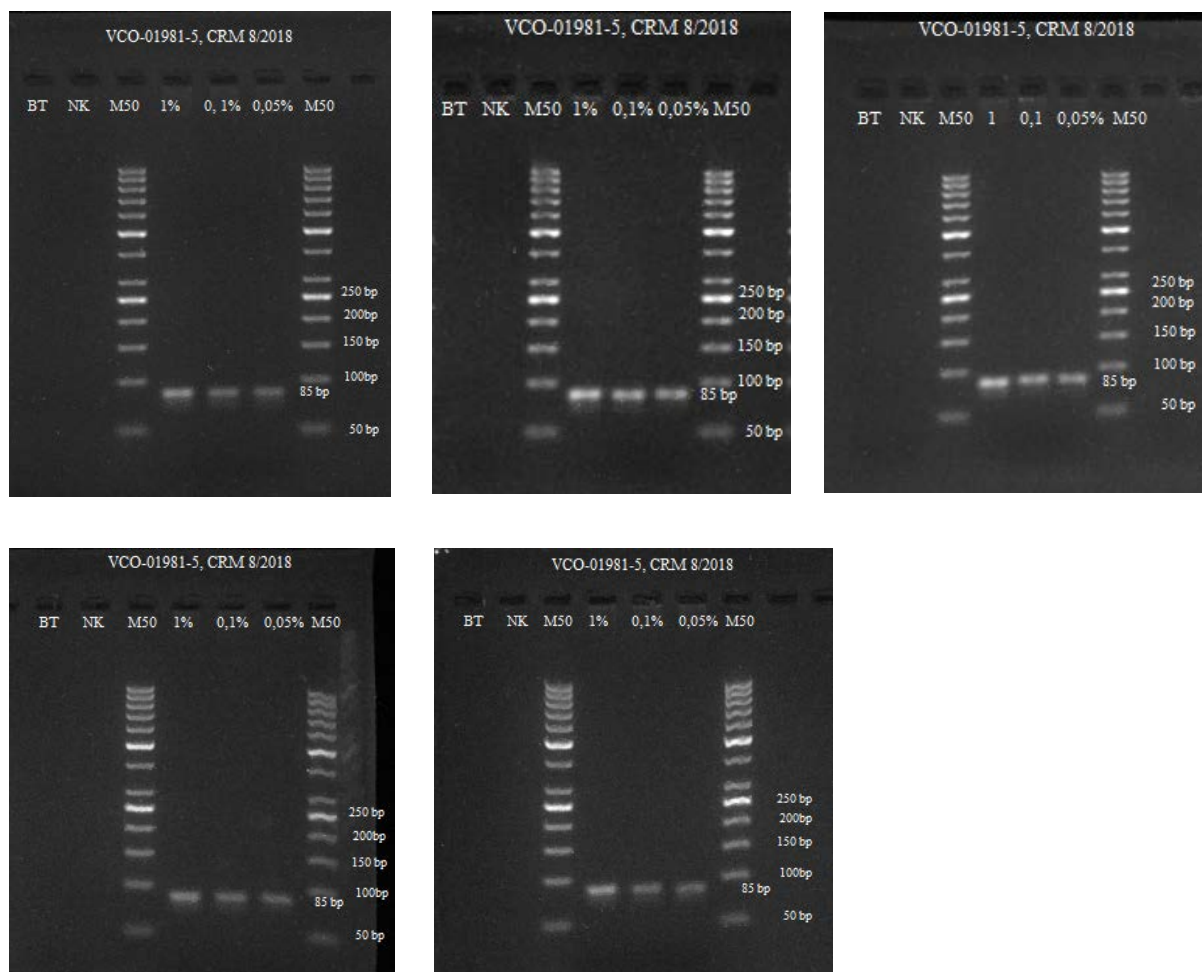
Mez detekce stanovení VCO-01981-5

Mez detekce byla stanovena metodou ředící řady s použitím izolátu nemodifikované genomické DNA kukuřice (CRM 6/2016). Byla provedena amplifikace izolátu CRM 8/2018 o obsahu modifikace 1 %, 0,1 % a 0,05 %.

K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních. (obrázky č. 7 až 11).

Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace VCO-1981-5 lze detekovat na hladině 0,05 %.

Mez detekce se ověřila provedením pěti nezávislých PCR (amplifikací) zaváděné modifikace.



Obr. č. 7 až 11. Stanovení MD transgenů VCO-01981-5 (85 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 6/2018, M50-marker 50 bp. CRM 8/2018: 1 %; 0,1 %; 0,05 %. Amplifikační kit REDTaq. PCR proběhla do koncentrace 0,05 %.

Během verifikace se postupovalo podle metody JPP (postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1) a metody validované EURL. Zachovaly se jednotlivé objemy a složky PCR reakce, sekvence primerů i amplifikační programy.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaný certifikovaný referenční materiál vykazuje pruh v příslušném místě.

Detekovatelnost pruhů DNA je závislá zejména na koncentraci templátové DNA, kvalitě templátové DNA (závisí na způsobu izolace, skladování apod.), kvalitě amplifikačních primerů, kvalitě gelu, použitém interkalačním barvivu a provedení elektroforézy.

6 Závěr

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci nové genetické modifikace kukuřice VCO-01981-5 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OMB.

Metoda stanovení kukuřice VCO-01981-5 byla zavedena s mezí detekce 0,05 % GM.

Tato metoda se zařadí jako další parametr při zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv a osiv.

7 Literatura

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1.
2. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2011.
3. Event-Specific Method for the Quantification of Maize VCO-01981-5 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2017.

Zavedení metody pro identifikaci odrůd ječmene pomocí SSR markerů

Jitka Klempová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdMB Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

jitka.klempova@ukzuz.cz

1 Úvod

Práce vychází z požadavku Národního odrůdového úřadu na zavedení podpůrné metody pro určení odrůdové pravosti, kontroly osiva/sadby a tvorby databází genetických profilů (pre-screening odrůd pro DUS). Genotypizace založená na analýze mikrosatelitních (SSR) markerů je hojně využívaná technika, která je pro svoji vysokou rozlišovací schopnost vhodným nástrojem k rychlé a efektivní kontrole rostlinného materiálu, včetně identifikace odrůd.

Mikrosatelitní oblasti jsou přítomné u většiny rostlinných genomů a obsahují repetitivní motivy DNA sekvencí o délce 1 až 6 bp. Jejich celková délka obvykle nepřesahuje 100 bp a jsou součástí nekódujících sekvencí genomu, které se podílejí na regulaci genové exprese. Vzhledem k jejich struktuře často podléhají mutacím, kdy především kvůli replikačním chybám DNA polymerázy dochází k vynechání nebo přidání jednotky repetitivního motivu, a vykazují vysoký stupeň polymorfismu. Navíc se vyznačují kodominantním charakterem dědičnosti, širokým zastoupením v genomu a druhovou specifitou.

Při výběru markerů vhodných k charakterizaci odrůd ječmene se vycházelo z odborné literatury. Sekvence příslušných primerů jsou dostupné ve veřejných databázích. Zavádění analytických postupů vycházelo ze stávajících JPP a z pravidel a doporučení Mezinárodní asociace pro zkoušení osiv (ISTA). Slabinou metody je absence referenčního materiálu, případně databáze umožňující porovnání výsledných alelických profilů testovaných vzorků.

2 Materiál a metody

2.1 Přístrojové a technické vybavení

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l.

Analytické váhy.

Centrifuga na destičky.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Fotofokumentační zařízení.

Fragmentový analyzátor Fragment Analyzer (Advanced Analytical).

Horkovzdušná sušárna.

Chladnička.

Chlazená centrifuga (14000 ot/min).

Mikroobjemový UV-VIS spektrofotometr.

Minicentrifuga.

Mraznička.

PCR box.

PCR destičky, samolepicí folie.

Plastové zkumavky (0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml, 50 ml, 250 ml).

Rotorový rychlomlýnek Pulverisette 14 (Fritsch).

Sterilní špičky s filtrem, bez filtru.

Termocyklér C1000 Touch TM Thermal Cycller (Bio-Rad).

UV lampa.

Vodní lázeň.

Vortex.

Výrobník ledu.

Laboratorní sklo, plastik, ochranné rukavice

Zařízení na horizontální elektroforézu, zdroj napětí

2.2 Chemikálie

Reagencie pro izolaci DNA

DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen).

Ethanol pro spektroskopii (Uvasol).

Reagencie pro elektroforézu

Trizma base (Sigma).

Kyselina octová 99,8% p.a. (Lach-Ner).

Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Na₂EDTA (Sigma).

Agaróza (Sigma).

Ethidium bromid (Merck).

6× DNA Loading Dye (Fermentas).

EZ Load[™] Precision Molecular Mass Ruler (Biorad).

GeneRuler[™] 50 bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas).

Reagencie pro PCR

Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen).

Složení kitu: 2 × Type-it Multiplex PCR Master Mix, 5× Q-Solution, RNase-Free voda.

Amplifikační primery 100μM (Generi Biotech).

PCR voda.

Reagencie pro fragmentační analýzu

DNF-900 dsDNA Reagent Kit, 35 bp – 500 bp (Advanced Analytical).

Složení kitu: FA dsDNA Gel, 35 bp – 500 bp, Interkalační barvivo, 5 × 930 dsDNA Inlet Buffer, 5 × Capillary Conditioning Solution, ředící 1 × TE pufr, 35 bp a 500 bp Markery, (75 – 400) bp Range DNA Ladder, Minerální olej.

Capillary Storage Buffer (Advanced Analytical).

2.3 Testovaný materiál

V rámci zavedení metodiky bylo testováno 21 vzorků ječmene, jejichž bližší specifikace jsou uvedeny v Tabulce 1. Jednalo se o 10 jarních a 11 ozimých v ČR registrovaných odrůd českého i světového sortimentu.

2.4 Pracovní postup

Analytické postupy zahrnující homogenizaci osiva, extrakci DNA, kontrolu kvantity a kvality DNA, amplifikaci SSR markerů a fragmentační analýzu PCR produktů, se provádějí za podmínek uvedených v JPP č. 60075.1 Úprava a homogenizace vzorků osiv pro extrakci DNA, JPP č. 10700.1 Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini), JPP č. 10250.2 Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR a JPP č. 10258.1 Kapilární elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR.

21 SSR markerů (Tabulka 2) vhodných k identifikaci odrůd ječmene bylo převzato z odborné literatury (Perry et al. (2014); Korff et al. (2004), Leišová et al. (2007)). Nukleotidové sekvence primerů (Tabulka 3) pro testovanou sadu markerů byly ověřeny v databázi GenBank. Pro amplifikaci cílových sekvencí byl použit komerční kit Type-it Microsatellite PCR (Qiagen), který je přímo určen pro genotypové analýzy probíhající v multiplexu. V případě multiplex PCR se připraví 10 × primer mixy obsahující 1 μM až 4 μM příslušných primerů (Tabulka 4). Veškerá ředění se provádějí vodou pro PCR, není-li uvedeno jinak.

Reakční směs pro vlastní PCR obsahuje mastermix a templátovou DNA. Složení mastermixu je uvedeno v Tabulkách 5 (singleplex) a 6 (multiplex). Jednotlivé komponenty se pipetují v pořadí, ve kterém jsou uvedeny v tabulce, směs se promíchá jemným propipetováním, krátce stočí na minicentrifuze a rozalivkuje po 7,5 μl (8,25 μl pro reakce v multiplexu) do označených PCR zkumavek. Následně se do reakce přidává 5 μl templátové DNA, (v případě beztemplátové kontroly a kontroly prostředí 5 μl vody), celkový reakční objem činí 12,5 μl (13,25 μl pro reakce v multiplexu). Reakční podmínky jsou optimalizovány na C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad). Teplotní profily a jednotlivé kroky PCR jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 1. Seznam vzorků testovaných v rámci metodiky.

Číslo	Plodina	Odrůda	Kód	Specifikace
1	Ječmen jarní	Chain	5093450	podobné
2	Ječmen jarní	STRG 774/11	5090811	
3	Ječmen jarní	SG-S 419	5090793	stejný původ
4	Ječmen jarní	SG-S 431	5090794	
5	Ječmen jarní	RP13031	5095128	stejný původ
6	Ječmen jarní	RP14033	5095129	
7	Ječmen jarní	Odyssey	5086483	příbuzné
8	Ječmen jarní	Octavia	5093104	
9	Ječmen jarní	AF Cesar	5082338	odlišné
10	Ječmen jarní	KWS Asta	5086619	
11	Ječmen ozimý	AC 08/290/26	5092695	podobné
12	Ječmen ozimý	KWS Salsa	5092567	
13	Ječmen ozimý	KW 2-430	5094745	stejný původ
14	Ječmen ozimý	KW 2-431	5094746	
15	Ječmen ozimý	Colonia	5085993	odlišné
16	Ječmen ozimý	Paso	5085979	
17	Ječmen ozimý	Wootan	5088337	hybrid
18	Ječmen ozimý	F1F069	5088502	linie
19	Ječmen ozimý	FM0471	5088503	linie
20	Ječmen ozimý	RE18	5086340	linie
21	Ječmen ozimý	Leibniz	5081734	linie

Tabulka 2. Seznam 21 mikrosatelitních markerů (chromozomální lokalizace, nukleotidový motiv, předpokládané délkové rozmezí alel, počet detekovaných alel).

Marker	Chromozom	Motiv repeticce	Délka produktu (bp)	Počet alel	Zdroj *
Bmag0005	5H	(AG) ₁₅	166-172	3	a
Bmag0120	7H	(AG) ₁₅	222-256	3	a
Bmag0223	5H	(AG) ₁₆	145-173	9	a
Bmag0225	3H	(AG) ₂₆	137-158	4	a
Bmag0382	1H	(AG) ₇ AA(AG) ₇	94-109	3	a
Bmag0692	2H	(CT) ₁₉	160-176	3	a
EBmac0415	2H	(AC) ₁₇	221-243	3	a
EBmac0501	1H	(AC) ₁₃	141-151	4	a
EBmac0635	4H	(AC) ₂₃	108-114	3	a
HvWaxy	7H	(GCAT) ₄	190-196	4	a
EBmac0624	6H	(GT) _{6/7}	104-121	3	b
MGB371	6H	(TG) ₆	128-136	4	b
MGB318	7(5H)	(CTG) ₆	148-164	2	b
MGB357	7(5H)	(CCG) ₈	236-248	2	b
HVM40	4H	(GA) ₆ (GT) ₄ (GA) ₇	135-149	3	c
HVM74	6H	(GA) ₁₃	178-221	4	c
Bmag0500	6H	(AG) _n CG(AG) ₂ (AGAGGG) ₃ (AG) _n	68-181	6	c
Bmag0496	6H	(CT) ₂₀	180-192	4	c
HVM36	2H	(GA) ₁₃	112-123	3	c
BMS90	1H	(AC) ₂₀	212-220	3	c
BMS32	1H	(AC) ₇ T(CA) ₁₅ (AT) ₉	214-223	3	c

*a – Perry et al. (2014): Simple sequence repeat-based identification of Canadian malting barley varieties; b – Korff et al. (2004): Insertion of 18 new SSR markers into the Oregon Wolfe Barley map; c – Leišová et al. (2007): Genetic resources of barley and oat characterised by microsatellites.

Separace a detekce získaných PCR produktů se provádí metodou kapilární elektroforézy. Vzorky se separují ve 12 kapilárovém fragmentačním analyzátoru od firmy Advanced Analytical (experimentální protokol DNF-900-55 – DNA 35-500bp.mthds), následně se vyhodnocují prostřednictvím programu PROSize™ 3.0 Analytical Software. Pro kvalitativní analýzu dsDNA fragmentů o velikosti 35 bp až 500 bp se využívá komerční soupravy DNF-900 dsDNA Reagent Kit, 35 bp až 500 bp. Vzorky se před fragmentační analýzou šestkrát ředí 1× TE puforem, který je součástí kitu, přičemž celkový objem musí být minimálně 30 µl (25 µl 1× TE + 5 µl PCR produkt). Produkty MPBmag + Bmag0382 a MPEBmac + Bmag0005 se separují společně, pipetuje se tedy 20 µl 1× TE + 5 µl PCR produkt 1 + 5 µl PCR produkt 2. Analýzou surových dat se získají údaje o velikosti (bp) separovaných dsDNA fragmentů. Data jsou standardizována na dolní (LM, 35 bp) a horní (UM, 500 bp) kvalitativní marker, DNA Ladder o rozsahu 75bp až 400 bp slouží jako hmotnostní standard (Obrázek 1) a je analyzován paralelně se vzorky. Pro správné sestavení kalibrační křivky musí být detekováno všech 9 píků DNA Ladderu. V každém běhu (včetně beztemplátové kontroly PCR) musí být detekován rozeznatelný pík pro LM a UM.

Primární data se dále převádějí do binární matice a statisticky se zpracovávají pro určení genetické podobnosti (GS) mezi jednotlivými odrůdami. Na základě přítomnosti (1) či nepřítomnosti (0) alely se pro každý vzorek sestaví alelický profil (reprezentovaný binární maticí) pro všechny SSR markery. Maticový soubor se vyhodnotí ve statistickém programu PAST (Paleontological Statistics) ver. 3.17 stanovením koeficientu podobnosti podle Jaccarda. Informaci o vzájemné genetické odlišnosti (GD) lze získat jednoduchou transformací $GD = 1 - GS$. Vizualizace výsledných dat (genetických podobností) sestavením dendrogramu se provádí metodu párování pomocí nevážených aritmetických průměrů (UPGMA).

Tabulka 3. Nukleotidové sekvence specifických primerů pro amplifikaci SSR markerů a referenčního genu (RG); teplotní profily a příslušný multiplex/singleplex pro PCR.

Marker	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	PCR	Set
Bmag0005	TCCATGATGATGTGTGCATAGA	CGGATCCCAACAAACACAC	TP1	-
Bmag0120	ATTTTCATCCCAAAGGAGAC	GTCACATAGACAGTTGTCTTCC	TP7	1
Bmag0223	TTAGTCACCCTCAACGGT	CCCCTAACTGCTGTGATG	TP6	-
Bmag0225	AACACACCAAAAATATTACATCA	CGAGTAGTTCCCATGTGAC	TP8	4
Bmag0382	TGAAACCCATAGAGAGTGAGA	TCAAAAAGTTTCGTTCCAAATA	TP4	-
Bmag0692	GCAAGGTATCTCTTGTATTTTG	TGGCATCTACAATCTAAAACA	TP7	1
EBmac0415	GAAACCCATCATAGCAGC	AAACAGCAGCAAGAGGAG	TP4	2
EBmac0501	ACTTAAGTGCCATGCAAAG	AGGGACAAAAATGGCTAAG	TP4	2
EBmac0635	TGCTGCGATGATGAGAACT	TAGGGTAGATCCGTCCTATG	TP4	2
HvWaxy	AAGACGTGGTGTTCGTGTG	CAGATGGTTCCAGGGGTAAGTTC	TP8	3
EBmac0624	AAAAGCATTCAACTTCATAAGA	CAACGCCATCACGTAATA	TP8	4
MGB371	TTATTCAGGCAGCACCATTG	CACCAAGTTCACCTCGTCCT	TP8	3
MGB318	CGGCTCAAGGTCTCTTCTTC	TATCTCAGATGCCCTTTCC	TP8	5
MGB357	GCTCCAGGGCTCCTCTTC	AGCTCTCTCTGCACGTCCTT	TP8	5
HVM40	CGATTCCCCTTTTCCCAC	ATTCTCCGCCGTCCACTC	TP7	6
HVM74	AGGAAGTCATTGCGTGAG	TGATCAAGAATGATAACATGG	TP7	6
Bmag0500	GGGAACCTGCTAATGAAGAG	AATGTAAGGGAGTGCCATAG	TP7	8
Bmag0496	AGTATAACCAACAGCCGTCTA	CTATAGCACGCCTTTGAGA	TP7	7
HVM36	TCCAGCCGAACAATTTCTTG	AGTACTCCGACACCACGTCC	TP7	6
BMS90	ACATCAACCCTCCTGCTC	CCGCACATAGTGGTTACATC	TP7	7
BMS32	CCATCAAAGTCCGGCTAG	GTCGGGCCTCATACTGAC	TP7	8
<i>Referenční gen</i>				
trnL(UAA)	CGAAATCGGTAGACGCTACG	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	TP2	-

Tabulka 4. Příprava 10× primer mixů pro multiplex PCR (100 µl).

Zásobní primer 100µM	Objem (µl)	Finální koncentrace (µM)	Zásobní primer 100µM	Objem (µl)	Finální koncentrace (µM)
<i>10 × MPBmag (1) primer mix</i>			<i>10 × MPMGB (5) primer mix</i>		
PCR voda	92	-	PCR voda	92	-
F Bmag0120	2	2	F MGB318	2	2
R Bmag0120	2	2	R MGB318	2	2
F Bmag0692	2	2	F MGB357	2	2
R Bmag0692	2	2	R MGB357	2	2
<i>10 × MPEBmac (2) primer mix</i>			<i>10 × MPHVM (6) primer mix</i>		
PCR voda	80	-	PCR voda	90	-
F EBmac0415	2	2	F HVM36	1,25	1,25
R EBmac0415	2	2	R HVM36	1,25	1,25
F EBmac0501	4	4	F HVM40	1,67	1,67
R EBmac0501	4	4	R HVM40	1,67	1,67
F EBmac0635	4	4	F HVM74	2,1	2,1
R EBmac0635	4	4	R HVM74	2,1	2,1
<i>10 × MPMGBHv (3) primer mix</i>			<i>10 × MPY (7) primer mix</i>		
PCR voda	95	-	PCR voda	90	-
F MGB371	1	1	F BMS90	3	3
R MGB371	1	1	R BMS90	3	3
F HvWaxy	1,5	1,5	F Bmag0496	2	2
R HvWaxy	1,5	1,5	R Bmag0496	2	2
<i>10 × MPG (4) primer mix</i>			<i>10 × MPX (8) primer mix</i>		
PCR voda	92	-	PCR voda	92	-
F Bmag0225	2	2	F BMS32	2	2
R Bmag0225	2	2	R BMS32	2	2
F EBmac0624	2	2	F Bmag0500	2	2
R EBmac0624	2	2	R Bmag0500	2	2

Tabulka 5. Složení reakční směsi (12,5 µl) pro singleplex PCR.

Složka	Objem/1 reakce (µl)	Finální koncentrace
PCR voda	0,25	-
2 × Type-it Multiplex PCR Master Mix	6,25	1 ×
Forward primer (10µM)	0,5	0,4 µM*
Reverse primer (10µM)	0,5	0,4 µM*
Templátová DNA (5 ng/µl)	5	25 ng

*finální koncentrace pro Bmag0382 je 0,8µM

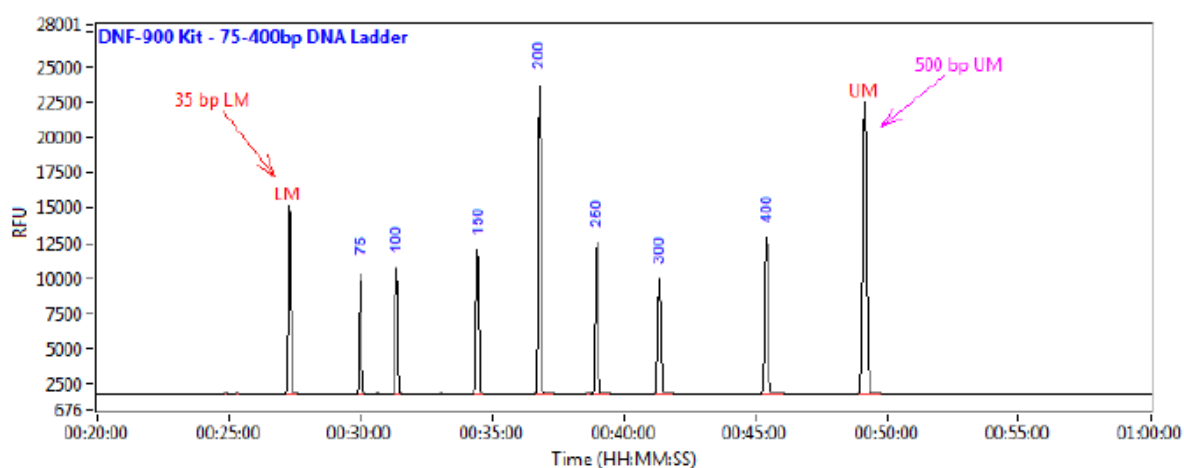
Tabulka 6. Složení reakční směsi (13,25 µl) pro multiplex PCR.

Složka	Objem/1 reakce (µl)	Finální koncentrace
PCR voda	-	-
Q-Solution (5×)	0,75	0,3 ×
2 × Type-it Multiplex PCR Master Mix	6,25	1 ×
10x primer mix (Tabulka 4)	1,25	(0,1 – 0,2) µM
Templátová DNA (5 ng/µl)	5	25 ng

Tabulka 7. Teplotní profily PCR.

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
<i>TP1 (Bmag0005)</i>		<i>TP1_35x30s58°C.prcl</i>	
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	58	30	
Extenze	72	30	
Finální extenze	68	600	1
Chlazení	4	∞	1
<i>TP2 (RG)</i>		<i>TP2_RG55°C.prcl</i>	
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	55	60	
Extenze	72	30	
Finální extenze	68	600	1
Chlazení	4	∞	1
<i>TP4 (MPEBmac, Bmag0382)</i>		<i>TP4_40x60s60s58°C.prcl</i>	
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	40
Annealing	58	60	
Extenze	72	60	
Finální extenze	68	600	1
Chlazení	4	∞	1
<i>TP6 (Bmag0223)</i>		<i>TP6_40x60s90s58°C.prcl</i>	
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	40
Annealing	58	60	
Extenze	72	90	
Finální extenze	68	600	1

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Chlazení	4	∞	1
<i>TP7 (MPBmag, MPHVM, MPY, MPX)</i>		<i>TP7_35x60s60s58°C.prcl</i>	
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	58	60	
Extenze	72	60	
Finální extenze	68	600	1
Chlazení	4	∞	1
<i>TP8 (MPMGBHv, MPG, MPMGB)</i>		<i>TP8_35x60s90s58°C.prcl</i>	
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	58	60	
Extenze	72	90	
Finální extenze	68	600	1
Chlazení	4	∞	1



Obrázek 1. 75 bp až 400 bp DNA Ladder, LM, UM.

3 Výsledky a diskuse

Metodické postupy pro úpravu a homogenizaci vzorků testovaného osiva a následnou extrakci DNA vycházely z uvedených JPP. Ze všech 21 testovaných vzorků se podařilo získat vysokomolekulární DNA v dostatečném množství a kvalitě (Tabulka 8) pro následnou optimalizaci reakčních podmínek PCR.

Tabulka 8. Koncentrace a čistota DNA.

Vzorek	c (ng/μl)	A_{260/280}	A_{260/230}	Vzorek	c (ng/μl)	A_{260/280}	A_{260/230}
1A	35,2	1,8	1,6	1B	29,4	1,8	1,7
2A	24,6	1,8	2,1	2B	34,3	1,8	1,6
3A	18,4	1,7	1,6	3B	21,2	1,8	1,7
4A	21,6	1,8	1,8	4B	28,3	1,8	1,6
5A	64,3	1,8	2,1	5B	64,9	1,8	2,1
6A	32,9	1,8	1,8	6B	113,3	1,9	2,1
7A	116,5	1,9	1,9	7B	119,1	1,9	2,1
8A	131,7	2,0	2,1	8B	115,7	1,9	2,0
9A	90,9	1,9	2,1	9B	63,7	1,9	2,0
10A	130,5	2,0	2,0	10B	111,5	1,9	2,1
11A	63,4	1,9	2,2	11B	62,0	1,9	2,1
12A	31,6	1,8	2,1	12B	49,5	1,9	2,0
13A	55,9	1,8	2,1	13B	59,7	1,8	2,1
14A	42,1	1,8	2,0	14B	48,2	1,8	1,7
15A	38,2	1,8	2,0	15B	30,6	1,8	2,0
16A	30,8	1,8	2,0	16B	30,9	1,8	2,1
17A	53,5	1,8	1,7	17B	33,9	1,8	1,5
18A	39,4	1,8	1,7	18B	43,6	1,8	1,8
19A	32,7	1,8	1,9	19B	36,9	1,8	1,9
20A	40,2	1,8	1,9	20B	38,2	1,7	1,8
21A	19,0	1,8	1,7	21B	20,9	1,7	1,8

Amplifikovatelnost vyextrahované DNA byla ověřena PCR referenčního genu *trnL* (UAA). Jedná se o intronní oblast genu pro tRNA přítomného v plastidové DNA u rostlin. V případě ječmene dochází k amplifikaci produktu o délce 553 bp, detekce se provádí elektroforeticky na 2% agarózovém gelu.

3.1 Optimalizace PCR

Analýza SSR polymorfismů je založena na PCR, která vyžaduje rozsáhlou optimalizaci reakčních podmínek pro všechny testované markery. Předpokladem úspěšné PCR je nastavení experimentálních parametrů reakce tak, aby měla specifický průběh a minimalizoval se výskyt nespecifických a jiných minoritních produktů.

Analýza mikrosatelitních oblastí DNA s detekcí na systémech s vysokým rozlišením je mnohdy spojena s velkými rozdíly v intenzitě fluorescenčního signálu a nerovnoměrnými výtěžky pro jednotlivé produkty. Častým jevem při PCR mikrosatelitů, které mají přímý dopad na interpretaci DNA profilů, je vznik různých artefaktů, zejména pak stutter píků, n-1 produktů, nebo výskyt tzv. nulových alel. Prokluz polymerázy při replikaci mikrosatelitní DNA může mít za následek amplifikaci určitého procenta PCR produktů kratších/delších o jeden či více SSR motivů, oproti očekávané délce. Jedná se o tzv. stutter píky, které se hojně vyskytují u dinukleotidových repetíci, u delších repetíci jsou méně časté. Jsou viditelné jako další vrcholy v elektroforetickém záznamu, čímž značně komplikují vyhodnocování vzorků, zvláště těch směsných. Nízká kvalita templátové DNA může vést k preferenční amplifikaci jedné (obvykle kratší) alely u heterozygota, který se pak chybně jeví jako homozygot. Jedná se o tzv. alelický dropout. Přítomnost nulové alely je způsobena mutací DNA v místě, které je homologní k sekvenci primeru. Tím je narušena jeho hybridizace, a proto nedochází k amplifikaci alely původně přítomné ve vzorku. Stochastický efekt je primárně způsoben nízkou koncentrací templátové DNA, kdy v důsledku nedostatečného nasedání primerů dochází k nevyvážené amplifikaci.

V rámci optimalizace PCR pro sadu testovaných mikrosatelitních markerů byly stanoveny optimální parametry pro složení reakční směsi, vstupní množství templátové DNA a teplotní profil amplifikace. Type-it Microsatellite PCR Kit obsahuje mastermix již ve formě ready-to-use, tzn. s optimálním složením směsi dNTP, MgCl₂, reakčního pufru a HotStarTaq DNA polymerázy. Při úpravě PCR reakčních podmínek se vycházelo z doporučení manuálu kitu.

Množství vstupní templátové DNA významně ovlivňuje efektivitu annealingu primerů a tím úspěšnost celé PCR. Nízké koncentrace DNA neposkytují dostatečné množství komplementárních sekvencí, příliš mnoho templátu vede k větší míře chybného párování. Bylo testováno (5 – 75) ng templátové DNA v reakční směsi o celkovém objemu 25 μ l, množství (25 – 50) ng DNA se jeví jako optimální. Sekvence a koncentrace primerů v reakční směsi výrazně ovlivňuje výsledek PCR. Příliš vysoká koncentrace může vést k nesespecifickému nasedání primerů na templátovou DNA nebo k tvorbě primer dimerů. Příliš nízká koncentrace primerů vede k jejich předčasnému vyčerpání a nedostatečnému množství produktu. Byly testovány koncentrace forward a reverse primerů v rozmezí (0,2 – 1,0) μ M. Optimální koncentrace primerů v reakční směsi pro amplifikaci jednotlivých markerů je 0,4 μ M. Annealingová teplota (T_a), neboli teplota nasedání primerů, se odvíjí od délky primerů a počtu GC párů. Čím větší délka a vyšší obsah GC párů, tím je T_a vyšší. V zásadě platí, že T_a musí být dostatečně vysoká, aby nedocházelo k nesespecifickému nasedání primerů k templátové DNA, pokud by ale byla příliš vysoká, primery by nenasadaly vůbec. Optimální T_a byla určena vytvořením teplotního gradientu v rozmezí teplot (46 – 65) $^{\circ}$ C. První krok PCR, počáteční aktivace polymerázy, probíhá 5 min při 95 $^{\circ}$ C. Následuje denaturace (30 s), annealing a extenze, které se cyklicky opakují. Finální extenze zajišťuje plné dosyntetizování všech nově vzniklých produktů. Byly porovnány rozdílné doby trvání annealingu (30 – 180) s a extenze (30 – 60) s, a počet cyklů 35 až 45. Optimální výtěžek PCR produktů byl získán mezi 35. a 40. cyklem. Finální extenze byla testována při teplotě (60 – 72) $^{\circ}$ C po dobu (5 – 30) min. Součástí kitu je i Q-Solution, který ovlivňuje vlastnosti tání DNA a jeho přítomnost v reakční směsi může vést ke zvýšení účinnosti PCR. Nicméně v případě singleplex PCR nebyl ve většině případů pozorován žádný pozitivní efekt. Optimální parametry pro jednotlivé markery jsou shrnuty v Tabulce 9. PCR je možné provádět i v polovičním reakčním objemu 12,5 μ l. 7,5 μ l tvoří mastermix se specifickými primery a 5 μ l DNA o koncentraci 5 ng/ μ l.

Testování 21 markerů vyžaduje provedení velkého množství PCR a následných fragmentačních analýz. Ve snaze snížit množství amplifikací a tím celkového času a nákladů pro analýzu, byla navržena multiplex PCR. Její přednost spočívá v rychlé detekci více produktů v jedné reakci za použití dvou a více sad primerů. Přestože se princip samotné reakce neliší od standardního protokolu PCR, efektivní využití metody vyžaduje důkladné navržení tak, aby se výsledné PCR produkty daly snadno a dostatečně vzájemně odlišit. Vzhledem k tomu, že amplifikace pro všechny markery neprobíhá se stejnou účinností a citlivostí, bylo nutné některé reakční

podmínky přetestovat a poupravit složení reakční směsi. Bylo navrženo několik variant multiplexů s různými kombinacemi markerů, pro které byl stanoven vhodný poměr koncentrací jednotlivých primerů. Současně by primery měly hybridizovat při podobné teplotě (T_a), nesmí být vzájemně komplementární a délka produktů by měla být při separaci kapilární elektroforézou odlišitelná alespoň o 20 bp až 30 bp. Přítomnost $0,5 \times Q$ -Solution měla pozitivní efekt na proběhlou PCR. Přesto v několika případech docházelo k negativním interakcím a některé fragmenty nebyly amplifikovány. Podařilo se zoptimalizovat 8 multiplex PCR protokolů pro paralelní detekci 3 (MPEBmac, MPHVM) nebo 2 (MPBmag, MPMGBHv, MPG, MPMGB, MPY, MPX) SSR markerů. Pro zbylé 3 markery (Bmag0382, Bmag0005, Bmag0223), které se nepodařilo sloučit do jedné reakce, je zachován individuální protokol singleplex PCR. Nicméně v následujícím kroku lze provést společnou separaci pro MPBmag + Bmag0382 a MPEBmac + Bmag0005.

Tabulka 9. Optimalizované reakční podmínky PCR pro jednotlivé markery.

Marker	Konc. primerů (μM)	T_a (°C)	Počet cyklů	Anneal./Extenze (s)
Bmag0005	0,4	58	35	30/30
Bmag0120	0,4	58	35	30/30
Bmag0223	0,4	58	40	60/90
Bmag0225	0,4	56	40	60/30
Bmag0382	0,8	58	40	60/30
Bmag0692	0,4	58	35	90/30
EBmac0415	0,4	58	35	30/30
EBmac0501	0,4	58	40	60/30
EBmac0635*	0,4	58	35	60/30
HvWaxy	0,4	58	35	30/30
EBmac0624	0,4	58	35	60/30
MGB371	0,4	58	35	60/60
MGB318	0,4	58	35	30/30
MGB357	0,4	58	35	30/30
HVM40	0,4	58	35	60/60
HVM74	0,4	58	35	60/60
Bmag0500	0,4	58	35	60/60
Bmag0496	0,4	58	35	60/60
HVM36	0,4	58	35	60/60
BMS90	0,4	58	35	60/60
BMS32	0,4	58	35	60/60

*Q-solution

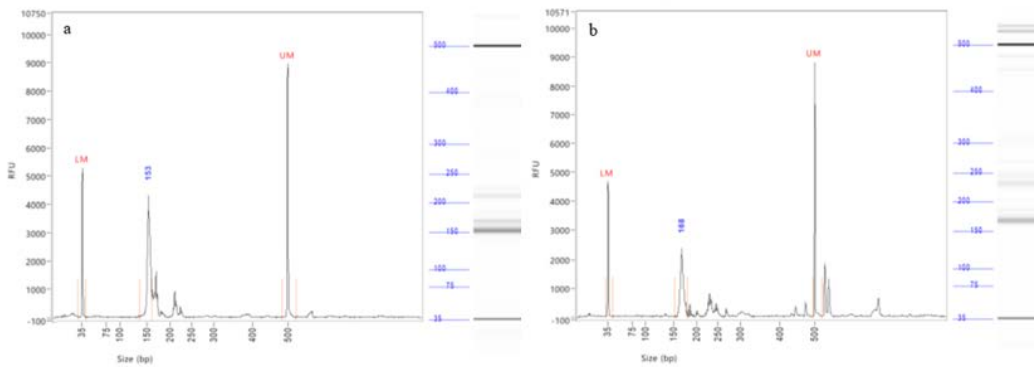
3.2 Fragmentační analýza a vyhodnocení elektroferogramů

Produkty amplifikace byly separovány pomocí soupravy DNF-900 dsDNA Reagent Kit, která je určena pro analýzu dsDNA fragmentů o velikosti 35 bp až 500 bp. Separační rozlišení kitu při použití sady 55 cm dlouhých kapilár je nejméně (3-5) bp při 300 bp. DNA fragmenty byly

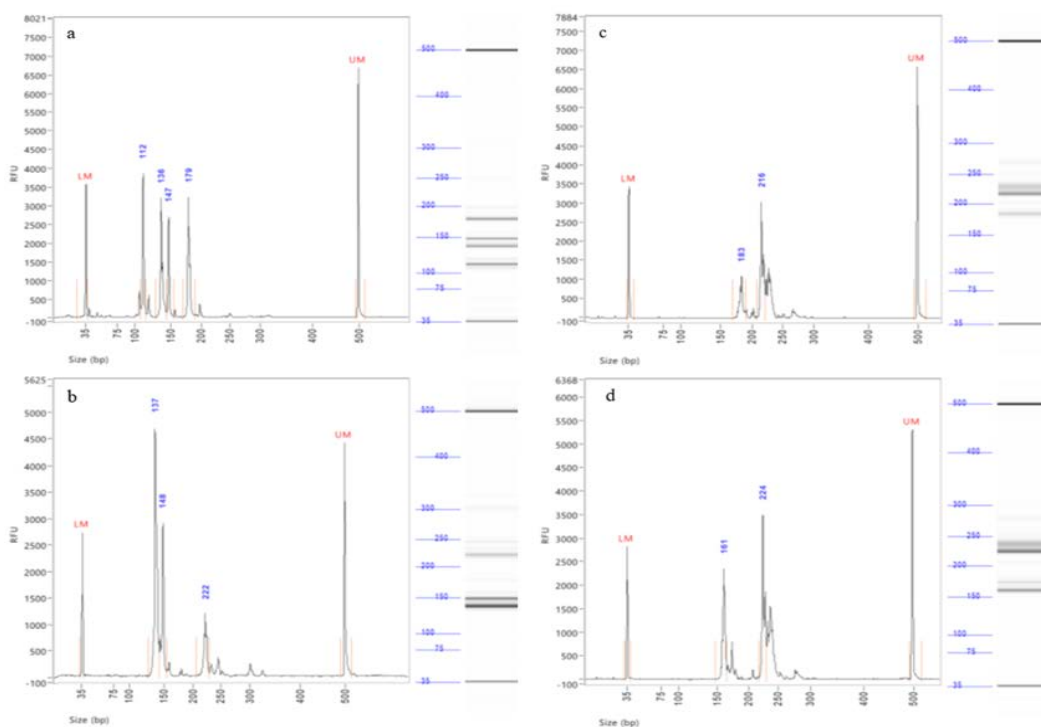
vizualizovány softwarem PROSize™ 3.0 a vyhodnoceny pomocí 35 bp a 500 bp molekulárního standardu. Výsledkem analýzy jsou údaje o velikosti jednotlivých alel udávané v párech bazí (Obrázky 2-7). Kombinací alel pro všech 21 SSR markerů se získá DNA (alelický) profil vzorku (Tabulka 10).

Tabulka 10. Alelické profily testovaných odrůd získané analýzou 21 SSR markerů.

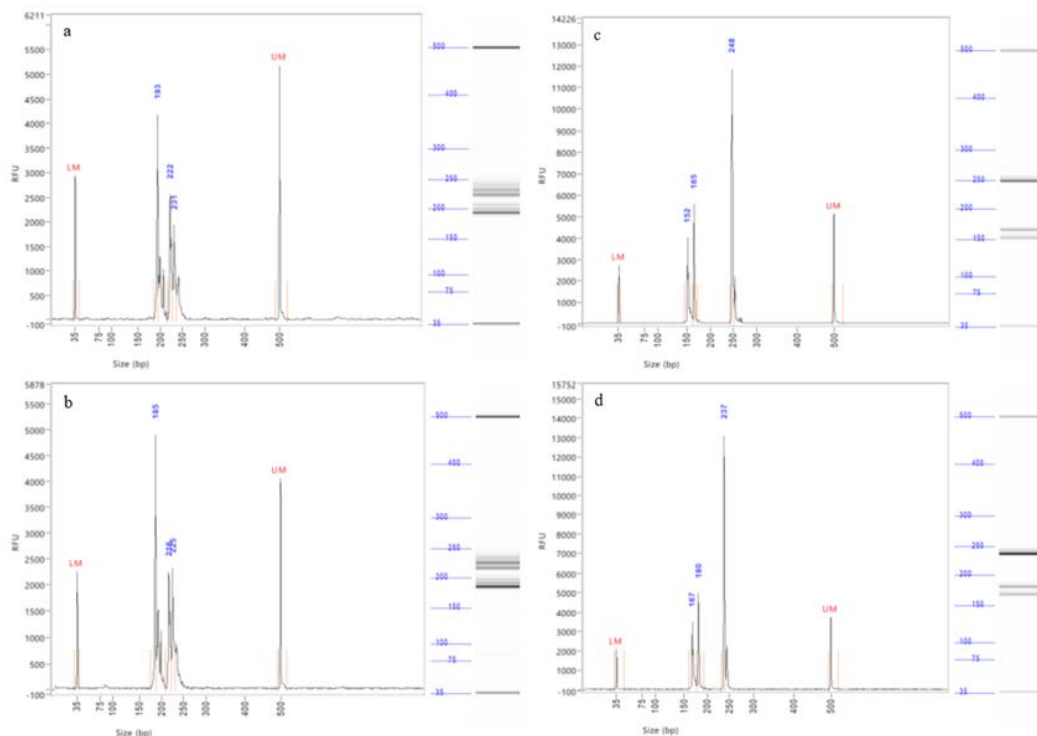
č. vz.	Bmag0120	MGB318	MGB357	EBmac0415	HvWaxy	EBmac0624	Bmag0692	EBmac0501	Bmag0382	Bmag0225	Bmag0005	EBmac0635	Bmag0223	MGB371	HVM36	HVM40	HVM74	BMS90	Bmag0496	BMS32	Bmag0500
1	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	B	B	C	A	A	B	B	C	A	C
2	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	B	B	C	A	A	A	B	B	A	E
3	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	C	B	C	B	A	B	B	C	A	E
4	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	B	C	C	B	B	B	C	C	A	N
5	A	A	B	C	C	B	B	C	C	D	B	B	B	C	A	A	B	B	C	A	E
6	A	A	B	B	C	B	C	C	C	D	B	B	B	C	A	A	B	B	C	A	E
7	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	B	B	C	A	A	A	B	B	A	E
8	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	B	B	C	A	A	B	B	C	A	E
9	B	A	B	A	C	B	C	C	A	D	C	B	C	C	A	C	B	B	C	A	A
10	A	A	B	B	C	B	C	C	C	D	B	B	C	C	A	A	B	C	C	A	E
11	C	A	A	C	ND	B	A	A	C	A	B	C	F	D	N	A	A	B	B	B	C
12	C	A	A	C	ND	B	A	A	C	A	B	C	E	A	N	A	A	B	B	B	D
13	B	A	A	C	ND	B	A	B	C	D	B	C	G	D	A	A	A	C	B	A	D
14	B	A	A	C	ND	B	A	B	C	D	B	C	G	D	A	A	A	C	B	B	D
15	A	A	A	C	C	B	A	A	C	D	B	C	H	D	N	B	A	B	B	B	C
16	B	B	A	C	B	C	C	D	B	A	B	C	F	B	N	A	D	A	A	C	D
17	B	AB	A	C	AB	AC	A	A	B	AB	AB	AC	A	AB	A	AC	CD	B	A	A	B
18	B	AB	A	C	AB	C	A	A	B	A	AB	A	A	B	B	AC	D	B	A	A	C
19	B	A	A	C	A	C	A	A	B	C	A	A	A	B	N	C	D	B	A	A	C
20	B	B	A	C	A	A	A	A	B	B	B	C	D	A	A	A	C	B	C	A	B
21	B	B	A	C	B	C	A	A	B	A	B	C	C	B	B	A	D	C	A	A	C



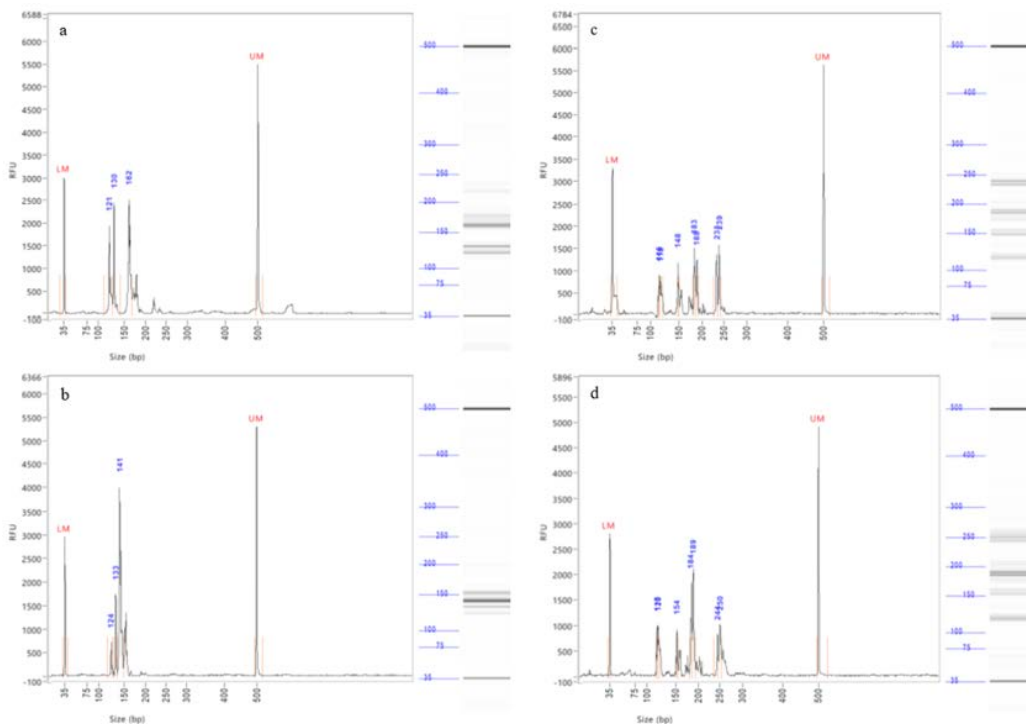
Obrázek 2. Porovnání elektroferogramů pro Bmag0223 u odrůd Odyssey (a - ječmen jarní) a Paso (b - ječmen ozimý).



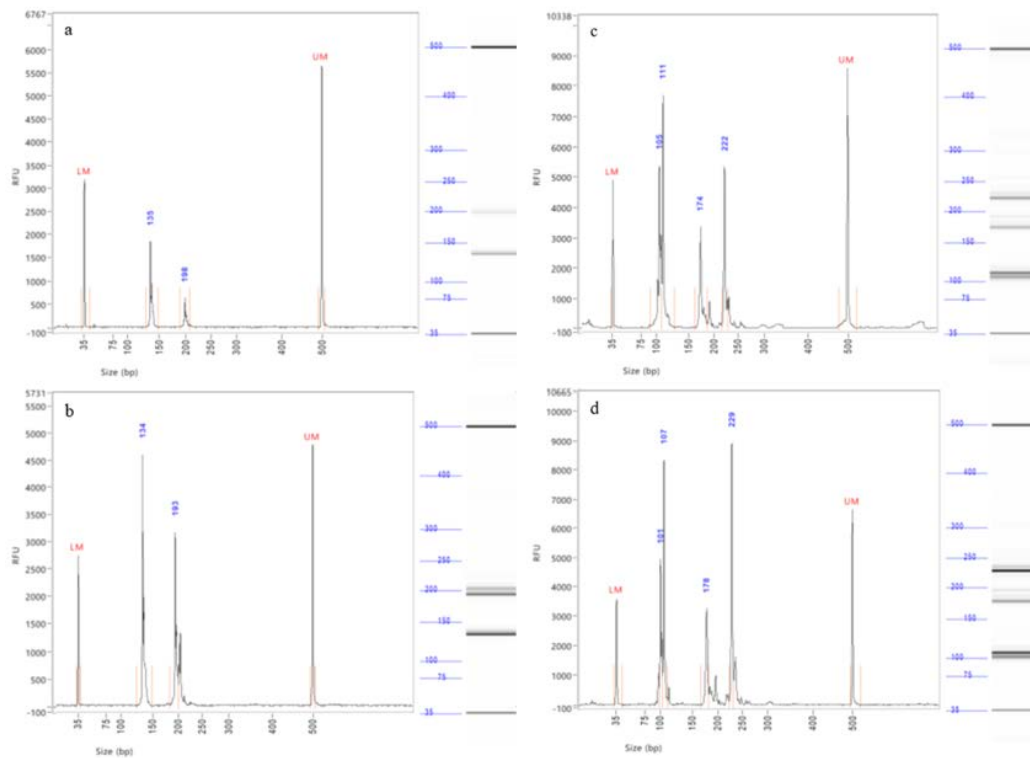
Obrázek 3. Porovnání elektroferogramů 5 SSR markerů (a,b – HVM36, HVM40, HVM74; c,d – BMS32, Bmag0500) pro odrůdy Odyssey (a,c - ječmen jarní) a Paso (b,d - ječmen ozimý).



Obrázek 4. Porovnání elektroferogramů 4 SSR markerů (a,b – BMS90, Bmag0496; c,d – MGB318, MGB357) pro odrůdy Odyssey (a,c - ječmen jarní) a Paso (b,d - ječmen ozimý).



Obrázek 5. Porovnání elektroferogramů 6 SSR markerů (a,b – Bmag0225, EBmac0624; c,d – EBmac0415, EBmac0501, EBmac0635, Bmag0005) pro odrůdy Odyssey (a,c - ječmen jarní) a Paso (b,d - ječmen ozimý).



Obrázek 6. Porovnání elektroferogramů 5 SSR markerů (a,b – MGB371, HvWaxy; c,d – Bmag0120, Bmag0692, Bmag0382) pro odrůdy Odyssey (a,c - ječmen jarní) a Paso (b,d - ječmen ozimý).

Bmag0120 (AG) ₁₅	MGB318 (CTG) ₆	MGB357 (CCG) ₈	EBmac0415 (AC) ₁₇	HvWaxy (GCAT) ₄	EBmac0624 (GT) _{6/7}	Bmag0692 (CT) ₁₉
222 221,2 A 228 227,8,9 B 256 256 C	148 147-149 A 164 164,5 B	236 236,7 A 248 247-9 B	221 220-1 A 231 230-1 B 243 242-4 C	190 189-190 A 192 191-192 B 196 196-197 C ND N	104 104-5 A 118 118-9 B 121 121 C	160 160-1 A 172 172-3 B 176 176-7 C
Bmag0382 (AG) ₇ AA(AG) ₇	Bmag0225 (AG) ₂₆	Bmag0005 (AG) ₁₅	EBmac0635 (AC) ₂₃	Bmag0223 (AG) ₁₆	MGB371novýF (TG) ₆	EBmac0501 (AC) ₁₃
94 A 105 B 109 109-10 C	137 137-8 A 142 142-3 B 156 156 C 158 158-9 D	166 (179) 166 A 170 (183) 170-1 B 172 (185) 172 C bezQ (Q)	108 A 112 111-2 B 114 113-4 C	145 145-6 A 149 149-50 B 155 156-6 C 157 157 D 159 159-60 E 163 F 165 165-6 G 171 171-2 H 173 173-4 I	128 128-9 A 132 132-3 B 134 134-5 C 136 136-7 D	141 140-141 A 143 142-143 B 147 146-147 C 151 150-151 D
HVM36 (GA) ₁₃	HVM40 (GA) ₆ , (GT) ₄ , (GA) ₇	HVM74 (GA) ₁₃	BMS90 (AC) ₂₀	Bmag0496 (CT) ₂₀	BMS32 (AC) ₇ T(CA) ₁₅ (AT) ₉	Bmag0500 (AG) ₆ CG(AG) ₂ (AGAGGG) ₃ (AG) ₆
112 111-112 A 114 113-114 B ND multá N	135 133-135 A 139 138-140 B 149 148-149 C	178 177-178 A 180 179-180 B 192 191-192 C 221 220-221 D	212 211-212 A 218 218-219 B 220 220-221 C	180 180-181 A 188 188-189 B 192 192-193 C	214 214-215 A 216 216 B 223 223 C	68-69 A 78 B 155 155-156 C 157 157-158 D 181 181 E ND multá N

Obrázek 7. Přehled pozorovaných alel pro 21 testovaných SSR markerů u 21 vzorků ječmene.

3.3 Genetická variabilita

Výsledné profily byly převedeny do binárního formátu reprezentovaného přítomností (1) nebo absencí (0) jednotlivých alel (Obrázek 8). Pomocí programu PAST ver. 3.17 s využitím metody UPGMA a Jaccardova podobnostního koeficientu byla získána matice genetických podobností pro všechny testované odrůdy (Obrázek 9). Pro grafické vyjádření výsledků lze vytvořit dendrogram genetických podobností (Obrázek 10). SSR genotypizací DNA vyextrahované z 21 vzorků osiva ječmene byl získán alelický profil. Délka detekovaných fragmentů alel pro jednotlivé SSR markery se pohybovala v rozmezí hodnot uvedených v Tabulce 2. Pro testovanou sadu 21 SSR markerů bylo detekováno celkem 77 polymorfních alel.

V první části VÚ bylo zavedeno 14 SSR markerů. Bylo porováno 210 párů alelických profilů, 7 z nich nebylo odlišeno. V případě vzorků 13 (KW 2-430) a 14 (KW 2-431) šlo o ozimé

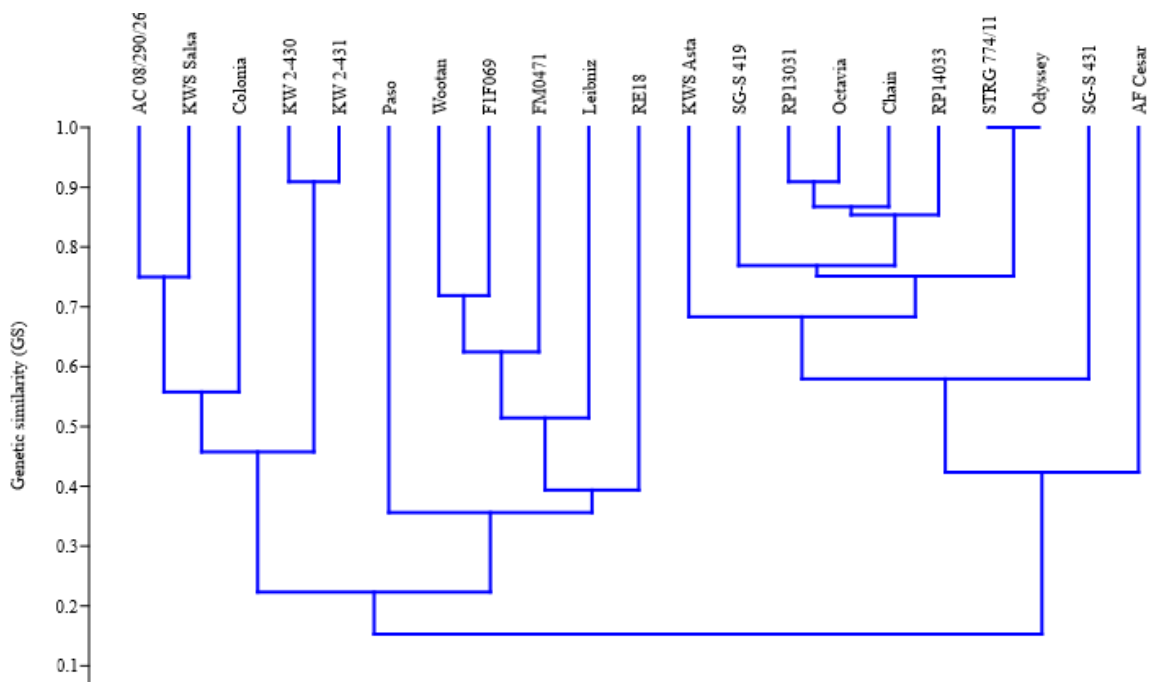
odrůdy stejného původu, u zbylých šesti párů vzorků se jednalo o odrůdy ječmene jarního (1 (Chain) a 2 (STRG 774/11); 1 (Chain) a 7 (Odyssey); 1 (Chain) a 8 (Octavia); 2 (STRG 774/11) a 7 (Odyssey); 2 (STRG 774/11) a 8 (Octavia); 7 (Odyssey) a 8 (Octavia)). Ve snaze odlišit především podobné odrůdy ječmene jarního byla původní sada doplněna o dalších 7 SSR markerů. Z původních sedmi párů shodných alelických profilů zůstala neodlišena pouze dvojice vzorků 2 (STRG 774/11) a 7 (Odyssey).

	Bmag0120_222 -- A	Bmag0120_228 -- B	Bmag0120_236 -- C	MGB318_148 -- A	MGB318_164 -- B	MGB357_236 -- A	MGB357_248 -- B	EBmac0415_221 -- A	EBmac0415_231 -- B	EBmac0415_243 -- C	HvWaxy_190 -- A	HvWaxy_192 -- B	HvWaxy_196 -- C	HvWaxy_ND -- X	EBmac0624_104 -- A	EBmac0624_118 -- B	EBmac0624_121 -- C	Bmag0692_160 -- A	Bmag0692_172 -- B	Bmag0692_176 -- C	EBmac0501_141 -- A	EBmac0501_143 -- B	EBmac0501_147 -- C	EBmac0501_151 -- D	Bmag0382_94 -- A	Bmag0382_105 -- B	Bmag0382_109 -- C	Bmag0225_137 -- A	Bmag0225_142 -- B	Bmag0225_156 -- C	Bmag0225_158 -- D	Bmag0005_166 -- A	Bmag0005_170 -- B	Bmag0005_172 -- C	EBmac0635_108 -- A	EBmac0635_112 -- B	EBmac0635_114 -- C	Bmag0223_145 -- A					
Chain 1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0		
STRG 774/11 2	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0		
SG-S 431 3	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
SG-S 431 4	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
RP13031 5	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
RP14033 6	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
Odyssey 7	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
Octavia 8	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
AF Cesar 9	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
KWS Asta 10	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
AC 08/290/26 11	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
KWS Salsa 12	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
KW 2-430 13	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
KW 2-431 14	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Colonia 15	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Paso 16	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
Wootan 17	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
FIF069 18	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
FM0471 19	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
RE18 20	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Leibniz 21	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Bmag0223_149 -- B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bmag0223_155 -- C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bmag0223_157 -- D	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bmag0223_159 -- E	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bmag0223_163 -- F	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bmag0223_165 -- G	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bmag0223_171 -- H	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bmag0223_173 -- I	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGB371(novýF)_128 -- A	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGB371(novýF)_132 -- B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGB371(novýF)_134 -- C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGB371(novýF)_136 -- D	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HVM36_112 -- A	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HVM36_114 -- B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HVM36_ND -- N	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HVM40_135 -- A	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HVM40_139 -- B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HVM40_149 -- C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HVM74_178 -- A	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HVM74_180 -- B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HVM74_192 -- C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HVM74_221 -- D	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0																					

	Chain	14 SSR																				
		STRG 774/11	SG-S 419	SG-S 431	RPI3031	RPI4033	Odyssey	Octavia	AF Cesar	KWS Asta	AC 08/290/26	KWS Salsa	KW 2-430	KW 2-431	Colonia	Paso	Wootan	FIF069	FM0471	RE18	Leibniz	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Chain	1	1,00	1,00	0,87	0,87	0,87	0,87	1,00	1,00	0,40	0,75	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
STRG 774/11	2	1,00	1,00	0,87	0,87	0,87	0,87	1,00	1,00	0,40	0,75	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
SG-S 419	3	0,87	0,87	1,00	0,75	0,75	0,75	0,87	0,87	0,33	0,65	0,22	0,22	0,27	0,27	0,40	0,08	0,09	0,07	0,04	0,08	0,08
SG-S 431	4	0,87	0,87	0,75	1,00	0,75	0,75	0,87	0,87	0,47	0,87	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
RPI3031	5	0,87	0,87	0,75	0,75	1,00	0,75	0,87	0,87	0,40	0,65	0,22	0,22	0,27	0,27	0,40	0,08	0,09	0,11	0,08	0,08	0,08
RPI4033	6	0,87	0,87	0,75	0,75	0,75	1,00	0,87	0,87	0,47	0,87	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,08	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
Odyssey	7	1,00	1,00	0,87	0,87	0,87	0,87	1,00	1,00	0,40	0,75	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
Octavia	8	1,00	1,00	0,87	0,87	0,87	0,87	1,00	1,00	0,40	0,75	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
AF Cesar	9	0,40	0,40	0,33	0,47	0,40	0,47	0,40	0,40	1,00	0,56	0,08	0,08	0,17	0,17	0,17	0,08	0,06	0,07	0,08	0,04	0,04
KWS Asta	10	0,75	0,75	0,65	0,87	0,65	0,87	0,75	0,75	0,56	1,00	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,08	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
AC 08/290/26	11	0,17	0,17	0,22	0,17	0,22	0,17	0,17	0,17	0,08	0,17	1,00	0,75	0,56	0,56	0,56	0,27	0,30	0,29	0,22	0,27	0,33
KWS Salsa	12	0,17	0,17	0,22	0,17	0,22	0,17	0,17	0,17	0,08	0,17	0,75	1,00	0,47	0,47	0,47	0,22	0,35	0,29	0,22	0,33	0,33
KW 2-430	13	0,22	0,22	0,27	0,22	0,27	0,22	0,22	0,22	0,17	0,22	0,56	0,47	1,00	1,00	0,56	0,22	0,25	0,24	0,22	0,27	0,27
KW 2-431	14	0,22	0,22	0,27	0,22	0,27	0,22	0,22	0,22	0,17	0,22	0,56	0,47	1,00	1,00	0,56	0,22	0,25	0,24	0,22	0,27	0,27
Colonia	15	0,33	0,33	0,40	0,33	0,40	0,33	0,33	0,33	0,17	0,33	0,56	0,47	0,56	0,56	1,00	0,17	0,25	0,24	0,22	0,27	0,27
Paso	16	0,04	0,04	0,08	0,04	0,08	0,08	0,04	0,04	0,08	0,08	0,27	0,22	0,22	0,22	0,17	1,00	0,46	0,48	0,27	0,33	0,65
Wootan	17	0,06	0,06	0,09	0,06	0,09	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,30	0,35	0,25	0,25	0,25	0,46	1,00	0,81	0,59	0,59	0,59
FIF069	18	0,07	0,07	0,07	0,07	0,11	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,29	0,29	0,24	0,24	0,24	0,48	0,81	1,00	0,72	0,41	0,63
FM0471	19	0,04	0,04	0,04	0,04	0,08	0,04	0,04	0,04	0,08	0,04	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,27	0,59	0,72	1,00	0,33	0,40
RE18	20	0,04	0,04	0,08	0,04	0,08	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,27	0,33	0,27	0,27	0,27	0,33	0,59	0,41	0,33	1,00	0,47
Leibniz	21	0,04	0,04	0,08	0,04	0,08	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,33	0,33	0,27	0,27	0,27	0,65	0,59	0,63	0,40	0,47	1,00

	Chain	21 SSR																				
		STRG 774/11	SG-S 419	SG-S 431	RPI3031	RPI4033	Odyssey	Octavia	AF Cesar	KWS Asta	AC 08/290/26	KWS Salsa	KW 2-430	KW 2-431	Colonia	Paso	Wootan	FIF069	FM0471	RE18	Leibniz	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Chain	1	1,00	0,75	0,75	0,62	0,83	0,83	0,75	0,91	0,45	0,68	0,20	0,17	0,24	0,20	0,27	0,08	0,13	0,15	0,11	0,17	0,11
STRG 774/11	2	0,75	1,00	0,68	0,50	0,75	0,75	1,00	0,83	0,35	0,62	0,24	0,24	0,31	0,27	0,31	0,05	0,13	0,12	0,08	0,14	0,08
SG-S 419	3	0,75	0,68	1,00	0,62	0,75	0,75	0,68	0,83	0,35	0,62	0,20	0,20	0,24	0,20	0,27	0,11	0,13	0,15	0,08	0,17	0,14
SG-S 431	4	0,62	0,50	0,62	1,00	0,56	0,56	0,50	0,62	0,40	0,68	0,11	0,11	0,20	0,17	0,24	0,05	0,06	0,10	0,05	0,08	0,11
RPI3031	5	0,83	0,75	0,75	0,56	1,00	0,83	0,75	0,91	0,45	0,68	0,20	0,20	0,27	0,24	0,27	0,11	0,16	0,15	0,11	0,20	0,11
RPI4033	6	0,83	0,75	0,75	0,56	0,83	1,00	0,75	0,91	0,50	0,83	0,17	0,17	0,24	0,20	0,24	0,11	0,13	0,12	0,08	0,17	0,08
Odyssey	7	0,75	1,00	0,68	0,50	0,75	0,75	1,00	0,83	0,35	0,62	0,24	0,24	0,31	0,27	0,31	0,05	0,13	0,12	0,08	0,14	0,08
Octavia	8	0,91	0,83	0,83	0,62	0,91	0,91	0,83	1,00	0,45	0,75	0,17	0,17	0,24	0,20	0,24	0,08	0,13	0,12	0,08	0,17	0,08
AF Cesar	9	0,45	0,35	0,35	0,40	0,45	0,50	0,35	0,45	1,00	0,50	0,08	0,08	0,17	0,14	0,14	0,08	0,13	0,12	0,14	0,14	0,05
KWS Asta	10	0,68	0,62	0,62	0,68	0,68	0,83	0,62	0,75	0,50	1,00	0,14	0,14	0,27	0,24	0,20	0,11	0,11	0,10	0,05	0,14	0,11
AC 08/290/26	11	0,20	0,24	0,20	0,11	0,20	0,17	0,24	0,17	0,08	0,14	1,00	0,75	0,45	0,50	0,62	0,24	0,24	0,28	0,24	0,24	0,27
KWS Salsa	12	0,17	0,24	0,20	0,11	0,20	0,17	0,24	0,17	0,08	0,14	0,75	1,00	0,45	0,50	0,50	0,24	0,28	0,24	0,20	0,27	0,24
KW 2-430	13	0,24	0,31	0,24	0,20	0,27	0,24	0,31	0,24	0,17	0,27	0,45	0,45	1,00	0,91	0,40	0,20	0,24	0,21	0,17	0,27	0,27
KW 2-431	14	0,20	0,27	0,20	0,17	0,24	0,20	0,27	0,20	0,14	0,24	0,50	0,50	0,91	1,00	0,45	0,20	0,21	0,18	0,14	0,24	0,24
Colonia	15	0,27	0,31	0,27	0,24	0,27	0,24	0,31	0,24	0,14	0,20	0,62	0,50	0,40	0,45	1,00	0,14	0,19	0,21	0,24	0,20	0,20
Paso	16	0,08	0,05	0,11	0,05	0,11	0,11	0,05	0,08	0,08	0,11	0,24	0,24	0,20	0,20	0,14	1,00	0,34	0,35	0,24	0,24	0,45
Wootan	17	0,13	0,13	0,13	0,06	0,16	0,13	0,13	0,13	0,13	0,11	0,24	0,28	0,24	0,21	0,19	0,34	1,00	0,72	0,55	0,59	0,50
FIF069	18	0,15	0,12	0,15	0,10	0,15	0,12	0,12	0,12	0,12	0,10	0,28	0,24	0,21	0,18	0,21	0,35	0,72	1,00	0,70	0,35	0,64
FM0471	19	0,11	0,08	0,08	0,05	0,11	0,08	0,08	0,08	0,14	0,05	0,24	0,20	0,17	0,14	0,24	0,24	0,55	0,70	1,00	0,27	0,40
RE18	20	0,17	0,14	0,17	0,08	0,20	0,17	0,14	0,17	0,14	0,14	0,24	0,27	0,27	0,24	0,20	0,24	0,59	0,35	0,27	1,00	0,35
Leibniz	21	0,11	0,08	0,14	0,11	0,11	0,08	0,08	0,08	0,05	0,11	0,27	0,24	0,27	0,24	0,20	0,45	0,50	0,64	0,40	0,35	1,00

Obrázek 9. Genetická podobnost na základě analýzy 14 a 21 SSR markerů.



Obrázek 10. Dendrogram genetických podobností testovaných odrůd (21 SSR).

4 Závěr

S rozvojem moderních molekulárně biologických metod a mapování rostlinného genomu se mikrosatelity staly užitečným nástrojem pro genotypizaci rostlin, především díky jejich extrémní variabilitě, kodominantní dědičnosti a distribuci napříč celým genomem. Postupné poznávání mikrosatelitních sekvencí vedlo k vyvinutí postupů pro rychlou, reprodukovatelnou a snadnou detekci jejich polymorfizmu, které mají široké spektrum využití v populační biologii rostlin.

V práci byla zavedena podpůrná metoda pro identifikaci odrůd ječmene pomocí 21 SSR markerů. Byly zoptimalizovány reakční podmínky pro PCR a fragmentační analýzu, snížení reakčního objemu PCR na polovinu a sloučení jednotlivých reakcí do multiplexů vedlo k výraznému snížení nákladů a celkového množství prováděných analýz. Diskriminační síla vybrané sady markerů byla ověřena na souboru 21 vybraných odrůd ječmene. Bylo získáno 20 odlišných alelických profilů, u dvou odrůd ječmene jarního byla detekována shoda. Výsledné SSR profily pro jednotlivé odrůdy se ukládají do interní databáze, která bude průběžně doplňována.

5 Literatura

1. ISTA: Method validation reports on rules proposals for the International Rules for Seed Testing 2017 Edition. OM16-06, **2016**, 10-43.
2. ISTA: Species and variety testing. International Rules for Seed Testing **2017**, Chapter 8, i-8-26.
3. Korf M et al., **2004**. Insertion of 18 new SSR markers into the Oregon Wolfe Barley map.
4. Koutecký P, Košnar J, **2013**. Metody molekulární biologie v ekologii a systematice rostlin (Mikrosatelity).
5. Leišová L, Kučera L, Dotlačil L, **2007**. Genetic resources of barley and oat characterised by microsatellites. Czech J. Genet. Plant Breed., 43 (3): 97–104.
6. Leišová L a kol., **2008**. Použití metody analýzy mikrosatelitů pro charakterizaci odrůd pšenice, ječmene a ovsa pro potřeby semenářských podniků, šlechtitelských stanic a odrůdového zkušebnictví, VÚRV.
7. Mason AS, **2015**. SSR Genotyping. Plant Genotyping: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 1245, 77-89.
8. Nunno HM, **2012**. Forensic DNA Analysis. Forensic Chemistry Handbook, 291-326.
9. Perry DJ, Fernando U, Lee SJ, **2014**. Simple sequence repeat-based identification of Canadian malting barley varieties. Canadian Journal of Plant Science 94(3):485-496.
10. Pospíš P, Michálek P, Ruttkey-Nedecký B, Kopel P, Trnková L, **2014**. Optimalizace multiplex PCR. Journal of Metallomics and Nanotechnologies, 1(2), 60-63.
11. Taberlet P et al., **2007**. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. Nucleic acids research Vol. 35, No. 3 e14.
12. UPOV, **2013**. TGP/15 Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of DUS.
13. UPOV, **2010**. UPOV/INF/17/1 Guidelines for DNA-profiling: Molecular marker selection and database construction.
14. UPOV, **2010**. UPOV/INF/18/1 Possible use of molecular markers in the examination of DUS.
15. VŠÚO: Molekulární metody - hodnocení genotypů - Marker Assisted Breeding.
16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
17. JPP ÚKZÚZ č. 60075.1 - Úprava a homogenizace vzorků osiv pro extrakci DNA.
18. JPP ÚKZÚZ č. 10700.1 - Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini).
19. JPP ÚKZÚZ č. 10250.2 - Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR.
20. JPP ÚKZÚZ č. 10258.1 - Kapilární elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR.
21. Advanced Analytical: DNF-900 dsDNA Reagent Kit User Guide, **2014**.
22. Qiagen: DNeasy®Plant Handbook, **2012**.
23. Qiagen: Type-it®Microsatellite PCR Handbook, **2011**.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXIV, 2020/3

Ročník: XXIV, č. 3

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2020

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 59

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196