

**Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**

**Národní referenční laboratoř**



## **Bulletin 2018**

**Ročník XXII, číslo 1/2018**

**Brno 2018**

## Obsah

- 1 Stanovení kvalitativních parametrů ve vzorcích pšenice tvrdé (*Triticum durum*)**  
Radvana Šulová, David Čížmár, Alena Balarinová, Naděžda Kabátová  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno,  
Hroznová 2, 656 06 Brno 1
  
- 2 Zavedení detekce GHB 119 a T304-40 u bavlny**  
Kateřina Staňková  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,  
Hroznová 2, 656 06 Brno 18

Za obsah příspěvků odpovídají autoři

# Stanovení kvalitativních parametrů ve vzorcích pšenice tvrdé (*Triticum durum*)

*Radvana Šulová, David Čížmár, Alena Balarinová, Naděžda Kabátová*

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

## 1 Úvod

Pšenice je jednou z nejstarších kulturních plodin. Začátky jejího pěstování jsou spojeny se vznikem zemědělství. Nejstarší nálezy se vztahují k pěstování pšenice jednozrnky a dvouzrnky. Rod pšenice (*Triticum* L.) náleží do čeledi lipnicovitých (Poaceae). Zahrnuje několik druhů a velký počet forem a odrůd. Hlavní jsou 2 druhy: pšenice setá (*Triticum aestivum* L) a pšenice tvrdé (*Triticum durum*) [1].

Pšenice setá je u nás nejrozšířenější plodinou a zaujímá téměř čtvrtinu orné půdy v ČR a polovinu ploch všech obilnin. Pěstuje se ve dvou formách – ozimé (94 %) a jarní (6 %) [1]. Pšenice tvrdá (*Triticum durum*) vznikla z kulturní pšenice dvouzrnky a má ozimé i jarní formy. Převažují jarní odrůdy, které mají vyšší jakost [2].

Nové odrůdy pšenice seté registruje a výkonnost již uznaných odrůd ověřuje Národní odrůdový úřad (NOÚ) ze Sekce rostlinné výroby (SRV). Oddělení testování odrůd Národní referenční laboratoře ÚKZÚZ (NRL) úzce spolupracuje s NOÚ a podílí se na chemických analýzách i technologických a reologických zkouškách odrůd pšenice seté. Systém hodnocení potravinářské jakosti pšenice seté pro pekařské využití zahrnuje přímá i nepřímá hodnocení. Ta se podle významu dělí na hlavní (mají vliv na zařazení odrůdy do jakostní skupiny) a doplňková (slouží k další specifikaci jakosti odrůd). Hlavními kritérii jsou pekařský pokus Rapid Mix Test (objemová výtěžnost), obsah dusíkatých látek v sušině ( $N \times 5,7$ ), sedimentační index Zelenyho test, číslo poklesu, objemová hmotnost a vaznost mouky. Doplňková kritéria jsou tvrdost zrna – PSI (Particle Size Index) i alveografické hodnocení [1].

V roce 2014 se NOÚ začal také zabývat hodnocením vybraných odrůd pšenice tvrdé (*Triticum durum*). V rámci posuzování kvalitativních parametrů tohoto druhu pšenice byla vybrána stanovení obsahu popela, barevného pigmentu, čísla poklesu a sedimentačního indexu

Zelenyho testu. Tyto metody stanovení se využívaly již při hodnocení pšenice seté a v této práci se ověřily i pro pšenici tvrdou.

Dále se pro hodnocení pšenice tvrdé (*Triticum durum*) požaduje stanovení obsahu sušiny, N-látek, škrobu a tvrdosti. Pro tato stanovení se využívá metoda NIRs s vytvořenými kalibračními závislostmi pro parametry sušina, N-látky, škrob a tvrdost, které se již v rámci ONRL Brno využívaly pro pšenici setou. Tyto kalibrační závislosti jsou rozšířeny i na pšenici tvrdou.

## 2 Teoretická část

**Pšenice tvrdá (*Triticum durum*)** pochází z oblasti Středozemního moře. Mimo to je rozšířena na Blízkém východě, na Ukrajině, v Rusku, Kanadě, USA a Argentině. V Evropě se kromě Středomoří pěstuje v teplejších oblastech Německa, Rakouska, Maďarska i Slovenska. V České republice se pšenice tvrdá pěstovala v omezené míře na jižní Moravě. Pšenice tvrdá patří mezi tetraploidní pšenice, je převážně jarního charakteru. Ozimé formy jsou málo zimovzdorné a mrazuvzdorné. Podobně jako pšenice setá je i pšenice tvrdá náročná na kvalitu půdy. Nejvhodnější pro její pěstování jsou hluboké, středně těžké, hlinité půdy s dostatečnou zásobou živin a vláhy, především na počátku vegetace. Má i vyšší nároky na teplo. Proto se jí nejlépe daří v oblastech s dlouhým, teplým a poměrně suchým létem. Pšenice tvrdá se sklízí na počátku žluté zralosti. Deštivé počasí v době dozrávání negativně ovlivňuje kvalitu. Snižuje se sklovitost, endosperm šedne [3].

**Chemické složení:** Obsah bílkovin se podle odrůdy a ročníku pohybuje mezi 14 % až 16 %. Pšenice tvrdá obsahuje více než 32 % lepku. Sklovitost by měla být nad 90 %, objemová hmotnost nad 785 g/l. Hodnoty sedimentačního indexu Zelenyho testu jsou velmi nízké:  $3,3 \pm 1,2$ . Endosperm je tvrdý, barvy světle jantarové [4,5]. Endosperm pšenice tvrdé má většinou vyšší obsah minerálních látek než endosperm pšenice seté. V řadě zemí je obsah popela kritériem kvality třídění/vysévání semoliny z pšenice tvrdé stanoveným zákonem nebo požadovaným trhem. Nejnovější výzkumy ale naznačují, že obsah minerálních látek nemá k jakosti příliš velký přímý vztah, pokud není spojen s otrubami nebo jinou kontaminací. Proto bude pravděpodobně ve směrnících uváděn jen jako látka vztahující se k bezpečnosti potravin, ne jako kritérium pro potřeby trhu [6].

**Hlavním využitím** pšenice tvrdé je výroba těstovin. Hrubá mouka z pšenice tvrdé se nazývá semolina. Těsto ze semoliny má být kompaktní, viskózní, pružné, netrhavé, nelepivé a dostatečně plastické. Těstoviny vyrobené z mouky získané semletím pšenice tvrdé jsou nelepivé, po uvaření si uchovávají svůj původní tvar. Oproti jiným druhům pšenice má tato pšenice mnohem tvrdší a větší zrna, která jsou jantarově zabarvená. Objemová hmotnost je větší, obsah bílkovin minimálně 14 %. Pšenice tvrdá je vhodná na výrobu těstovin i pro výrobu nekynutého pečiva (sušenky, oplatky) [4].

### **3 Experimentální část**

#### **3.1 Rozšíření kalibračních závislostí na stanovení sušiny, dusíkatých látek (N-látek), škrobu a tvrdosti pšenice seté získaných metodou NIRs o vzorky pšenice tvrdé**

Vytvoření NIR kalibračního modelu pro daný parametr spočívá ve vztažení informace získané absorpcí v NIR oblasti s hodnotou stanovenou laboratorní referenční metodou (LRM) do vzájemného poměru a získání regresní závislosti.

**Stanovení metodou NIR spektroskopie** je uvedeno v JPP Testování odrůd (JPP TO) 50050.1 Stanovení vybraných parametrů v rostlinném materiálu metodou NIRS [7]. Pro vytvoření přesného NIR kalibračního modelu je obecně základním požadavkem dostatečný počet stanovených vzorků analyzovaných klasickými laboratorními metodami (LRM). ÚKZÚZ je v rámci ČR zcela ojedinělým pracovištěm zaměřeným na tento typ laboratorního testování. Požadavek na dostatečné množství vzorků pro vytvoření robustních kalibračních modelů byl spolehlivě splněn. Pro správný vývoj NIR kalibračního modelu je důležité, aby koncentrační rozsah kalibrovaného parametru byl co možná nejvyšší.

V následující části zprávy jsou velmi stručně popsány klasické laboratorní metody mokré chemie, pomocí kterých byly získány referenční hodnoty použité pro doplnění kalibračních modelů NIRs pro pšenici tvrdou (*Triticum durum*). Výsledek referenčních hodnot v kalibraci je uváděn jako průměr ze dvou paralelních stanovení.

**Stanovení obsahu vlhkosti v obilninách** je uvedeno v JPP TO 50001.1 Stanovení obsahu vlhkosti [7]. Obsah vlhkosti se stanoví vázkově jako úbytek hmotnosti po vysušení vzorku při 130 °C.

**Stanovení obsahu dusíkatých látek** (hrubého proteinu) je uvedeno v JPP Zkoušení krmiv 10011.1 Stanovení obsahu dusíkatých látek [8]. Dusíkaté látky se stanoví metodou podle Kjeldahla, a to titračně alkalimetry (acidimetry) po mineralizaci vzorku horkou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru převedením na síran amonný, dále vytěsněním amoniaku hydroxidem sodným a jeho předestilováním do kyseliny sírové (borité).

**Stanovení obsahu škrobu** je uvedeno v JPP TO 50030.1 Stanovení obsahu škrobu [7]. Obsah škrobu se stanoví polarimetry. Po hydrolyze vzorku kyselinou chlorovodíkovou a odstranění bílkovin Caressovými činidly se změří optická otáčivost a provede se korekce na opticky aktivní látky rozpustné ve směsi ethylalkohol - voda.

**Stanovení tvrdosti zrna** vychází z americké standardní normy AACC 55-30 [9] Index velikosti částic pro pšenici (Particle size index – PSI). Metoda spočívá v standardním mletí zrna a prosévání na síť 0,075 mm. Nižší podíl propadu sítím je u tvrdšího endospermu s nižší hodnotou PSI. Zrno se mele na laboratorním mlecím automatu Bühler MLU 202. Hodnota PSI se vypočte podle vztahu

$$\text{PSI \%} = (\text{hmotnost propadu pod sítím 0,075 mm (g) / hmotnost vzorku (g)}) \times 100$$

### **3.2 Další stanovení použita pro charakterizaci pšenice tvrdou (Triticum durum)**

**Stanovení čísla poklesu (CP)** je uvedeno v JPP TO 50140.1 Stanovení čísla poklesu [7]. Stanovení je založeno na schopnosti vodní suspenze mouky nebo cereálního produktu rychle zmazovatět ve vroucí vodní lázni a na měření ztekucení škrobu, ke kterému dochází působením  $\alpha$ -amylázy přítomné ve vzorku. Ztekucení ovlivňuje odpor škrobového gelu vůči viskozimetrickému míchadlu o určenou vzdálenost.

**Stanovení sedimentačního indexu – Zelenyho test** je uvedeno v JPP TO 50150.1 Stanovení sedimentačního indexu – Zelenyho test [7]. Podstata zkoušky je založena na schopnosti bílkovin mouky bobtnat v kyselém prostředí. Ze zkoušené mouky, připravené z pšenice za přesně stanovených podmínek mletí a prosévání, se připraví suspenze v roztoku kyseliny mléčné a isopropanolu s přídavkem barviva. Po určité době protřepávání a klidu se stanoví objem sedimentu vzniklého sedimentací částic mouky. Takto zjištěný objem sedimentu je ukazatelem kvality lepkové bílkoviny.

**Stanovení obsahu popela gravimetricky** je uvedeno v JPP TO 50135.1 Stanovení obsahu popela v mouce [7]. Zkušební vzorek se spaluje v oxidační atmosféře při  $(550 \pm 10) ^\circ\text{C}$ , dokud nedojde k úplnému rozkladu organických látek. Po vychladnutí se popel zváží.

#### **Stanovení obsahu barevného pigmentu v pšenici**

**A) Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC** je popsáno v JPP TO 50210.1 Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC [7]. Karotenoidy (lutein, lykopen i  $\beta$ -karoten) se ze vzorku vhodným způsobem extrahují a následně se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se spektrofotometrickou detekcí ve viditelné oblasti při 450 nm (lykopen 503 nm).

**B) Stanovení obsahu barevného pigmentu v pšenici tvrdé (*Triticum durum*)** je uvedeno v ČSN EN ISO 11052 (461501) [10] Mouka a semolina z pšenice tvrdé (durum) - Stanovení obsahu žlutého barviva. Karotenoidy se extrahují ze vzorku šrotu pšenice tvrdé vodou nasyceným roztokem n-butanolu a následně se stanoví spektrofotometricky při 440 nm. Obsah žlutého pigmentu je definován jako obsah extrahovatelných karotenoidů endospermu vyjádřený v miligramech  $\beta$ -karotenu na 100 g sušiny vzorku.

**Stanovení obsahu mokrého lepku a gluten indexu** v pšenici tvrdé je uvedeno v návodu k obsluze přístroje Glutomatic 2200 a odstředivky 2015 [11] Metoda mechanické přípravy mokrého lepku a následně stanovení gluten indexu podle Pertena jako charakteristiky lepku. Lepek získaný ze šrotu na přístroji Glutomatic 2200 se odstřeďuje a protlačuje speciálním sítkem za standardních podmínek. Celková hmotnost lepku je definována jako obsah mokrého lepku. Procento lepku, zůstávající na sítku po odstředění je definováno jako gluten index.

## **4 Výsledky a diskuse**

### **4.1 Optimalizace postupu na stanovení vybraných parametrů pšenice seté i pšenice tvrdé metodou NIRs spektroskopie**

Vlastní kalibrační modely byly doplněny o hodnoty získané měřením vzorků pšenice tvrdé laboratorními referenčními metodami. Došlo ke zpřesnění stávajících kalibračních závislostí dříve používaných pouze pro pšenici setou. Nejvíce se přídavek hodnot, získaných laboratorními referenčními metodami, projevil na zpřesnění kalibrační závislosti u stanovení tvrdosti.

Kalibrační modely se pro jednotlivé parametry každoročně doplňují o výsledky měření dalších vzorků, které reprezentují danou sklizeň. Tím dochází k dalšímu zpřesnění kalibračních modelů. Vzorky se melou na mlýnku Mill 3100 nebo Mill 120, se sítem o velikosti 0,8 mm a měří se na přístroji FT - NIRs Nicolet Antaris. Hodnoty sušiny naměřené NIRs se dále využívají pro stanovení čísla poklesu i sedimentačního indexu Zelenyho testu. Zjištěný obsah dusíkatých látek je výrazně ovlivněn dusíkatým hnojením, ročníkem a prostředím. Stoupající obsah N-látek má pozitivní vliv na povahu těsta a objem pečiva. Požadovaný obsah N-látek je podle ČSN 46 1100-2 u pšenice seté pro pekárenské využití nejméně 11,5 %; u pšenice pro nepečivářenské využití nejvýše 11,5 %. Pšenice tvrdá (*Triticum durum*) se od dalších druhů pšenice liší v řadě ukazatelů. Vykazuje vyšší objemovou hmotnost a vyšší hmotnost tisíce zrn. Zrna jsou v porovnání s pšenicí setou (*Triticum aestivum*) větší, jantarově zabarvená, mají mnohem tvrdší endosperm a vyšší obsah bílkovin.

Vzorky pšenice tvrdé použité na doplnění kalibrace NIR spektrometru pocházejí ze čtyř regionálních pracovišť ÚKZÚZ.

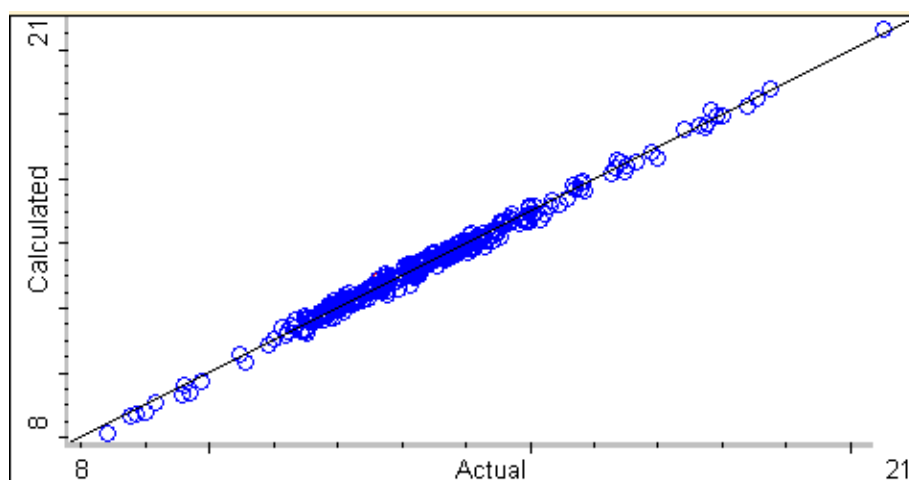
**Tabulka 1. Koncentrační rozsahy pro stanovené parametry ve vzorcích pšenice tvrdé.**

|                               | Sušina (%) | N-látky (%/s) | Škrob (%/s) | PSI (%) |
|-------------------------------|------------|---------------|-------------|---------|
| N <sub>K</sub> (počet vzorků) | 35(16)     | 35(16)        | 35(16)      | 35(16)  |
| Minimum                       | 88,9       | 12,5          | 64,2        | 4,7     |
| Maximum                       | 89,4       | 17,2          | 67,8        | 6,9     |
| Průměr                        | 89,1       | 14,8          | 67,4        | 5,7     |

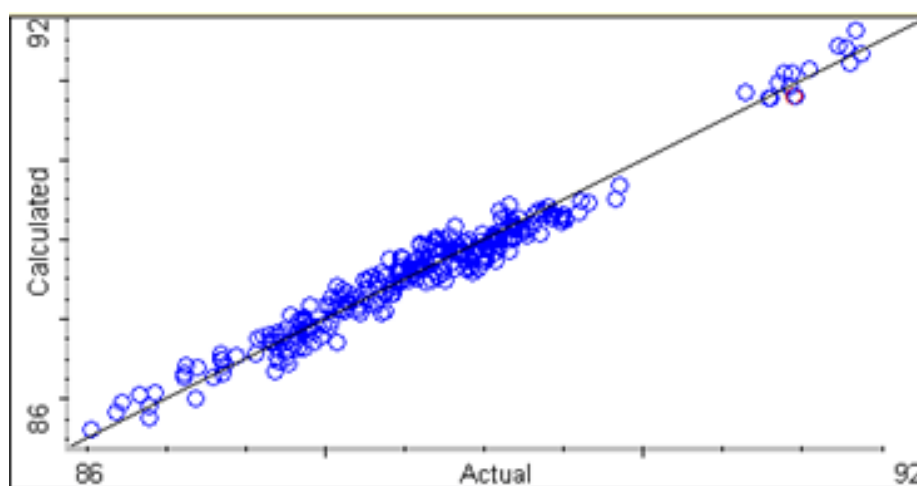
Výsledky referenčních hodnot uvedených parametrů získaných klasickými metodami mokré chemie jsou prezentovány jako průměr paralelních stanovení.

**Tabulka 2. Koncentrační rozsahy kalibračních závislostí doplněné o hodnoty pro stanovené parametry ve vzorcích pšenice tvrdé ze sklizně 2014.**

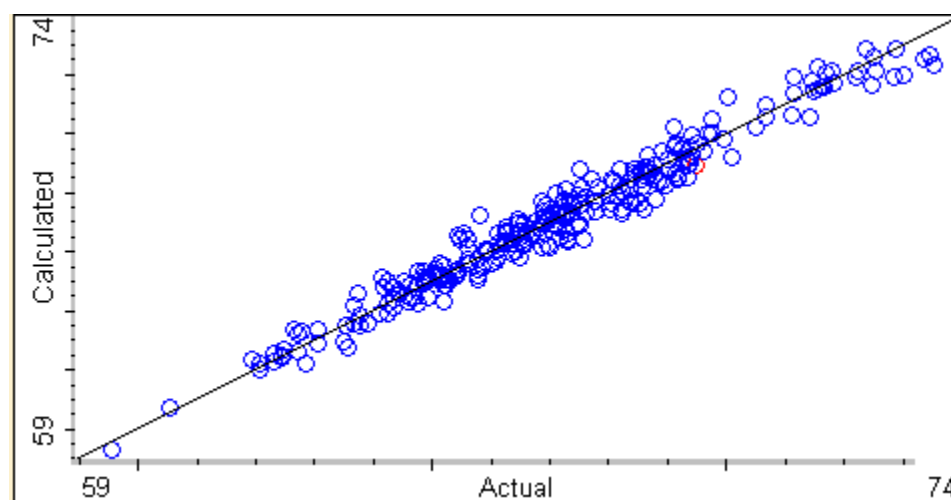
|                                             | Sušina (%) | N-látky (%/s) | Škrob (%/s) | PSI (%)  |
|---------------------------------------------|------------|---------------|-------------|----------|
| N <sub>K</sub> (počet vzorků pšenice tvrdé) | 269 (16)   | 304 (16)      | 270 (16)    | 607 (16) |
| Průměr doplněných hodnot pšenice tvrdé      | 89,1       | 14,8          | 67,4        | 5,7      |
| Minimum                                     | 86,5       | 8,1           | 59,6        | 4,2      |
| Maximum                                     | 91,6       | 20,5          | 73,5        | 28,1     |
| Průměr                                      | 89,1       | 14,3          | 66,7        | 16,2     |



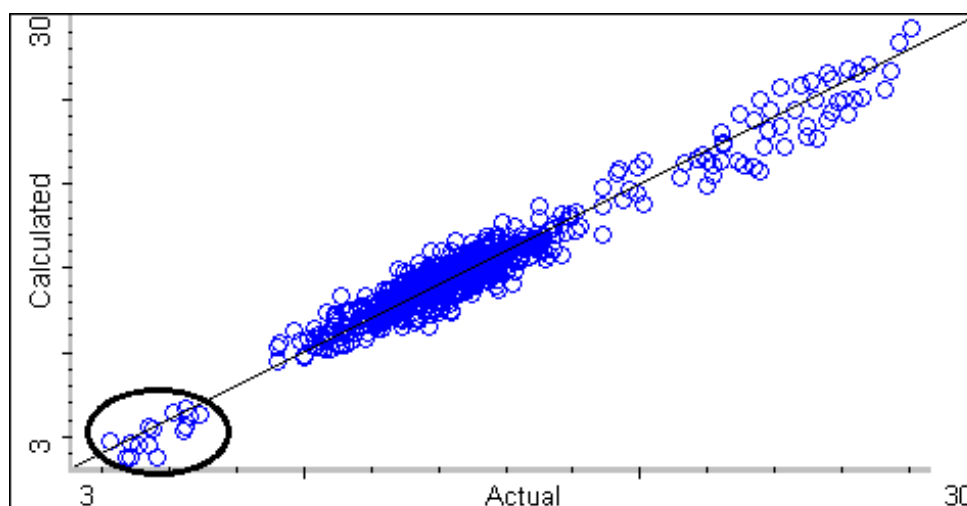
**Obrázek 1. Kalibrační závislost N-látek doplněná o hodnoty pro pšenici tvrdou.**



**Obrázek 2. Kalibrační závislost sušiny doplněná o hodnoty pro pšenici tvrdou.**



**Obrázek 3. Kalibrační závislost škrobu doplněná o hodnoty pro pšenici tvrdou.**



**Obrázek 4. Kalibrační závislost tvrdosti doplněná o hodnoty pro pšenici tvrdou.**

Z kalibračních závislostí jednotlivých parametrů stanovených metodou NIRs a tabulky 2 je zřejmé, že u parametru obsahu N-látek, sušiny a škrobu nedošlo ke změně kalibračních závislostí získaných pro pšenici setou. Hodnoty těchto parametrů leží v rozsahu již dříve zavedených a používaných kalibračních závislostí. Doplněním kalibrační závislosti pro parametr tvrdost došlo k rozšíření intervalu hodnot pro stanovení tohoto parametru.

Souhrnný přehled získaných kvalitativních parametrů kalibračních modelů stanovených regresní metodou PLS pro vybrané parametry v pšenici je uveden v tabulce 3.

**Tabulka 3. Kvalitativní parametry kalibračních modelů vzorků pšenice.**

| Parametr        | RMSECV | R    |
|-----------------|--------|------|
| Sušina (%)      | 0,18   | 0,98 |
| N-látky (%/s)   | 0,18   | 0,99 |
| Škrob (%/s)     | 0,99   | 0,92 |
| Tvrdost PSI (%) | 1,11   | 0,96 |

Legenda: RMSECV – střední kvadratická chyba predikce (CV - křížová validace); R – korelační koeficient.

Predikční schopnosti těchto vytvořených kalibračních modelů pro jednotlivá stanovení ve vzorcích pšenice byly ověřovány na souboru nezávislých vzorků, které nebyly zahrnuty do vývoje kalibračních modelů. Následným porovnáním výsledků získaných LRM a metodou NIR spektroskopie na testování shodnosti výsledků se ověřovala nulová hypotéza, že rozdíl

$|\bar{X}_A - \bar{X}_B|$  není statisticky významný na zvolené hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Pro testování

shodnosti byl použit Studentův test  $t$  [12]. Vypočtené hodnoty  $t$  testu byly porovnány s kritickou hodnotou  $t_{\alpha}$ . Získané výsledky pro jednotlivé parametry jsou prezentovány v tabulce 4.

**Tabulka 4. Kvalitativní parametry porovnání 2 analytických metod.**

| Parametr      | k  | $\bar{X}_A$<br>(LRM) | $\bar{X}_B$<br>(NIR) | $\alpha$ | t    | $t_{\alpha}(0,05)$ |
|---------------|----|----------------------|----------------------|----------|------|--------------------|
| sušina (%)    | 15 | 89,15                | 88,58                | 0,05     | 0,1  | 2,145              |
| N-látky (%/s) | 15 | 14,75                | 14,92                | 0,05     | 0,3  | 2,145              |
| škrob (%/s)   | 15 | 65,92                | 65,74                | 0,05     | 0,34 | 2,145              |
| tvrdost (%)   | 13 | 5,35                 | 5,92                 | 0,05     | 1,55 | 2,179              |

Legenda: k – počet vzorků;  $\bar{X}_A$  (LRM) – průměrná koncentrace získaná laboratorní referenční metodou;  $\bar{X}_B$  (NIR) – průměrná koncentrace získaná metodou NIR spektroskopie;  $\alpha$  – zvolená hladina významnosti (0,05); t – vypočtená hodnota Studentova testu t;  $t_{\alpha}$  – kritická (tabulková) hodnota Studentova testu t.

Z tabulky 4 je zřejmé, že vypočtené hodnoty  $t$  pro sušinu, N-látky, škrob a tvrdost jsou nižší oproti tabulkové (kritické) hodnotě  $t_{\alpha}$ . Z toho vyplývá, že metoda NIR spektroskopie v porovnání s laboratorní referenční metodou poskytuje statisticky shodné výsledky pro stanovení vybraných parametrů ve vzorcích pšenice seté. V tabulce 5 jsou uvedeny průměrné hodnoty základních parametrů vzorků pšenice tvrdé ve sklizních 2014 až 2016 získané měřeními na přístroji NIRs.

**Tabulka 5. Výsledky stanovení základních parametrů metodou NIRs vyjádřené jako průměr ze všech testovaných stanic ve sklizních 2014 až 2016.**

|         | 2014      | 2015  | 2016  | 2014    | 2015  | 2016  | 2014       | 2015  | 2016  | 2014      | 2015 | 2016 |
|---------|-----------|-------|-------|---------|-------|-------|------------|-------|-------|-----------|------|------|
| sklizeň | N.l.NIR/s |       |       | suš.NIR |       |       | škrobNIR/s |       |       | Z_tvrđost |      |      |
| vz.č.1  | 13,98     | 13,30 | 13,56 | 88,44   | 89,49 | 90,34 | 66,07      | 67,56 | 66,99 | 4,56      | 4,44 | 3,73 |
| vz.č.2  | 13,56     | 13,73 | 13,90 | 88,61   | 89,65 | 90,48 | 67,09      | 66,56 | 66,52 | 4,50      | 4,96 | 2,96 |
| vz.č.3  | 13,67     | 13,58 | 14,35 | 88,77   | 89,70 | 90,45 | 66,60      | 65,83 | 65,58 | 4,79      | 5,09 | 3,74 |
| vz.č.4  | 13,11     | 13,36 | 13,24 | 88,79   | 89,70 | 90,51 | 66,29      | 65,49 | 65,88 | 5,49      | 4,08 | 4,29 |
| vz.č.5  | 13,52     | 13,54 | 13,63 | 88,46   | 89,59 | 90,48 | 66,67      | 66,04 | 65,82 | 3,53      | 4,04 | 3,06 |

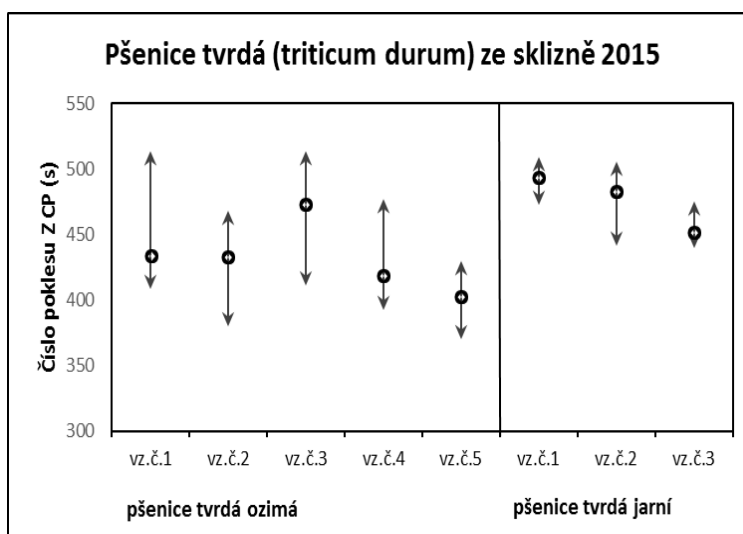
Legenda: N. l. NIR/s - obsah dusíkatých látek vyjádřený v sušině vzorku měřený metodou NIRs, Suš. NIR - sušina vzorku měřená metodou NIRs, škrob NIR/s - obsah škrobu vyjádřený v sušině vzorku měřený metodou NIRs, Z\_ tvrdost tvrdost zrna (PSI) vzorku měřený metodou NIRs.

## 4.2 Stanovení dalších parametrů pro hodnocení kvality pšenice tvrdé (*Triticum durum*)

**Číslo poklesu** určuje poškození zásobních látek endospermu hydrolytickými enzymy v důsledku procesu klíčení. Požadovaná úroveň pro pšenici setou je podle ČSN 46 1100-2 nejméně 220 s (mouky s nízkým CP – lepkavé těsto a chléb, s vysokým CP – suché těsto i malý objem pečiva). Na toto stanovení se využívá stejný vzorek proměřený na NIRs. Vlastní měření se provádí na přístrojích Falling Number 1700 nebo 1900, za pomoci míchacího zařízení Shakematic. Hodnoty čísla poklesu u pšenice tvrdé ozimé (*Triticum durum*) ze sklizně 2014 i 2016 a pšenice tvrdé ozimé i jarní ze sklizně 2015 byly v 6 až 7 lokalitách (CAS, CHR, LED, OBL, PJA, UHO, VER, ZAT) ovlivněny lokalitou a počasím (tabulka 6). Stejně ovlivnění se projevilo i v případě stanovení pšenice seté (*Triticum aestivum*).

**Tabulka 6. Porovnání výsledků čísla poklesu u vzorků pšenice tvrdé ze sklizně 2014 až 2016. Graf 1. Rozpětí hodnoty stanovení čísla poklesu získané ze 7 lokalit u vzorků pšenice tvrdé ze sklizně 2015.**

| sklizeň             | 2014 | 2015 | 2016 |
|---------------------|------|------|------|
|                     | Z CP |      |      |
|                     | (s)  |      |      |
| pšenice durum ozimá |      |      |      |
| vz.č.1              | 217  | 433  | 208  |
| vz.č.2              | 246  | 432  | 215  |
| vz.č.3              | 327  | 472  | 333  |
| vz.č.4              | 240  | 418  | 278  |
| vz.č.5              | 246  | 402  | 235  |
| pšenice durum jarní |      |      |      |
| vz.č.1              |      | 493  |      |
| vz.č.2              |      | 482  |      |
| vz.č.3              |      | 451  |      |



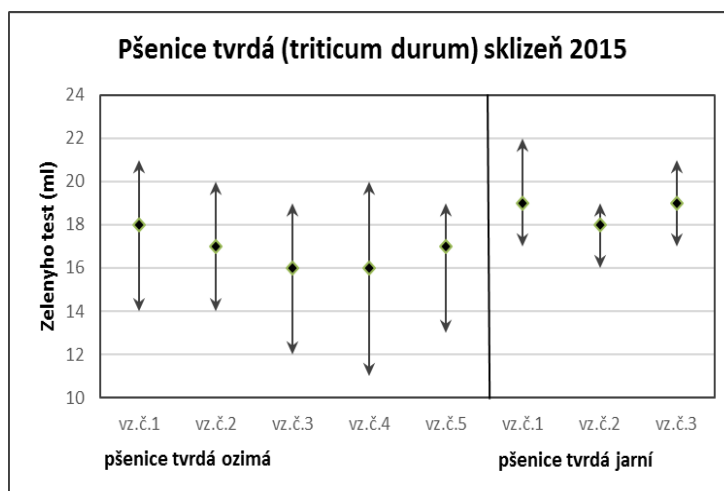
Legenda: Z CP – průměrné hodnoty čísla poklesu v zrna pšenice tvrdé v jednotlivých sklizních.

**Sedimentační index Zelenyho test** byl proveden na vybraném souboru vzorků. Získaná hodnota charakterizuje množství lepku, jeho bobtnací schopnost a koreluje s obsahem N-látek i objemem pečiva a je dána odrůdou. Požadovaná hodnota Zelenyho testu pro pšenici setou je podle ČSN 46 1100-2 u pšenice pro pekárenské využití nejméně 30 ml, u pšenice pro pečivářenské využití nejvýše 25ml. Vzorky byly po hydrotermické úpravě namlety na mlýnku Sedimat–Brabender. Po vytřepání na třepáče Brabender byla v odměrných válcích odečtena hodnota získaného sedimentu. V literatuře se uvádějí velmi nízké hodnoty

sedimentačního indexu Zelenyho testu u pšenice tvrdé:  $(3,3 \pm 1,2)$  ml. V laboratoři zjištěné hodnoty u pšenice tvrdé ozimé (*Triticum durum*) ze sklizně 2014, 2016 a pšenice tvrdé (*Triticum durum*) ozimé i jarní ze sklizně 2015 se ve 3 pěstovaných lokalitách (CHR, PJA, UHO nebo VER) pohybovaly mezi 10 ml až 22 ml (tabulka 7).

**Tabulka 7. Porovnání výsledků stanovení sedimentačního indexu Zelenyho testu u vzorků pšenice tvrdé ze sklizně 2014 až 2016. Graf 2. Rozpětí hodnot stanovení sedimentačního indexu Zelenyho testu ve třech uvedených lokalitách u vzorků pšenice tvrdé ze sklizně 2015.**

| sklizeň             | 2014          | 2015 | 2016 |
|---------------------|---------------|------|------|
|                     | Zelenyho test |      |      |
|                     | (ml)          |      |      |
| pšenice durum ozimá |               |      |      |
| vz.č.1              | 13            | 18   | 15   |
| vz.č.2              | 13            | 17   | 19   |
| vz.č.3              | 15            | 16   | 15   |
| vz.č.4              | 16            | 16   | 19   |
| vz.č.5              | 12            | 17   | 12   |
| pšenice durum jarní |               |      |      |
| vz.č.1              |               | 18   |      |
| vz.č.2              |               | 19   |      |
| vz.č.3              |               | 19   |      |



V řadě zemí je **obsah popela** kritériem kvality semoliny z pšenice tvrdé stanovený zákonem nebo požadovaný trhem. Nejnovější výzkumy ale naznačují, že obsah minerálních látek nemá k jakosti příliš velký přímý vztah, pokud není spojen s otrubami nebo jinou kontaminací vztahující se k bezpečnosti potravin. Obsah popela v testované pšenici tvrdé se ve sklizni 2014 pohyboval v rozmezí  $(1,757 - 1,890)$  %. Z důvodu velmi malých rozdílů obsahu popela mezi vzorky ze sklizně 2014 se již stanovení v následující sklizni 2015 neprovádělo [6].

**Stanovení obsahu barevného pigmentu v pšenici:** Barva zrna běžných odrůd pšenice se označuje jako červená, i když se zpravidla jedná o různé odstíny okrového zabarvení. Vedle těchto pšenic existují i pšenice purpurové, modré a žluté, které se odlišují typem a uložením barviv. V případě purpurových pšenic se přírodní barviva způsobující zabarvení obilky – antokyany – ukládají zejména v perikarpu. Modrou barvu obilek způsobují také antokyany, ale ukládají se převážně v aleuronové vrstvě. Žluté zbarvení zrna pak způsobují karotenoidy. Antokyany i karotenoidy se vyznačují antioxidační aktivitou. Antioxidanty jsou látky, které jsou schopny vychytávat škodlivé volné radikály a působí tak pozitivně na zdraví člověka. Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny: karoteny a xantofyly. Karoteny neobsahují kyslík,

kdežto xantofyly jsou kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, ketony aj.) odvozené od karotenů. Xantofyly získaly svůj název z řeckého xanthos – žlutý a patří mezi ně i lutein a zeaxantin – nejzastoupenější karotenoidy v zrna pšenice se žlutým endospermem. U pšenice je více zastoupen lutein a v menší míře zeaxantin, který je více známý u kukuřice. Vysoký obsah karotenoidů byl obsažen v původních odrůdách obilovin (přibližně 1000 µg karotenoidů/100 g), ze kterých byly vyšlechtěny odrůdy současné. Pšenice setá (*Triticum aestivum*) obvykle obsahuje pouze kolem 200 µg karotenoidů/100 g. Obsah žlutých pigmentů se tedy snížil oproti původním odrůdám pětikrát. Genotypy s vyšším podílem žlutých pigmentů už téměř vymizely, protože typy bez pigmentů mají výrazně vyšší výnosy. V současném sortimentu pšenice jsou od roku 2011 registrovány dvě odrůdy se žlutým zabarvením endospermu – ozimá odrůda Citrus a jarní odrůda Luteus. Obě odrůdy splňují podle pekařské jakosti kritéria pro zařazení do třídy A – kvalitní s deklarací vysokého obsahu žlutého pigmentu. ÚKZÚZ Brno stanovoval obsah karotenoidů a z měření vyplývá, že vzorky žlutomoučných odrůd pšenice obsahují dvakrát více karotenoidů než pozdní odrůda elitní Akteur [13]. Srovnání hodnot obsahu barevného pigmentu vyjádřeného jako obsah xantofylu získaných metodou HPLC ve vzorcích ze sklizně 2014 až 2016 je uveden v tabulce 8.

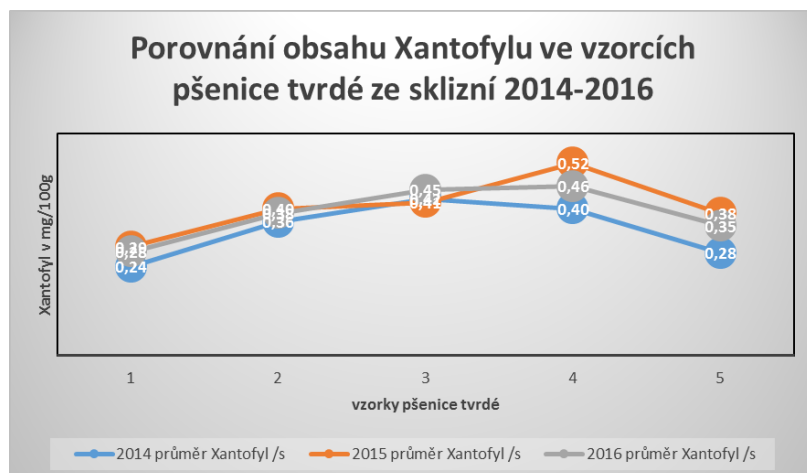
**Tabulka 8. Porovnání výsledků stanovení xantofylu u vzorků pšenice tvrdé ze sklizně 2014 až 2016.**

| Sklizeň | 2014        | 2015        | 2016        | průměr      |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|         | Xantofyl /s | Xantofyl /s | Xantofyl /s | Xantofyl /s |
| vz.č.1  | 0,24        | 0,29        | 0,28        | 0,27        |
| vz.č.2  | 0,36        | 0,40        | 0,38        | 0,38        |
| vz.č.3  | 0,42        | 0,41        | 0,45        | 0,43        |
| vz.č.4  | 0,40        | 0,52        | 0,46        | 0,46        |
| vz.č.5  | 0,28        | 0,38        | 0,35        | 0,34        |

Legenda: Xantofyl /s – hodnoty obsahu barevného pigmentu v sušině vzorku vyjádřené jako Xantofyl získané metodou HPLC v zrna pšenice tvrdé v jednotlivých sklizních

Graf 3 ukazuje žluté zbarvení ve vzorcích pšenice tvrdé vyjádřené jako obsah xantofylu ve sklizních 2014 až 2016.

**Graf 3. Porovnání hodnot stanovení xantofylu u vzorků pšenice tvrdé ze sklizně 2014 až 2016.**

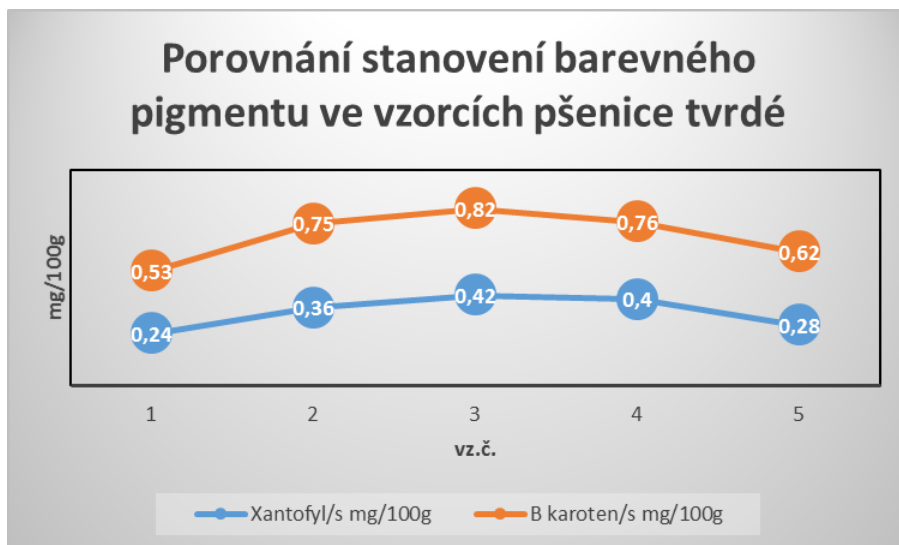


Porovnání výsledků dvou metod využitých pro stanovení barvy u pšenice tvrdou (*Triticum durum*) je uvedeno v tabulce 9. Jedná se o stanovení xantofylu (suma luteinu a stopového množství zeaxantinu) metodou HPLC, využitě již u pšenice seté a nově zavedeného spektrofotometrického stanovení barevného pigmentu v pšenici tvrdé podle platné ČSN EN ISO 11052.

**Tabulka 9. Porovnání výsledků stanovení barevného pigmentu jako stanovení xantofylu a  $\beta$  karotenu u vzorků pšenice tvrdé vyjádřené v sušině vzorku ze sklizně 2014 až 2015.**

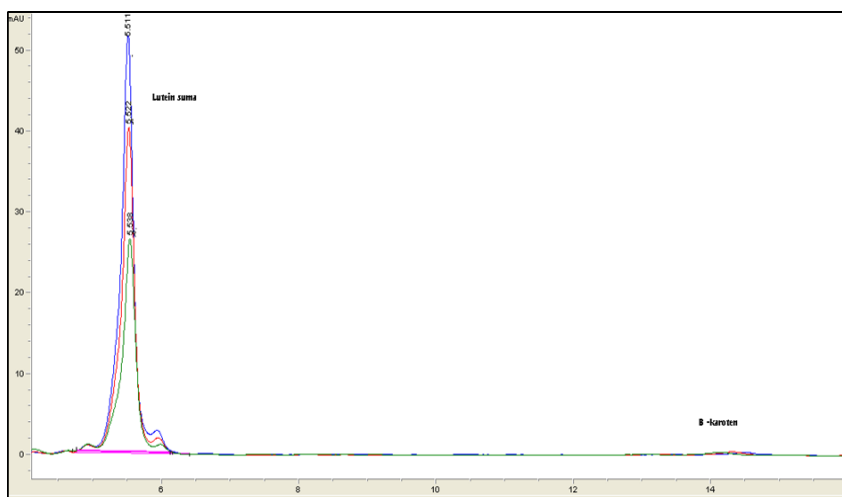
| Sklizeň | 2014       |                  | 2015       |                  | 2016       |                  | průměr      |                  |
|---------|------------|------------------|------------|------------------|------------|------------------|-------------|------------------|
|         | Xantofyl/s | $\beta$ -karoten | Xantofyl/s | $\beta$ -karoten | Xantofyl/s | $\beta$ -karoten | Xantofyl/s  | $\beta$ -karoten |
|         | mg/100g    |                  | mg/100g    |                  | mg/100g    |                  | mg/100g     |                  |
| vz.č.1  | 0,24       | 0,53             | 0,29       | 0,4              | 0,28       | 0,39             | <b>0,27</b> | <b>0,44</b>      |
| vz.č.2  | 0,36       | 0,75             | 0,40       | 0,6              | 0,38       | 0,57             | <b>0,38</b> | <b>0,64</b>      |
| vz.č.3  | 0,42       | 0,82             | 0,41       | 0,7              | 0,45       | 0,7              | <b>0,43</b> | <b>0,74</b>      |
| vz.č.4  | 0,40       | 0,76             | 0,52       | 0,72             | 0,46       | 0,69             | <b>0,46</b> | <b>0,72</b>      |
| vz.č.5  | 0,28       | 0,62             | 0,38       | 0,49             | 0,35       | 0,51             | <b>0,34</b> | <b>0,54</b>      |

**Graf 4. Porovnání hodnot stanovení barevného pigmentu vyjádřeného jako xantofyl metodou HPLC a beta-karoten spektrofotometrickou metodou a u vzorků pšenice tvrdé ze sklizně 2014.**



Z grafu 4 je zřejmé, že porovnání barevného pigmentu stanoveného jako obsah xantofylu s metodou HPLC a obsah  $\beta$ -karotenu spektrofotometrickou metodou, nedávají stejné výsledky. Srovnání jednotlivých vzorků pšenice tvrdé (*Triticum durum*) pak jednoznačně ukazuje, že zabarvení pšenice v jednotlivých vzorcích projevuje stejnou závislost tj. že vzorek č. 3 (sklizeň 2014) vykazuje nejvyšší obsah jak Xantofylu, tak i obsah barevného pigmentu vyjádřeného jako  $\beta$ -karoten.

**Chromatogram 1. Stanovení xantofylu metodou HPLC ve vzorcích pšenice tvrdé bez a se dvěma standardními přísadami standardu xantofylu.**



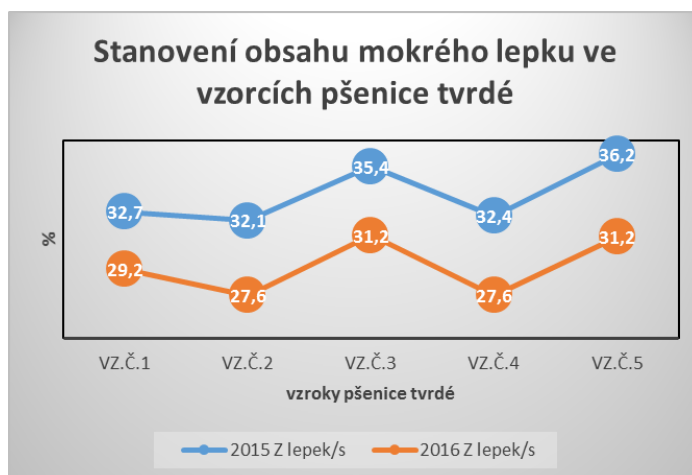
Pšenice tvrdá (*Triticum durum*) má vysoký obsah žlutých a oranžových karotenových barviv a je sklovitá. Na druhé straně je ale z praxe známo, že semolina s vysokým obsahem pigmentů neposkytuje vždy těstoviny s odpovídajícím jasně žlutým zabarvením, protože karoten

a xantofyl obsahují složky citlivé na působení enzymů peroxidázy a polyfenoloxidázy, které mají tendenci je ničit a redukovat tak intenzitu žlutého zabarvení. Proto je velmi důležité, aby pšenice tvrdá (*Triticum durum*) měla pokud možno, co nejnižší obsah těchto enzymů [13].

**Stanovení obsahu mokrého lepku a gluten indexu v pšeničném šrotu (gluten index podle H. Pertena):** Metoda mechanické přípravy mokrého lepku a následně stanovení gluten indexu podle Pertena jako charakteristiky lepku. Metoda je použitelná pro pšeničný šrot a mouku. Mokrá lepek je elastická látka obsahující gliadiny a gluteniny, která se získá vypíráním těsta z pšeničné mouky. Všechny tyto glykoproteiny se nacházejí společně se škrobem v endospermu zrna pšenice, a představují dokonce až 80 % z bílkovinného obsahu. Lepek je tužší a pružný. Čím více je lepku a méně škrobu v zrně, tím je lepší kvalita pšeničné mouky i těsta z ní vytvořeného. Dobrý lepek dává těstu pružnost a gumovost, která se projeví i na výsledném pečivu. Množství lepku v mouce se udává v procentech a kvalita lepku se uvádí pomocí bezrozměrné veličiny gluten index. Pšenice tvrdá obsahuje více než 32 % lepku. Pevný lepek zrn pšenice tvrdé se hlavně uplatní při výrobě kvalitních těstovin, případně sušenek a oplatků.

**Tabulka 10. Porovnání výsledků stanovení mokrého lepku a gluten indexu u vzorků pšenice tvrdé ze sklizně 2015, 2016. Graf 5. Porovnání hodnot stanovení mokrého lepku a gluten indexu u vzorků pšenice tvrdé ze sklizně 2015, 2016.**

| sklizeň                    | 2015      |      | 2016      |      |
|----------------------------|-----------|------|-----------|------|
|                            | Z lepek/s | Z GI | Z lepek/s | Z GI |
|                            | %         | -    | %         | -    |
| <b>pšenice tvrdá ozimá</b> |           |      |           |      |
| vz.č.1                     | 32,7      | 19   | 29,2      | 17   |
| vz.č.2                     | 32,1      | 61   | 27,6      | 69   |
| vz.č.3                     | 35,4      | 59   | 31,2      | 69   |
| vz.č.4                     | 32,4      | 41   | 27,6      | 50   |
| vz.č.5                     | 36,2      | 21   | 31,2      | 17   |



Legenda: Z lepek/s – obsah mokrého lepku ve šrotu zrn pšenice tvrdé vyjádřený v sušině

## 5 Závěr

Vzhledem ke zrušení normy ČSN 46 1100-3 (461100) Obilí potravinářské. Část 3: Pšenice tvrdá (*Triticum durum*) bylo nutné ověřit, zda všechna stanovení pro pšenici setou (*Triticum aestivum*), která laboratoř používá, jsou vhodná i jako stanovení charakterizující jakost pšenice tvrdou (*Triticum durum*). Kalibrační modely pro stanovení vybraných základních parametrů

(sušina, N-látky, škrob a tvrdost) metodou FT-NIR spektroskopie pro pšenici setou byly doplněny a optimalizovány i pro vzorky pšenice tvrdé. Z prezentovaných grafů kalibračních závislostí a hodnot kvalitativních parametrů (RMSECV, R) vytvořených kalibračních modelů na vzorcích upravených standardním mletím je zřejmé, že hodnoty sušiny, N-látek, škrobu a tvrdosti stanovené laboratorní referenční metodou a predikované metodou NIR spektroskopie spolu vysoce korelují ( $R = 0,98; 0,99; 0,92; 0,96$ ).

Zároveň byly ověřeny predikční schopnosti kalibračních modelů a tedy i porovnány dvě analytické metody. Prezentované výsledky potvrdily vhodnost metody NIR spektroskopie a lze ji tak doporučit pro predikování těchto sledovaných parametrů i v pšenici tvrdé.

Dále byla posouzena další stanovení navržená pro charakterizaci pšenice tvrdé (*Triticum durum*), tj. stanovení čísla poklesu, sedimentačního indexu - Zelenyho test, popela, barevného pigmentu i mokrého lepku a gluten indexu.

Hodnoty čísla poklesu u pšenice tvrdé, stanovené v 6 až 7 lokalitách ve sklizni 2014 a 2015, pak charakterizují vliv klimatických podmínek daného ročníku sklizně.

Hodnoty sedimentačního indexu Zelenyho testu u pšenice tvrdé, stanovené ve 3 pěstovaných lokalitách ve sklizni 2014 a 2015, se pohybovaly v nízkých hodnotách, které řadí testované vzorky pšenice tvrdé především pro využití na výrobu těstovin.

U stanovení obsahu popela se ukazuje, že obsah minerálních látek nemá k jakosti příliš velký přímý vztah, tudíž bylo toto stanovení prováděno pouze u vzorků ze sklizně 2014.

Obsah barevného pigmentu v pšenici byl stanoven metodou HPLC. Uvedenou metodou byl stanoven obsah xantofylu v jednotlivých vzorcích. Na pracovišti byla nově odzkoušena a zavedena i metoda podle ČSN EN ISO 11052 (46 1501): Mouka a semolina z pšenice tvrdé (*durum*) - Stanovení obsahu žlutého barviva. V případě hodnocení barevnosti u pšenice tvrdé vyjádřené jako obsah žlutého pigmentu je možné jako doplňkový parametr využít hodnoty barevného pigmentu vyjádřené jako obsah  $\beta$ -karotenu měřeného spektrofotometricky.

Další důležité znaky jako je objemová hmotnost, sklovitost i počet zahnědnutých špiček zrn se pro pšenici tvrdou hodnotí na odboru NOÚ.

Pšenice tvrdá (*Triticum durum*) nejlépe splňuje kritéria pro výrobu těstovin, kde je požadován vysoký obsah tuhého lepku a tvrdý endosperm zrna. Zrno pšenice tvrdé se vyznačuje obsahem pevného lepku, který není příliš vhodný pro pečení chleba a jiných pekárenských výrobků, neboť vytváří malý objem pečiva [17].

Pšenice tvrdá je nejenom velmi důležitým zdrojem lidské výživy, který má příznivé zdravotní účinky, ale přináší i potěšení z konzumace těstovin. Jakostní faktory, dříve posuzované subjektivně, se nyní hodnotí na základě analytického stanovení.

Pokroky ve šlechtění pšenice zaměřené na zvýšení jakosti proteinu zrna, výnosy a složení zrna, nové postupy pěstování, nové systémy mletí zahrnující debranning a třídění na základě barvy, stejně jako zdokonalené postupy extruze těstovin a techniky vysokoteplotního sušení stále podněcují zájem o těstoviny a pšenici tvrdou [12].

Všechny navržené parametry, které jsou důležité pro charakterizaci jednotlivých odrůd pšenice tvrdé, je pracoviště schopno stanovit. Tím se zajistí podklady pro správné hodnocení kvalitativních znaků pšenice tvrdé.

## 6 Literatura

1. D. Čižmár, R. Šulová: Vývoj kalibrační rovnice na tvrdost zrna a sušinu v celém zrně pšenice metodou FT-NIR spektroskopie, Bulletin NRL 2012, číslo 2/2012, ročník XVI, str. 35–46, ISSN 1801–9196.
2. Pšenice Obecná - cit.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/psenice.htm.
3. Plodiny - učební pomůcka - cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/plodiny2.pdf
4. Pšenice tvrdá - Zemědělská fakulta JU, [www2.zf.jcu.cz/~moudry/skripta/2/psenice\\_tvrdá](http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/skripta/2/psenice_tvrdá).
5. [www.nasevyziva.cz/clanek-tvrdá-psenice-semoliny-524.html](http://www.nasevyziva.cz/clanek-tvrdá-psenice-semoliny-524.html)  
[www.agronavigator.cz](http://www.agronavigator.cz)
6. Kabátová, N., Šulová, R., Ryšavý, P. a kol.: JPP Testování odrůd. ÚKZÚZ NRL Brno, 2012.
7. JPP Metody laboratorního zkoušení krmiv, ÚKZÚZ NRL, Brno 2016.
8. AACC 55-30: Index velikosti částic pro pšenici (Particle size index – PSI).
9. ČSN EN ISO 11052 (461501): Mouka a semolina z pšenice tvrdé (durum) - Stanovení obsahu žlutého barviva.
10. Návod k obsluze přístroje Glutomatic 2200 a centrifugy 2015, O.K.Servis BioPro.
11. Eckschlager, K., Horsák, I.: Dovolenaá difference výsledků paralelních stanovení. Vyhodnocování analytických výsledků a metod, 1. vydání, SNTL Praha, 1980.
12. D. Plucarová: Bakalářská práce: Možnosti uplatnění barevných pšenic v potravinářství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita, Brno 2015, str.17-18.
13. Centner, V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0.
14. [www.ireceptar.cz/pribeh-psenice-od-jednozrnky-a-kamenného-srpu-po-zlate-lany-a-kombajn.y](http://www.ireceptar.cz/pribeh-psenice-od-jednozrnky-a-kamenného-srpu-po-zlate-lany-a-kombajn.y)
15. [www.cs.wikipedia.org/Lepek](http://www.cs.wikipedia.org/Lepek).
16. Zimolka, J.: Pšenice, 1. vydání, ProfiPress, 2005.

# **Zavedení detekce GHB 119 a T304-40 u bavlny**

**Kateřina Staňková**

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno

## **1 Úvod**

Geneticky modifikované (dále GM) neboli transgenní rostliny jsou takové rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál pomocí genových technologií. Jedná se o změny cílené, tedy získané tak, že do rostliny vneseme nebo v ní cíleně deaktivujeme nějaké konkrétní geny.

Typy GM plodin

- Plodiny zlepšených vlastností (tolerance k herbicidům, rezistence vůči hmyzím škůdcům, rezistence k dalším biotickým a abiotickým stresům).
- Plodiny s přidanou hodnotou produktů (vyšší a kvalitativně zlepšen obsah olejů – řepka, sója, vyšší obsah lysinu – kukuřice, aj.).
- Plodiny, které produkují proteiny (využitelné ve farmacii, speciální enzymy pro průmyslové využití, produkty, které jsou základem bioplastů a biopaliv).

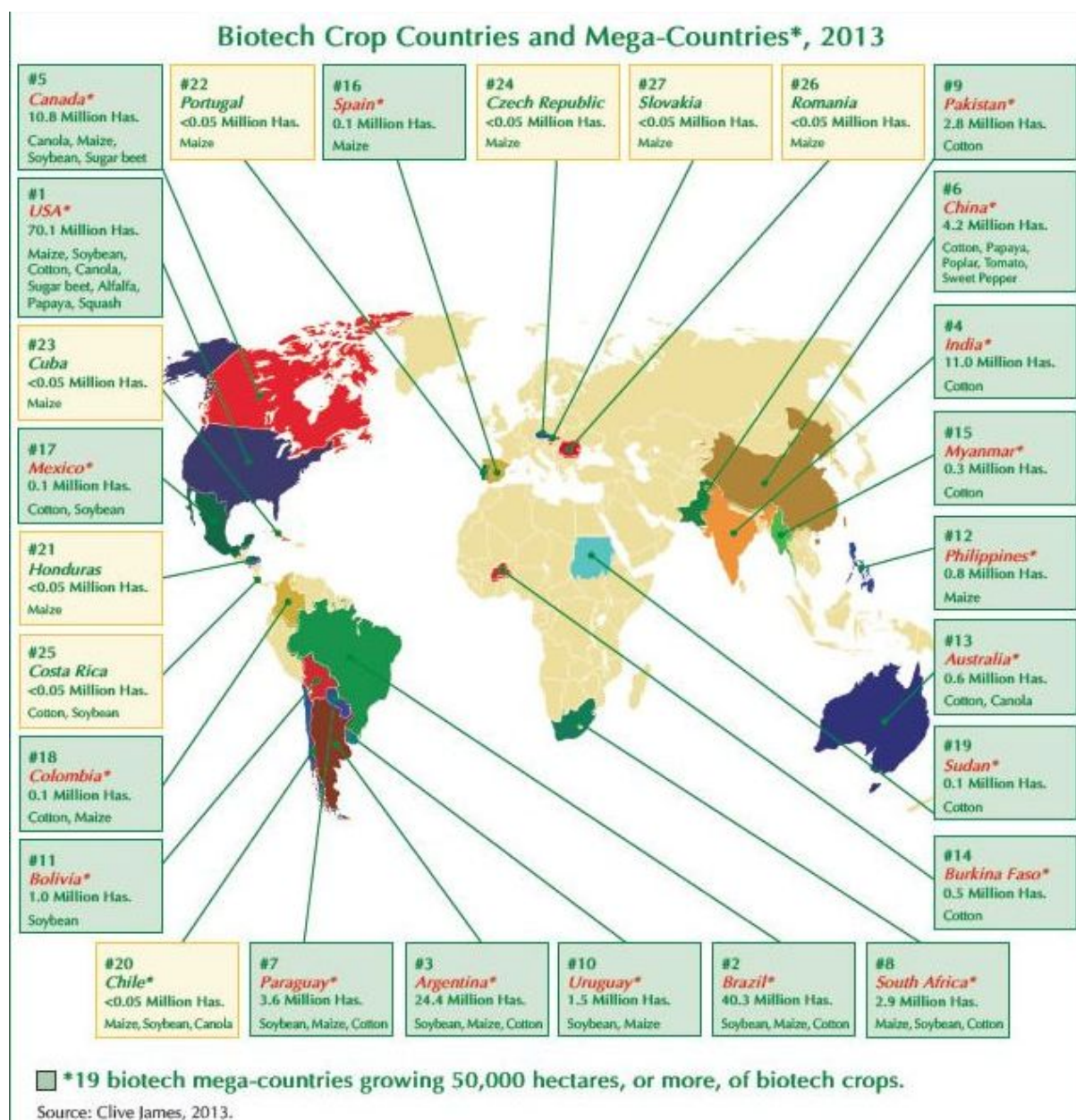
V roce 2013 se zabývalo pěstováním GM plodin 18 milionů zemědělců ve 27 zemích světa. Plocha GM plodin zaujímal celkem 175,2 milionů hektarů. Ve srovnání s rokem 2012 došlo k 3% nárůstu (5 mil. ha).

V posledních letech se na růstu využívané plochy podílejí především rozvojové země, zatímco v průmyslově vyspělých zemích se využívaná plocha nemění. Ve využití GM plodin vede Severní Amerika, následuje Jižní Amerika a Asie. Na ostatních kontinentech jsou využívány GM plodiny méně (viz obr. 1). Evropa je známá svým odmítavým postojem ke GM zemědělským plodinám. Pro pěstování jsou povolena pouze GM kukuřice MON810.

Z hlediska oseté plochy kukuřicí MON810 v Evropě stojí za zmínku pouze Španělsko. Česká republika, Slovensko, Portugalsko a Rumunsko pěstují GM kukuřici MON810 v zanedbatelné míře.

Co se týče GM plodin povolených pro dovoz do EU a následné použití jako potraviny a krmiva, je jejich počet větší. Důvodem je skutečnost, že Evropa není soběstačná v produkci krmiv, takže

musí značnou část potřebných komodit dovážet ze třetích zemí. Pro dovoz a použití na výrobu potravin a krmiv je povoleno celkem 58 GM plodin, a to 7 typů sóji, 37 typů kukuřice, 8 typů bavlníku, 3 typy řepky, 2 typy bakteriální biomasy a 1 typ cukrovky.



**Obrázek 1. Přehled zemí, ve kterých se v roce 2013 pěstovaly GM plodiny.**

| Rank         | Country        | Area<br>(million hectares) | Biotech Crops                                                       |
|--------------|----------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 1            | USA*           | 70.1                       | Maize, soybean, cotton, canola, sugar beet, alfalfa, papaya, squash |
| 2            | Brazil*        | 40.3                       | Soybean, maize, cotton                                              |
| 3            | Argentina*     | 24.4                       | Soybean, maize, cotton                                              |
| 4            | India*         | 11.0                       | Cotton                                                              |
| 5            | Canada*        | 10.8                       | Canola, maize, soybean, sugar beet                                  |
| 6            | China*         | 4.2                        | Cotton, papaya, poplar, tomato, sweet pepper                        |
| 7            | Paraguay*      | 3.6                        | Soybean, maize, cotton                                              |
| 8            | South Africa*  | 2.9                        | Maize, soybean, cotton                                              |
| 9            | Pakistan*      | 2.8                        | Cotton                                                              |
| 10           | Uruguay*       | 1.5                        | Soybean, maize                                                      |
| 11           | Bolivia*       | 1.0                        | Soybean                                                             |
| 12           | Philippines*   | 0.8                        | Maize                                                               |
| 13           | Australia*     | 0.6                        | Cotton, canola                                                      |
| 14           | Burkina Faso*  | 0.5                        | Cotton                                                              |
| 15           | Myanmar*       | 0.3                        | Cotton                                                              |
| 16           | Spain*         | 0.1                        | Maize                                                               |
| 17           | Mexico*        | 0.1                        | Cotton, soybean                                                     |
| 18           | Colombia*      | 0.1                        | Cotton, maize                                                       |
| 19           | Sudan*         | 0.1                        | Cotton                                                              |
| 20           | Chile          | <0.1                       | Maize, soybean, canola                                              |
| 21           | Honduras       | <0.1                       | Maize                                                               |
| 22           | Portugal       | <0.1                       | Maize                                                               |
| 23           | Cuba           | <0.1                       | Maize                                                               |
| 24           | Czech Republic | <0.1                       | Maize                                                               |
| 25           | Costa Rica     | <0.1                       | Cotton, soybean                                                     |
| 26           | Romania        | <0.1                       | Maize                                                               |
| 27           | Slovakia       | <0.1                       | Maize                                                               |
| <b>Total</b> |                | <b>175.2</b>               |                                                                     |

\* 19 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops

\*\* Rounded off to the nearest hundred thousand

Source: Clive James, 2013.

**Obrázek 2. Tabulka zobrazující přehled druhů pěstovaných GM plodin a počtu osetých hektarů v jednotlivých zemích světa.**

## 2 Cíl

Cílem práce bylo rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u bavlny. Nově zaváděnými transgeny jsou GHB 119 a T304-40.

### GHB 119

Geneticky modifikovaná odrůda bavlny GHB119 byla vytvořena, aby se získal bavlník, který je tolerantní k herbicidům na bázi glufosinátu amonného a současně je rezistentní vůči některým škůdcům z řádu Lepidoptera. Za toleranci k herbicidům je odpovědný vložený gen *bar* (Phosphinotricin N-acetyltransferase gen) z bakterie *Streptomyces hygroscopicus* kódující produkci enzymu fosfinitricinacetyl transferázu (PAT), která acetyluje L-glufosinát amonný a tím propůjčuje toleranci vůči herbicidům založených na glufosinátu amonném.

Rezistence vůči škůdcům je způsobena přítomností genu *cry2Ae* z bakterie *Bacillus thuringiensis subsp. dakota*. Gen *cry2Ae* je odpovědný za produkci proteinu Cry2Ae (Bt endotoxinu), který je účinný pro tlumení larev šedavky kukuřičné (*Helicoverpa zea*), černopáska tabákového (*Heliothis virescens*) a blýskavce kukuřičného (*Spodoptera frugiperda*).

Kromě výše uvedených genů obsahuje genový konstrukt promotory P-CsVMV a 35S a terminátory NOS3 a CaMV.

Promotor 35S, terminátor NOS a gen *bar* se v laboratoři stanovují v rámci screeningu.

Schéma genového konstruktů



**Obrázek 3. Schéma genového konstruktů genetické modifikace bavlny GHB 119.**

|         |                                                                                                                  |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lb      | Levá hraniční sekvence z bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .                                             |
| NOS 3   | Nopaline synthase terminátor.                                                                                    |
| Bar     | Sekvence kódující PAT enzym (phosphinothricin acetyl-transferáza) z bakterie <i>Streptomyces hygroscopicus</i> . |
| P-CsVMV | Konstitutivní promotor odvozený z viru mozaiky Cassava vein.                                                     |
| P-35S   | CaMV promotor.                                                                                                   |
| Cry2Ae  | Sekvence kódující Bt endotoxin z bakterie <i>Bacillus thuringiensis subsp. Dakota</i> .                          |
| T-35S   | CaMV terminátor.                                                                                                 |

RB                      Pravá hraniční sekvence transpozonu z bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.  
Geneticky modifikovaná bavlna GHB119 je součástí seznamu geneticky modifikovaných plodin, u kterých probíhá povolovací proces nebo u kterých uplynula doba povolení.

#### T304-40

Geneticky modifikovaná odrůda bavlny T304-40 byla vytvořena, aby se získal bavlník, který je tolerantní k herbicidům na bázi glufosinátu amonného a současně je rezistentní vůči některým larvám škůdců z řádu Lepidoptera. Za toleranci k herbicidům je odpovědný vložený gen *bar* (Phosphinotricin N-acetyltransferase gen) z bakterie *Streptomyces hygroscopicus* kódující produkci enzymu fosfinotricinacetyl transferázu (PAT), která acetyluje L-glufosinát amonný a tím propůjčuje toleranci vůči herbicidům založených na glufosinátu amonném. Rezistence vůči škůdcům je způsobena přítomností genu *cry1Ab* z bakterie *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Gen *cry1Ab* je odpovědný za produkci proteinu *cry1Ab* (Bt endotoxinu), který je účinný pro tlumení larev zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*).

Vedle výše uvedených genů obsahuje genový konstrukt promotory P7s7 a 35S a terminátory NOS3 a 3'mel.

Promotor 35S, terminátor NOS a geny *bar* a *cry1Ab* se v laboratoři stanovují v rámci screeningu.

Schéma genového konstrukt



**Obrázek 4. Schéma genového konstrukt genetické modifikace bavlny TC304-40.**

|        |                                                                                                                  |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LB     | Levá hraniční sekvence z bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .                                             |
| 3'mel  | Terminační sekvence odvozená od <i>Flaveria bidentis</i> .                                                       |
| Cry1Ab | Sekvence kódující Bt endotoxin z bakterie <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i> .                   |
| Ps7s7  | Duplikovaný promotor odvozený z viru "subterranean clover stunt".                                                |
| P-35S  | CaMV promotor.                                                                                                   |
| Bar    | Sekvence kódující PAT enzym (phosphinothricin acetyl-transferáza) z bakterie <i>Streptomyces hygroscopicus</i> . |
| 3'nos  | 3' terminační sekvence nopaline synthase genu z bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .                      |
| RB     | Pravá hraniční sekvence transpozonu z bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .                                |

Geneticky modifikovaná bavlna T304-40 je součástí seznamu geneticky modifikovaných plodin, u kterých probíhá povolovací proces nebo u kterých uplynula doba povolení.

### **3 Princip**

Základem metod detekce výše uvedených genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o hojně používanou metodu, při které dochází k mnohonásobnému zmnožení určitého úseku DNA.

PCR se provádí automatizovaně v termálním cykleru. Před vlastní PCR je důležité provést úplnou počáteční denaturaci DNA. Tím se zajistí, že při prvním kroku cyklu nedojde pouze k částečnému oddělení komplementárních řetězců, ale všechny molekuly původní DNA budou jednořetězcové a přístupné primerům. Následuje denaturační krok prvního cyklu. Během druhého kroku, tzv. annealingu, přisedají primery ke specifickým sekvencím matricové DNA. Primery jsou navrženy tak, že se vážou k protilehlým řetězcům dvoušroubovice 3'-konci směrem k sobě a vymezují délku amplifikovaného úseku. Ve třetím kroku cyklu jsou primery prodlužovány DNA-polymerázou ve směru od 5'-konce ke 3'-konci, tzv. extenze. Následující cyklus začíná opět denurací dvouvláknové DNA a vše se opakuje. Vzhledem ke specifické sekvenci primerů je amplifikovaný úsek mezi nimi stále stejný. Celkový produkt PCR se nazývá amplikon. Má definovanou délku pohybující se od desítek až po tisíce párů bazí (bp), která se stanoví pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

## **4 Materiál a metody**

### **4.1 Přístroje a pomůcky**

Analytické váhy.

Váhy s přesností 0,01 g.

Vortex.

Centrifuga.

Vodní lázeň.

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

Minitřepačka.

Laminární box.

Termální cykler.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Elektroforetická vana a zdroj napětí.

Transiluminátor.

Fotodokumentační zařízení se softwarem.

pH metr.

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

Plastové zkumavky o objemu 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.

Výrobník ledu.

Přenosná UV lampa.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, stojánky na zkumavky, nádoba na uchování ledu, odpadní nádoby.

Sterilizace a dekontaminace se provádí podle charakteru materiálu buď tepelně v sušárně 1 h při (115 – 120) °C nebo chemicky např. 70% etanolem, (0,5 – 1)% chlornanem sodným, apod.

## 4.2 Chemikálie

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

Lysis Buffer CF.

Buffer C2.

Buffer C3.

Wash buffer CQW.

Wash buffer C5 (koncentrát).

Elution buffer CE.

NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).

Proteinase K (lyofilizát).

Proteinase buffer PB.

REDTaq®ReadyMix™PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich

REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (dále REDTaq).

PCR voda.

Amplifikační primery

KVM157: CAC ATG ACT TAG CCC ATC TTT GC.

KVM 158: CCC ACC CTT TTT TGG TTT AGC.  
35s-cf3: CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG.  
35s-cf4: TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C.  
NOS-1: GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG.  
NOS-3: TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA.  
HA-nos118-f: GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG.  
HA-nos118-r: GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC.  
RapB-F1: ACA AGC ACG GTC AAC TTC C.  
RapB-R1: GAG GTC GTC CGT CCA CTC.  
CRY2-F: CCC ATC GAC ATC AGC CTG AGC.  
CRY2-R: CAG GAA GGC GTC CCA CTG GC.  
SHA021: CCA GTA CTA AAA TCC AGA TCA TGC A.  
NEL109: GAA ATT GCG TGA CTC AAA TTC C.  
SHA029: AGC GCG CAA ACT AGG ATA AAT T.  
SHA030: CCT AGA TCT TGG GAT AAC TTG AAA AGA.

Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE

Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Na<sub>2</sub>EDTA.

Trizma base.

Ledová kyselina octová.

Hydroxid sodný, c(NaOH) = 1 mol/l. Příprava: 10 g NaOH se rozpustí ve vodě a doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.

### **Příprava TAE pufru**

Příprava zásobního roztoku 50 × TAE

#### **1. Příprava 0,5 M zásobního roztoku EDTA**

186,1 g Na<sub>2</sub>EDTA se vmíchá do (750 – 800) ml (re)destilované vody. Na<sub>2</sub>EDTA se úplně nerozpustí, dokud nebude pH vyšší než 7,0. pH se upraví na 8,5 přidáním NaOH. Potom se doplní (re)destilovanou vodou do objemu 1000 ml. Přefiltruje se přes fritu předem ošetřenou 30 min až 1 hod při (115 – 120) °C přes hustý filtrační papír. Roztok se skladuje neomezeně při laboratorní teplotě.

## 2. Příprava 2 M Tris:

Náváží se 242 g Trizma base a rozpustí v 650 ml (re)destilované vody. Přidá se 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml předem připraveného 0,5 M zásobního roztoku EDTA (pH 8,5). Doplní se (re)destilovanou vodou do celkového objemu 1000 ml. Neautoklávuje se. Uchovává se v těsně uzavřené láhvi při laboratorní teplotě.

Příprava pracovního roztoku  $1 \times \text{TAE}$  pro elektroforézu

Odměří se 20 ml zásobního roztoku  $50 \times \text{TAE}$  a doplní se (re)destilovanou vodou do objemu 1000 ml.

### **Příprava agarózového gelu**

Používá se 0,8% gel pro stanovení kvality vyizolované DNA (0,64 g agarózy) a 2% gel pro hodnocení amplifikačních fragmentů (1,6 g agarózy nebo agarózy High Resolution). Do Erlenmeyerovy baňky se naváží dané množství práškové agarózy a přidá se 80 ml pracovního  $1 \times \text{TAE}$  pufru. Vaří se (15 – 20) min při (150 – 200) °C na elektromagnetickém míchadle do doby, až se vyčeří roztok a vzduchové bubliny vymizí i po krouživém zamíchání. Mezitím se připraví nalévací vana a vhodný hřebínek.

Po mírném zchladnutí se přidá 10 µl pracovního roztoku ethidiumbromidu (interkalační barvivo sloužící ke zviditelnění DNA v gelu) a míchá se 1 min. Poté se vyjme míchadélko a agar se nalije do vany s hřebínkem. Asi po (20 – 30) min, v závislosti na teplotě prostředí, lze opatrně vyjmout hřebínek a přenést gel z nalévací vany do elektroforetické vany s pracovním roztokem  $1 \times \text{TAE}$  pufru.

### **Ostatní**

Voda vhodná pro PCR.

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

(re)destilovaná voda.

Agaróza.

Zásobní roztok ethidium bromidu. Pracovní roztok se získá zředěním zásobního roztoku  $10 \times$  (re) destilovanou vodou.

Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. GeneRuler™50bp DNA Ladder).

$6 \times$  Loading Dye Solution.

Elektroforetický hmotnostní marker pro genomovou DNA (např. EZ Load™ Molecular Ruler Precision Mass, Biorad).

(0,5 – 1)% roztok chlornanu sodného.

70% etanol.

iTaq DNA Polymerase 5 units/ $\mu$ l

### **Testovaný materiál**

Pozitivní kontroly se používají pro potvrzení přítomnosti amplifikovaného úseku.

Negativní kontroly se používají pro prokázání specifity reakce, a to jen v případě nově zaváděných genetických modifikací.

### **GHB119**

ERM<sup>®</sup>BF428b (naše označení CRM 4/2014) obsahující 1% bavlnu GHB119 z IRMM Institute for reference Material and Measurements (Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgie).

### **T304-40**

ERM<sup>®</sup>BF429b (naše označení CRM 5/2014) obsahující 1% bavlnu T304-40 z IRMM Institute for reference Material and Measurements (Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgie).

Obě pozitivní kontroly jsou ve formě bavlněného prášku a musí se z nich nejprve vyizolovat DNA.

## **4.3 Pracovní postup**

### **Izolace DNA**

Před začátkem vlastní izolace DNA je nutno připravit tyto roztoky:

Pufr C4: převede se kvantitativně celý obsah tuby obsahující pufr C2 do tuby s obsahem pufru C3 a dobře se promíchá. Výsledný pufr C4 je stabilní 1 rok, je-li uskladněný při laboratorní teplotě. Pro dokonalejší rozpuštění obou komponent se doporučuje inkubace 5 min při 45 °C.

Pufr C5: ke koncentráту pufru C5 se přidá (95 – 100)% etanol, a to v množství uvedeném na lahvičce pufru. Po zředění se označí přidání etanolu. Takto upravený pufr lze uchovávat při laboratorní teplotě 1 rok.

Proteináza K: k lyofilizované Proteináze K se přidá množství proteinázového pufru uvedené na jejím obalu. Roztok proteinázy K je při –20 °C stabilní 6 měsíců.

Vlastní izolace DNA probíhá v několika krocích, nejdříve se musí připravit pracovní plocha. Pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů 70% etanolem a 30min působením UV záření.

Vodní lázeň se předehřeje na 65 °C a lyzační pufr CF se nechá předehřát na 65 °C. Do 2ml zkumavky se naváží 200 mg zhomogenizovaného vzorku (pozitivní kontroly). Prvním krokem izolace DNA je buněčná lyze, kdy se ke vzorku přidá 550 µl lyzačního pufru CF, dobře promíchá (15 s), přidá se 10 µl proteinázy K a 10 µl RNázy A a opět se promíchá (2 – 3) s. Inkubuje se 30 min při 65 °C. Poté se směs 10 min centrifuguje (> 10000 g), až se buněčné zbytky usadí. Připraví se podmínky pro vázání DNA na silikagel, a to tak, že se převede 300 µl čistého supernatantu z kroku 3 do nové 2ml zkumavky. Přidá se 300 µl pufru C4 a 200 µl etanolu (96 – 100)% a vortexuje se 30 s. Tuba NucleoSpin se umístí do nové 2 ml centrifugační zkumavky a přidá se 750 µl směsi z předchozího kroku. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Následuje promývání DNA, které probíhá ve třech po sobě následujících krocích. V prvním promytí se napipetuje 400 µl pufru CQW do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Ve druhém promytí se napipetuje 700 µl pufru C5 do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Ve třetím promytí se napipetuje dalších 200 µl pufru C5 do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 2 min při 11000 g, aby se úplně odstranil pufr C5 (rezidua etanolu v promývacím pufru C5 mohou inhibovat enzymatickou reakci). Posledním krokem izolace DNA je eluce. Předehřeje se eluční pufr CE na 70 °C. Tuba NucleoSpin se umístí do nové centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml. Na membránu v NucleoSpin tubě se napipetuje 100 µl předehřátého elučního pufru CE. Inkubuje se 5 min při laboratorní teplotě a poté se centrifuguje 1 min při 11000 g, aby se shromáždila DNA.

Eluát obsahuje čistou genomovou DNA. Pro krátkodobé skladování se uchovává při (2 – 8) °C, pro dlouhodobé při -20 °C.

### **Měření koncentrace a určení kvality vyizolované DNA**

Důležitým krokem po vyizolování DNA je orientační spektrofotometrické stanovení její koncentrace, případně dalších příměsí a zjištění její kvality – celistvosti pomocí gelové elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu.

### **Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA**

Měření při vlnových délkách (230; 260; 280) nm umožní kromě stanovení koncentrace získané DNA i hodnocení čistoty vzorku. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem

absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbance při (260 a 280) nm a (260 a 230) nm.

Hodnoty poměru 260/280 se nejčastěji pohybují v rozmezí (1,7 – 2,0). Ideální hodnoty jsou (1,7 – 1,8). Jestliže je naměřená hodnota pod 1,7, je DNA znečištěná proteiny nebo jinými organickými látkami. Pokud je naměřená hodnota nad 1,9, je DNA znečištěná RNA nebo organickými látkami.

Hodnoty poměru 260/230 musí být vyšší než 1,5. Ideální hodnoty jsou (2,0 – 2,2). Pokud je naměřená hodnota nižší než 1,5 je získaná DNA kontaminována látkami jako jsou fenol a guanidinové soli.

### **Vlastní měření**

Koncentrace DNA se měří proti slepému vzorku, kterým je roztok, v němž je DNA rozpuštěná (v našem případě se jedná o eluční roztok z kitu NucleoSpin® Food). Použijí se 2 µl vzorku. Každý vzorek se měří 2 ×. Naměřené hodnoty se zprůměrují. Pro následnou PCR zpravidla vyhovuje koncentrace 5 ng/µl templátové DNA. Pokud je její koncentrace vyšší, je třeba ji na tuto hodnotu naředit vodou vhodnou pro PCR.

### **Určení kvality vyizolované DNA**

Pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu se zjistí kvalita vyizolované DNA (zda je celistvá nebo degradovaná), přítomnost RNA a proteinů.

Vzorky se smíchají s barvivem 6 × Loading Dye Solution v množství 2 µl barviva a 3 µl vyizolované DNA a spolu s Load Precision Molecular Mass standardem se nanesou do jamek gelu a spustí se elektroforéza (70 V, 75 min).

### **Polymerázová řetězová reakce**

Pro zavedení detekce nových genetických modifikací byly využity již zavedený JPP postup 10250.1 Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR a metody validované EURL.

Pro určení konkrétních transgenů se používají metody druhově specifické neboli event-specific, které se zaměřují na amplifikaci úseku mezi vložených konstruktem a vlastní genomovou DNA. Pomocí této metody lze rozlišit druhy transgenních organismů, které obsahují stejný genový konstrukt.

Sekvence jednotlivých amplifikačních primerů a amplifikační programy byly převzaty z metod validovaných v EURL. Při zavádění nových PCR detekcí se provedlo z důvodu opakovatelnosti pět na sobě nezávislých PCR reakcí (amplifikací).

### Vnitřní gen bavlny

primery: KVM157, KVM 158

amplifikační program:

|                             | Teplota (°C) | Čas (s) | Počet cyklů |
|-----------------------------|--------------|---------|-------------|
| <b>Dekontaminace</b>        | 50           | 120     | 1           |
| <b>Počáteční denaturace</b> | 95           | 600     | 1           |
| <b>Denaturace</b>           | 95           | 15      | 45          |
| <b>Anealing a extenze</b>   | 60           | 60      |             |

délka amplikonu: 73 bp

### Promotor 35S

primery: 35s-cf3, 35s-cf4

amplifikační program:

|                             | Teplota (°C) | Čas (s) | Počet cyklů |
|-----------------------------|--------------|---------|-------------|
| <b>Počáteční denaturace</b> | 94           | 60      | 1           |
| <b>Denaturace</b>           | 94           | 58      | 40          |
| <b>Annealing</b>            | 57,5         | 120     |             |
| <b>Extenze</b>              | 72           | 105     |             |
| <b>Závěrečná extenze</b>    | 72           | 180     | 1           |

délka amplikonu: 123 bp

### Terminátor NOS

primery: NOS-1, NOS-3

amplifikační program:

|                             | Teplota (°C) | Čas (s) | Počet cyklů |
|-----------------------------|--------------|---------|-------------|
| <b>Počáteční denaturace</b> | 94           | 60      | 1           |
| <b>Denaturace</b>           | 94           | 58      | 40          |
| <b>Annealing</b>            | 57,5         | 120     |             |
| <b>Extenze</b>              | 72           | 105     |             |
| <b>Závěrečná extenze</b>    | 72           | 180     | 1           |

délka amplikonu: 180 bp

**bar**

primery: RapB-F1, RapB-R1

amplifikační program:

|                             | <b>Teplota (°C)</b> | <b>Čas (s)</b> | <b>Počet cyklů</b> |
|-----------------------------|---------------------|----------------|--------------------|
| <b>Počáteční denaturace</b> | 95                  | 900            | 1                  |
| <b>Denaturace</b>           | 95                  | 10             | 45                 |
| <b>Annealing</b>            | 60                  | 15             |                    |

délka amplikonu: 60bp

**Cry1A(b)**

amplifikační primery: CRY2-F, CRY2-R

amplifikační program:

|                             | <b>Teplota (°C)</b> | <b>Čas (s)</b> | <b>Počet cyklů</b> |
|-----------------------------|---------------------|----------------|--------------------|
| <b>Dekontaminace</b>        | 50                  | 120            | 1                  |
| <b>Počáteční denaturace</b> | 95                  | 600            | 1                  |
| <b>Denaturace</b>           | 95                  | 15             | 45                 |
| <b>Annealing a extenze</b>  | 60                  | 60             |                    |

délka amplikonu: 129 bp

**GHB 119**

amplifikační primery: SHA021, NEL109

amplifikační program:

|                             | <b>Teplota (°C)</b> | <b>Čas (s)</b> | <b>Počet cyklů</b> |
|-----------------------------|---------------------|----------------|--------------------|
| <b>Dekontaminace</b>        | 50                  | 120            | 1                  |
| <b>Počáteční denaturace</b> | 95                  | 600            | 1                  |
| <b>Denaturace</b>           | 95                  | 15             | 45                 |
| <b>Annealing a extenze</b>  | 60                  | 60             |                    |

délka amplikonu: 90 bp

### T304-40

amplifikační primery: SHA029, SHA030

amplifikační program:

|                      | Teplota (°C) | Čas (s) | Počet cyklů |
|----------------------|--------------|---------|-------------|
| Dekontaminace        | 50           | 120     | 1           |
| Počáteční denaturace | 95           | 600     | 1           |
| Denaturace           | 95           | 15      | 45          |
| Annealing a extenze  | 60           | 60      |             |

délka amplikonu: 78 bp

### Provedení vlastní PCR reakce

Laminární box se vysvítlí UV zářením 20 až 30 min. Předměty v něm umístěné a jeho prostor se dekontaminují 70% etanolem. Připraví se pipety, sterilní špičky s filtrem, sterilní zkumavky, odpadní nádoba s vloženým sáčkem na použitý materiál, stojánky, apod.

Stanoví se počet reakcí (tj. počet vzorků, beztemplátová, negativní kontrola (použije-li se) a pozitivní kontrola). Podle tabulek reakčních směsí (Tabulka 1) se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. Jednotlivé reagenty se uchovávají v mrazáku, proto se musí předem rozmrazit, buď při laboratorní teplotě, nebo v lednici. Rozpuštěné obsahy zkumavek se promíchají převrácením nebo krátkým vortexováním a zcentrifugují se na minicentrifuze.

PCR směs se připravuje na ledu.

### REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>

Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce (Tabulka 1). Reakční směs se důkladně, ale opatrně promíchá (obracení zkumavky, vortex) a rozdělí se po 22,5 µl do označených zkumavek. Poté se do zkumavek přidá 2,5 µl templátové DNA. Do beztemplátové kontroly se místo DNA přidá voda vhodná pro PCR.

Pipetuje se v tomto pořadí: beztemplátová kontrola, negativní kontrola a nakonec pozitivní kontrola. Zkumavky se pečlivě zavíčkují, aby se zabránilo vypařování směsi během reakce. Promíchají se mírným poklepem, zcentrifugují se na minicentrifuze, vloží se do termálního cykleru a zahájí se příslušná PCR amplifikace.

**Tabulka 1. Složení reakční směsi REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>.**

| Složka                                                 | 1 reakce (μl) |
|--------------------------------------------------------|---------------|
| PCR voda                                               | 9             |
| REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl <sub>2</sub> | 12,5          |
| Primer F                                               | 0,5           |
| Primer R                                               | 0,5           |
| Templát                                                | 2,5           |

#### **Elektroforéza v agarózovém gelu**

2% gel se vloží do elektroforetické vany a převrství pracovním 1 × TAE pufrům několik mm nad jeho povrch. Vzorky se nanesou do jamek gelu v tomto pořadí: beztemplátová kontrola, negativní kontrola, elektroforetický marker, vzorky, elektroforetický marker a pozitivní kontrola. Objem vzorku nanášeného do jedné jamky závisí na typu hřebínku a jeho potřebném množství. Amplifikáty získané pomocí kitu REDTaq se nanášejí přímo z PCR zkumavek, protože obsahují nanášecí barvivo pro elektroforézu. Po nanesení kontrol a markerů do jamek v gelu se spustí elektroforéza. Doporučuje se nastavení zdroje (100 – 140) V, maximum mA, (30 – 60) min chodu. Tyto hodnoty lze měnit podle potřeby a pokynů v návodu pro použití elektroforetického zdroje. Rozdělení a uspořádání pruhů se sleduje prosvícením na transiluminátoru, vyfotografování a přenesením do počítače.

## **4.4 Výsledky a diskuse**

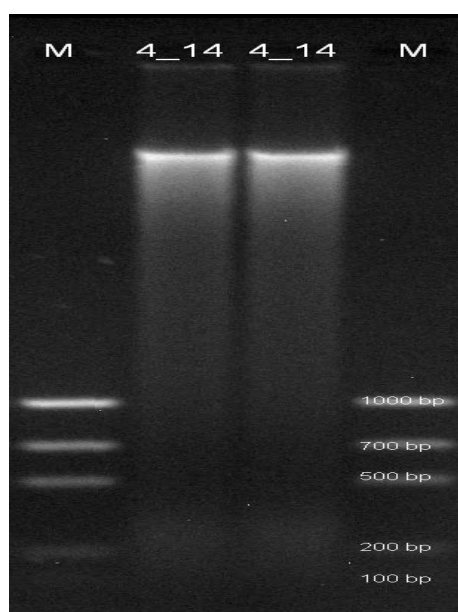
### **GHB119**

#### Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA

**Tabulka 2. Naměřené koncentrace a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA**

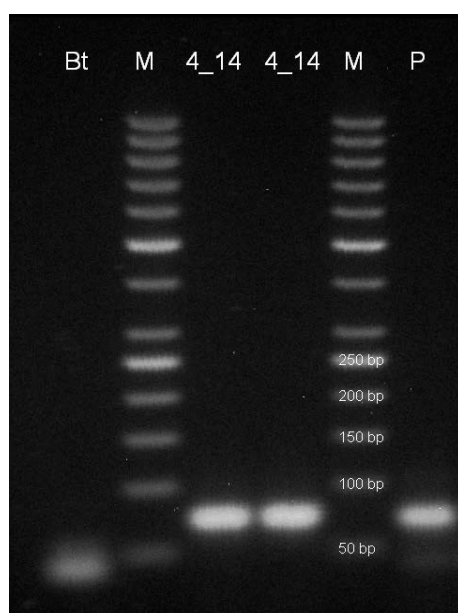
| Vzorky     | Koncentrace (ng/μl) | A260/A280 | A260/A230 |
|------------|---------------------|-----------|-----------|
| CRM 4/2014 | 31,30               | 1,81      | 1,93      |
| CRM 4/2014 | 31,60               | 1,80      | 1,91      |

### Určení kvality vyizolované DNA



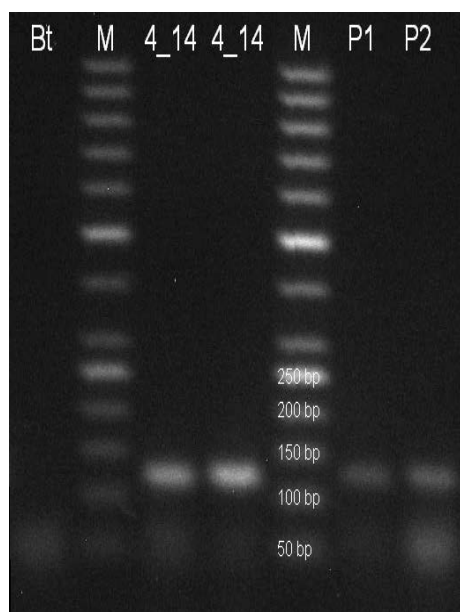
**Obrázek 5. Určení kvality vyizolované DNA pozitivní kontroly CRM 4/2014 (4\_14), K – kontrola izolace, M – hmotnostní standard.**

### Stanovení vnitřního genu bavlny



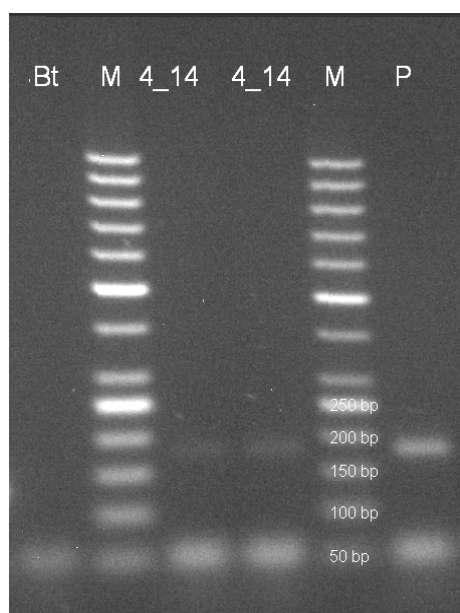
**Obrázek 6. Stanovení vnitřního genu bavlny (88 bp) u pozitivní kontroly CRM 4/2014 (4\_14), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 8/2012. Amplifikační kit REDTaq.**

#### Stanovení screeningového elementu promotoru 35S

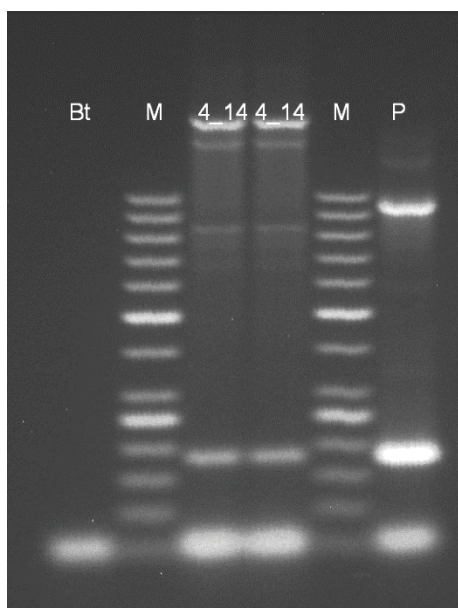


**Obrázek 7. Stanovení screeningového elementu promotor 35S (123 bp) u pozitivní kontroly CRM 4/2014 (4\_14), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 7/2013, P2 – pozitivní kontrola CRM 8/2013. Amplifikační kit REDTaq.**

#### Stanovení screeningového elementu NOS



**Obrázek 8. Stanovení screeningového elementu terminátor NOS (180 bp) u pozitivní kontroly CRM 4/2014 (4\_14), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 1/2011. Amplifikační kit REDTaq.**

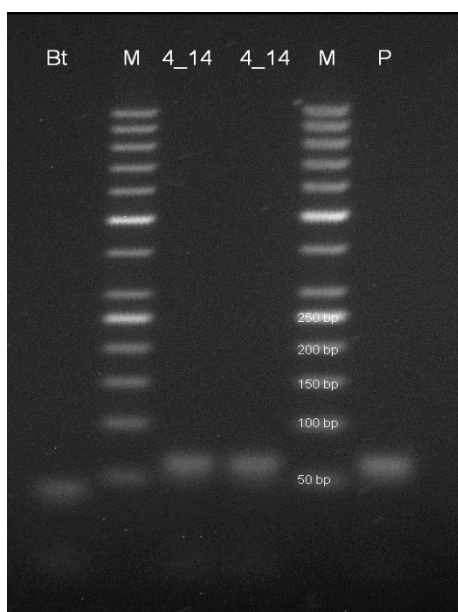


**Obrázek 9. Opakování screeningového elementu terminátor NOS (180 bp) u pozitivní kontroly CRM 4/2014 (4\_14), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 1/2011. Amplifikační kit REDTaq.**

V prvním případě stanovení terminátoru NOS byl použit klasický postup (viz Tabulka č. 1). Výsledkem jsou špatně viditelné pruhy v úrovni pozitivní kontroly (Obrázek 8). Proto byl tento postup modifikován zvýšením objemu primerů F i R na 1  $\mu$ l a přidáním iTaq polymerázy v množství 0,05  $\mu$ l na reakci.

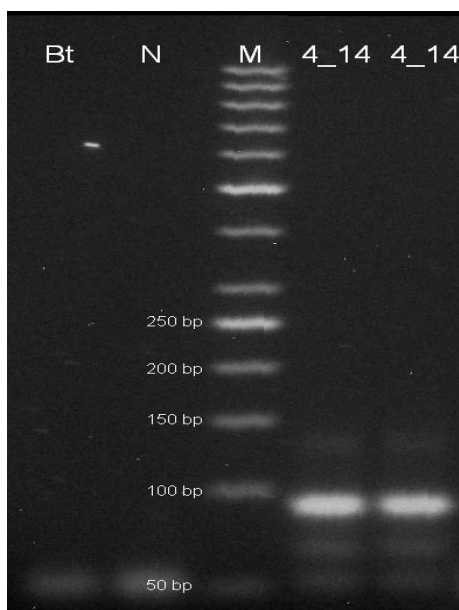
Z druhého výsledku (Obrázek 9) je zřejmé, že změnou postupu došlo ke zviditelnění pruhů a prokázání, že pozitivní kontrola CRM4/2014 obsahuje terminátor NOS.

#### Stanovení screeningového elementu bar

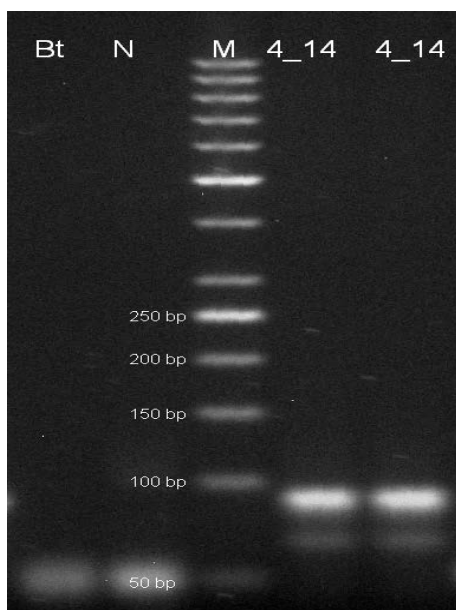


**Obrázek 10.** Stanovení screeningového elementu bar (60 bp) u pozitivní kontroly CRM 4/2014 (4\_14), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 23/2012. Amplifikační kit REDTaq.

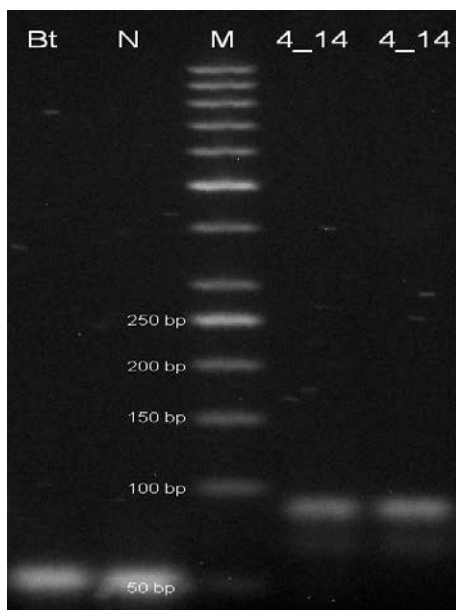
#### Stanovení transgenu GHB 119



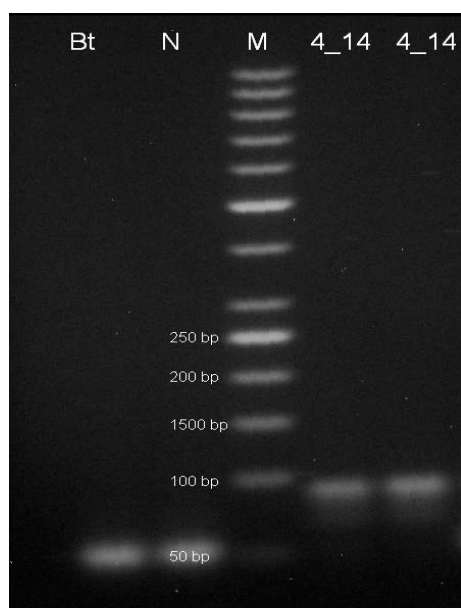
**Obrázek 11.** Stanovení transgenu GHB119 (90 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 21/2012, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 4/2014 (4\_14). Amplifikační kit REDTaq.



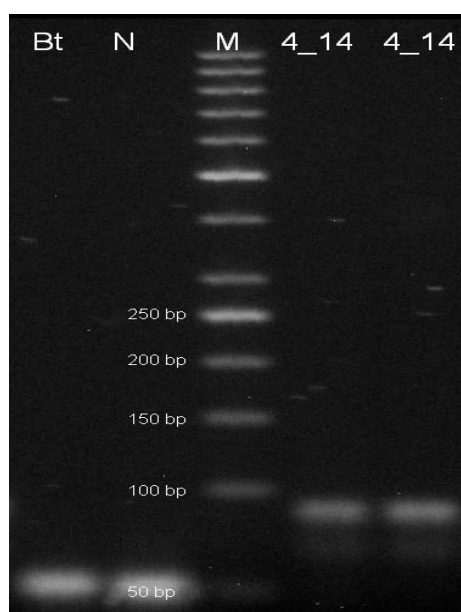
**Obrázek 12. Stanovení transgenu GHB119 (90 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 21/2012 , M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 4/2014 (4\_14). Amplifikační kit REDTaq.**



**Obrázek 13. Stanovení transgenu GHB119 (90 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 21/2012 , M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 4/2014 (4\_14). Amplifikační kit REDTaq.**



**Obrázek 14. Stanovení transgenu GHB119 (90 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 21/2012 , M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 4/2014 (4\_14). Amplifikační kit REDTaq.**



**Obrázek 15. Stanovení transgenu GHB119 (90 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 21/2012 , M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 4/2014 (4\_14). Amplifikační kit REDTaq.**

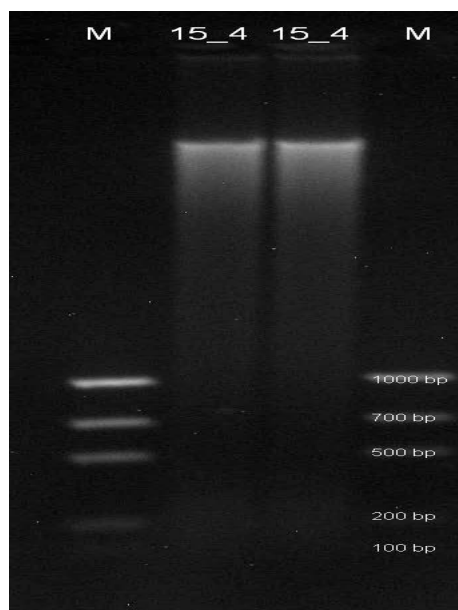
### T304-40

#### Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA

**Tabulka 3. Naměřené koncentrace a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.**

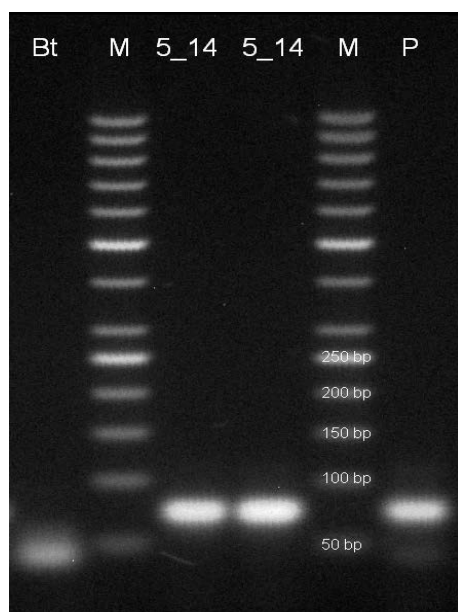
| Vzorky     | Koncentrace<br>(ng/μl) | A260/A280 | A260/A230 |
|------------|------------------------|-----------|-----------|
| CRM 5/2014 | 33,20                  | 1,85      | 1,95      |
| CRM 5/2014 | 32,80                  | 1,86      | 1,96      |

#### Určení kvality vyizolované DNA



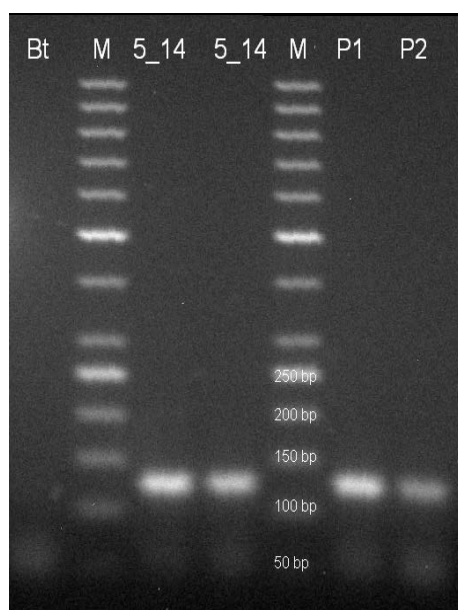
**Obrázek 16. Určení kvality vyizolované DNA pozitivní kontroly CRM 5/2014 (5\_14), K – kontrola izolace, M – hmotnostní standard.**

#### Stanovení vnitřního genu bavlny



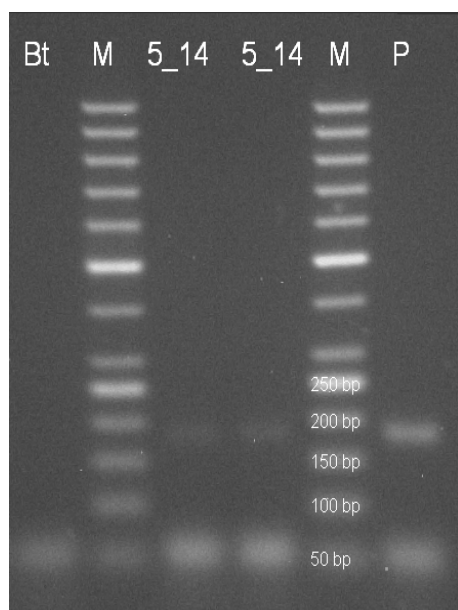
**Obrázek 17. Stanovení vnitřního genu bavlny (88 bp) u pozitivní kontroly CRM 5/2014 (5\_14), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 8/2012. Amplifikační kit REDTaq.**

#### Stanovení screeningového elementu promotoru 35S

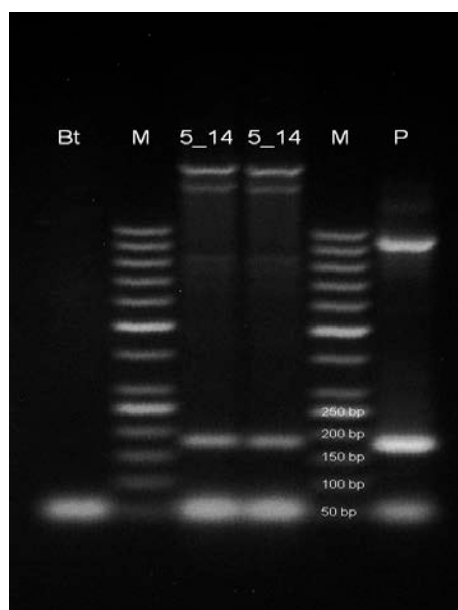


**Obrázek 18. Stanovení screeningového elementu promotor 35S (123 bp) u pozitivní kontroly CRM 5/2014 (5\_14), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 7/2013, P2 – pozitivní kontrola CRM 8/2013. Amplifikační kit REDTaq.**

### Stanovení screeningového elementu NOS



**Obrázek 19.** Stanovení screeningového elementu terminátor NOS (180 bp) u pozitivní kontroly CRM 5/2014 (5\_14), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 1/2011. Amplifikační kit REDTaq.

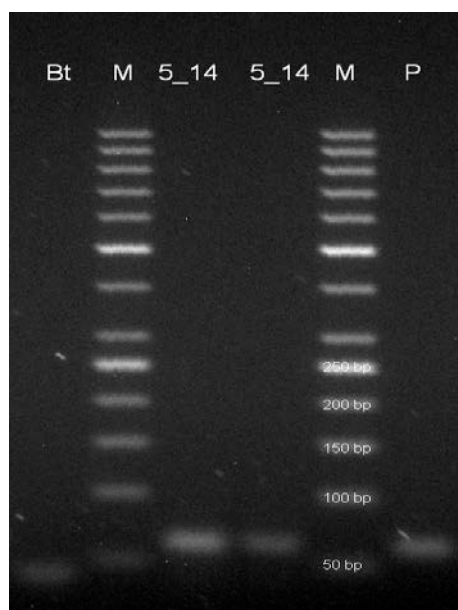


**Obrázek 20.** Opakování screeningového elementu terminátor NOS (180 bp) u pozitivní kontroly CRM 5/2014 (5\_14), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 1/2011. Amplifikační kit REDTaq.

V prvním případě stanovení terminátoru NOS byl použit klasický postup (viz Tabulka č. 1). Výsledkem jsou špatně viditelné pruhy v úrovni pozitivní kontroly (Obrázek 19). Proto byl tento postup modifikován zvýšením objemu primerů F i R na 1  $\mu$ l a přidáním iTaq polymerázy v množství 0,05  $\mu$ l na reakci.

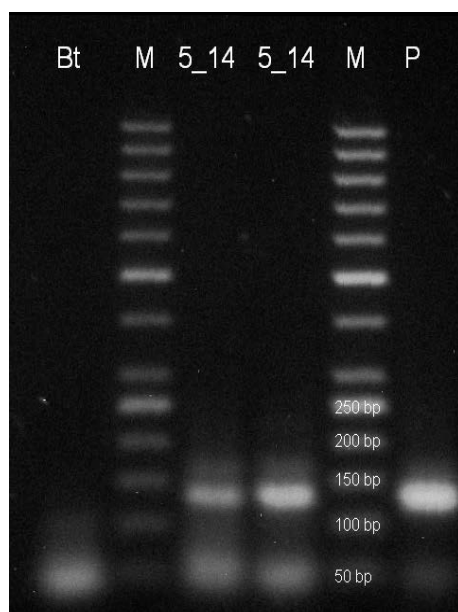
Z druhého výsledku (Obrázek 20) je zřejmé, že změnou postupu došlo ke zviditelnění pruhů a prokázání, že pozitivní kontrola CRM5/2014 obsahuje terminátor NOS.

#### Stanovení screeningového elementu bar



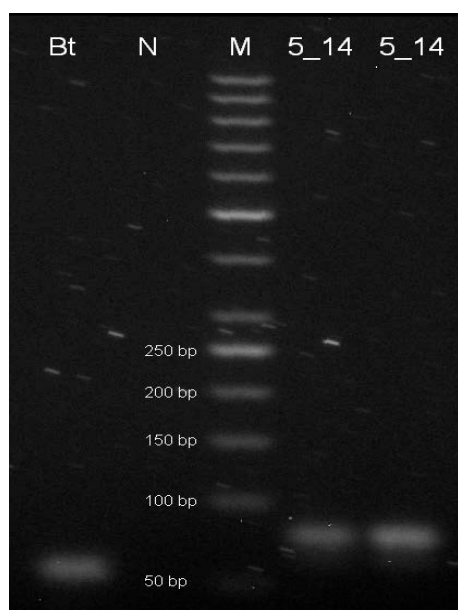
**Obrázek 21. Stanovení screeningového elementu bar (60 bp) u pozitivní kontroly CRM 5/2014 (5\_14), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 23/2012. Amplifikační kit REDTaq.**

#### Stanovení screeningového elementu Cry1Ab

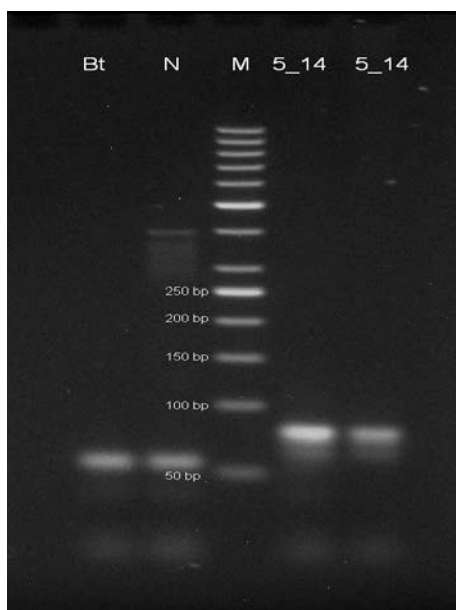


**Obrázek 22. Stanovení screeningového elementu Cry1A(b) (129 bp) u pozitivní kontroly CRM 5/2014 (5\_14), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 6/2009. Amplifikační kit REDTaq.**

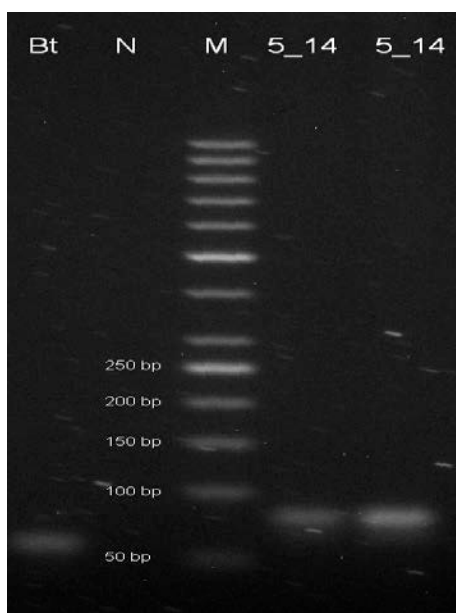
#### Stanovení transgenu T304-40



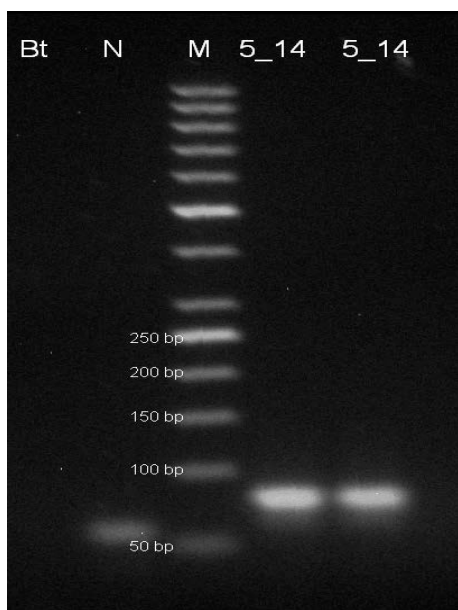
**Obrázek 23. Stanovení transgenu T304-40 (78 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 21/2012, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 5/2014 (5\_14). Amplifikační kit REDTaq.**



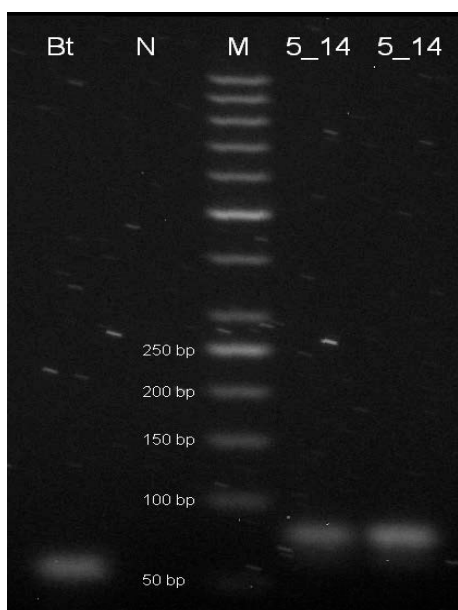
**Obrázek 24.** Stanovení transgenu T304-40 (78 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 21/2012 , M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 5/2014 (5\_14). Amplifikační kit REDTaq.



**Obrázek 25.** Stanovení transgenu T304-40 (78 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 21/2012 , M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 5/2014 (5\_14). Amplifikační kit REDTaq.



**Obrázek 26.** Stanovení transgenu T304-40 (78 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 21/2012 , M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 5/2014 (5\_14). Amplifikační kit REDTaq.



**Obrázek 27.** Stanovení transgenu T304-40 (78 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 21/2012 , M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 5/2014 (5\_14). Amplifikační kit REDTaq.

Během verifikace se postupovalo podle JPP postup č. 10250.1 a metod validovaných v EURL. Ve většině případů se zachovaly jednotlivé objemy a složky PCR reakce, sekvence primerů i amplifikační programy. Pouze v případě stanovení terminátoru NOS došlo ke změně objemu primerů F a R a přidání iTaq polymerázy.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaný certifikovaný referenční materiál vykazuje pruhy v příslušném místě, jak u screeningu, tak při stanovení konkrétního transgenu. Některé z těchto pruhů mohou být na hranici viditelnosti (zejména v tištěné verzi, která má poněkud horší kvalitu oproti původním snímkům uloženým elektronicky).

Detekovatelnost pruhů DNA je závislá na těchto faktorech

- Koncentraci templátové DNA.
- Kvalitě templátové DNA, která závisí jak na způsobu izolace, tak na opakovaném rozmrazování a zmrazování alikvotů ve zkumavkách.
- Kvalitě amplifikačních primerů. Jejich kvalita je závislá na jejich ředění a opakovaném rozmrazování a zmrazování.
- Kvalitě gelu a provedení elektroforézy.

## **5 Závěr**

Cílem práce bylo zavést metody pro detekci nových genetických modifikací u bavlny, a to transgenů GHB 119 a T304-40 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OMB. Tento úkol se podařilo splnit. Tyto metody se zařadí do postupu zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv.

## **6 Literatura**

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postup 250
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 GHB119 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2012
4. Event-Specific Method for the Quantification of Cotton T304-40 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2012
5. <http://en.biosafetyscanner.org>
6. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013, by Clive James, Chair, ISAAA International Service For the Acquisition of Agri-Biotech Applications

---

**Bulletin Národní referenční laboratoře XXII 2018/1**

Ročník: XXII, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2018

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 47

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196