

**Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**

**Národní referenční laboratoř**



**Bulletin 2018**

**Ročník XXII, číslo 2/2018**

**Brno 2018**

## Obsah

- 1 Zavedení pesticidního screeningu s využitím systému UHPLC-QTOF**  
Martina Čumová, Petra Kosubová, Klára Ondreášová  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno,  
Hroznová 2, 656 06 Brno 1
  
- 2 Zavedení metody založené na analýze mikrosatelitů (SSR markerů) pro identifikaci odrůd kukuřice**  
Kateřina Staňková  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,  
Hroznová 2, 656 06 Brno 16

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

# Zavedení pesticidního screeningu s využitím systému UHPLC-QTOF

*Martina Čumová, Petra Kosubová, Klára Ondreášová*

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

## 1 Souhrn

Byla ověřena citlivost a aplikovatelnost nového systému, kapalinového chromatografu ve spojení s vysoko rozlišujícím hmotnostním spektrometrem (LC-HRMS). Pesticidy byly analyzovány v různých typech extraktů z rostlinného a půdního materiálu. Metoda byla ověřena účastí v testu způsobilosti.

## 2 Úvod

Celosvětově se používá více než 1000 aktivních substancí proti škůdcům, rostlinným chorobám, nebo ke kontrole růstu plevelu, a to za účelem zvýšení produkce potravin. Další pomocné látky jsou předmětem neustálého vývoje. Naproti tomu však musí být minimalizováno riziko spojené s vlivem pesticidů na lidské zdraví. Proto je aplikace pesticidů v zemědělství striktně regulována legislativními požadavky. Zneužívání pesticidů, neznalost správné zemědělské praxe, křížová kontaminace během zpracování, skladování a transportu, mohou být zdrojem nežádoucí nebo nelegální přítomnosti reziduí pesticidů v potravinách a krmivech.

Pro kontrolu dodržování hygienických limitů a monitoring pesticidů se nejčastěji využívají analytické techniky spojení plynové nebo kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s trojitým kvadrupólovým filtrem nebo iontovou pastí s jednotkovým rozlišením. Tyto instrumenty pracují v režimu tzv. cílené analýzy. Takto lze stanovit široké spektrum pesticidů, protože jsou tyto přístroje velmi citlivé, selektivní a měří reprodukovatelně. Analyty jsou do cílených metod zařazeny dle toho, (i) zdali jsou prokázány na základě monitoringů, (ii) dle zemědělské praxe v daném regionu, (iii) nebo dle seznamu pozitivních záchytů v rámci evropských monitoringů, které jsou zveřejňovány EFSA.

Kontrolní laboratoře mohou monitorovat například 300 pesticidů v jedné analýze, avšak i přesto může uniknout informace o většině méně frekventovaných nebo nevhodně použitých látkách. Zlepšení záchytu pesticidů umožňuje použití vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie v režimu tzv. necíleného screeningu. Extrakt vzorku se změří generickou metodou a výsledný chromatogram, který obsahuje hmotnostní spektra látek, jejich prekurzory a fragmenty, pak může být softwarově prohledáván na základě shody s látkami obsaženými v knihovnách spekter a databázích (např. knihovny obsahující pesticidní látky, mykotoxiny, forenzní látky, ...). Navíc je zde umožněna tzv. retrospektivní analýza dat a naskenovaný vzorek tak může být podroben re-analýze bez nutnosti jeho další analytické přípravy a proměření.

Tato studie popisuje využití ultraúčinného kapalinového chromatografu ve spojení s hybridním hmotnostně spektrometrickým analyzátozem typu kvadrupólového filtru s detektorem doby letu pro stanovení pesticidů, jejich metabolitů a dalších látek v krmivech, krmných surovinách a v půdě.

### **3 Chemikálie**

Methanol (čistota LC-MS), mravenčan amonný (pro MS) a kyselina mravenčí (čistota LC-MS), Fluka. Ultra čistá voda byla připravena pomocí systému Milli-Q (Millipore Corporation, USA). Acetonitril (čistota HPLC), Sigma-Aldrich (Česká republika). Jednotlivé standardy pesticidů, Sigma-Aldrich (Česká republika), Dr. Ehrenstorfer (Německo), HPC Standards (Německo), Chem Service (Spojené státy americké). Standardy byly rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle a uchovávány podle pokynů výrobce.

### **4 Přístroje a pomůcky**

Kapalinový chromatograf Agilent 1290 (Agilent, Německo) s vysoko rozlišujícím hmotnostním spektrometrem Agilent 6550 (Agilent, Německo), vybavený kolonou, ZORBAX Eclipse PLUS C18, 100 mm × 2,1 mm × 1,8 μm (Agilent, Německo). Analytické váhy, ultrazvuková lázeň, horizontální třepačka s rychlostí do 300 kmitů/min, centrifuga s rozsahem otáček nad 3000 ot/min, centrifugační zkumavky polypropylenové (PP) se šroubovacím víčkem o objemech 15 ml a 50 ml, centrifugační zkumavka Eppendorf o objemu 1,5 ml, stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 μm (Labcicom, Česká republika), skleněné vialky o objemu 2 ml.

## 5 Postup přípravy vzorku

Homogenní vzorek se naváží do 50 ml centrifugační PP zkumavky. K matrici se přidá 10 ml MilliQ vody. Extrakce se provede 10 ml acetonitrilu třepáním na horizontální třepačce po dobu 20 min při alespoň 150 kmitech/min. Poté se přidá směs solí (4 g  $\text{MgSO}_4$ , 1 g  $\text{NaCl}$ , 1 g  $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa}) \times 2 \text{H}_2\text{O}$  a 0,5 g  $\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COONa}) \times 1,5 \text{H}_2\text{O}$ ). Zkumavka se opět intenzivně protřepe po dobu (1 – 2) min. Vzorek se odstředí 5 min při 5000 ot/min, vrchní acetonitrilová vrstva se převede do 15ml PP zkumavky a nechá se vymrazit. Vymražený extrakt se opět odstředí 5 min při 3900 ot/min. Přesně 0,5 ml acetonitrilové vrstvy se převede do zkumavky Eppendorf, okyselí se 10  $\mu\text{l}$  5% kyseliny mravenčí v acetonitrilu a doplní vodou na celkový objem 1 ml. Po promíchání se roztok zfiltruje přes membránový filtr nebo se odstředí při 12000 ot/min a převede do vialky.

## 6 LC-HRMS stanovení

Extrakty převedené do 2ml vialky se analyzují metodou LC-HRMS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů. Kompletní nastavení přístroje a podmínky měření jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2. Před analýzou reálných vzorků se ověří citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu a zároveň stabilita retenčního chování v daném chromatografickém systému. Selektivita analýzy je zajištěna vysokým rozlišením hmotnostního spektra.

**Tabulka 1. Chromatografické podmínky LC stanovení.**

<b>LC – Agilent 1290</b>	
Kolona	ZORBAX Eclipse PLUS C18 (100 mm × 2,1 mm × 1,8 μm)
Nástřik	2 μl
<i>LC podmínky pro stanovení v ESI<sup>+</sup></i>	
Mobilní fáze A	0,1% kyselina mravenčí + 2mM mravenčan amonný v deionizované vodě
Mobilní fáze B	0,1% kyselina mravenčí + 2mM mravenčan amonný v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,3 ml/min
Gradient	Gradientová eluce od 5 % do 100 % B během 14 min
<i>LC podmínky pro stanovení v ESI<sup>-</sup></i>	
Mobilní fáze A	1 mM NH <sub>4</sub> F v deionizované vodě
Mobilní fáze B	methanol
Průtok mobilní fáze	0,3 ml/min
Gradient	Gradientová eluce od 5 % do 100 % B během 14 min

**Tabulka 2. Podmínky MS detekce.**

<b>MS – Agilent 6550 Q-TOF</b>	
2 GHz High Resolution mode	
Korekce pomocí referenčních hmot během celé analýzy	
Teplota ESI zdroje	150 °C
Tlak nebuliseru	35 psi
Průtok sheat gas	11 L/h
Teplota sheat gas	350 °C
Napětí na kapiláře	3 kV
Fragmentor	250 V
<i>Plný SCAN</i>	
Hmotnostní rozsah	(100 – 1000) m/z
Absolute treshold	200
Rychlost sběru dat	6 spekter/sec
<i>All ion MS/MS mód</i>	

<b>MS – Agilent 6550 Q-TOF</b>	
Hmotnostní rozsah	(50 – 1000) m/z
Tři skenovací segmenty	10 eV, 20eV, 40 eV
Rychlost sběru dat	6 spekter/sec

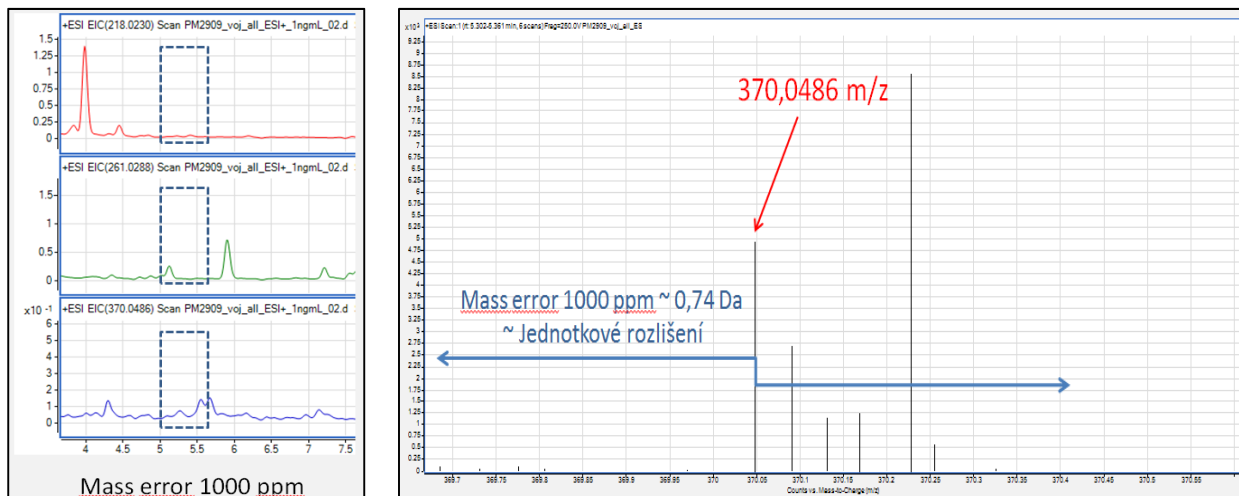
## 7 Výsledky a diskuse

### 7.1 Využitelnost vysokého rozlišení

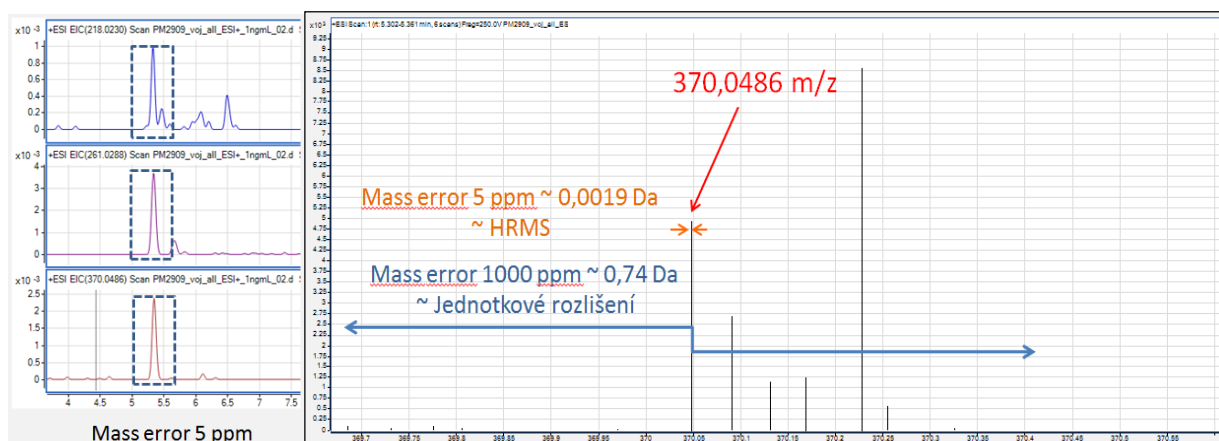
Existuje široká řada látek, které mají různé atomární zastoupení, ale stejnou nominální hmotnost, jako například pesticidy quinmerac ( $C_{11}H_8ClNO_2$ ) a chloridazon ( $C_{10}H_8ClN_3O$ ) jejichž molekulová hmotnost je 221 g/mol. Tyto látky mohou být navíc eluovány z kolony ve velmi podobném čase. Pro hmotnostní spektrometr s jednotkovým rozlišením by se v režimu SCAN mohlo jednat o totožné látky a jejich rozlišení, jinak než optimalizací LC podmínek nebo s pomocí MS fragmentace, by nebylo možné. Přesná hmotnost těchto látek je však rozdílná. Quinmerac (221,02436 g/mol) a chloridazon (221,03559 g/mol) se liší o 51 ppm. Tento rozdíl lze pozorovat právě pomocí vysokorozlišovacích hmotnostních spektrometrů. Oba analyty tak mohou být rozpoznány na základě tzv. přesné hmoty, protože vysokorozlišovací přístroje mohou měřit například s chybou již 2,5 ppm.

Díky tomu, že se zvyšující se přesností hmoty klesá množství izobarických sloučenin – tedy tzv. možných kandidátů na danou látku, mohou vznikat databáze přesných hmot a knihoven spekter, které se využívají pro identifikaci neznámých látek v analyzovaném vzorku.

Během extrakce vzorku se do extraktu dostávají nejen analyty, ale i další matriční koextrakty, které mohou znesnadnit analýzu vzorku. V oblasti retenčního času analytu tak mohou být přítomny interference, které vypadají jako samotný analyt nebo zastiňují jeho signál. Jestliže se v tomto případě použije extrakce iontů s chybou 5 ppm, matriční koextrakt je odstíněn a analyt může být detekován – jak je znázorněno na příkladu stanovení amidosulfuronu (Obrázky 1 a 2).



**Obrázek 1.** Extrahovaný iontový chromatogram amidosulfuronu (molekulový ion  $m/z$  370 a dva fragmentové ioty  $m/z$  218 a  $m/z$  261) ve vojtěškovém extraktu. Extrahovaný iontový chromatogram s chybou 1000 ppm, která odpovídá jednotkovému rozlišení.

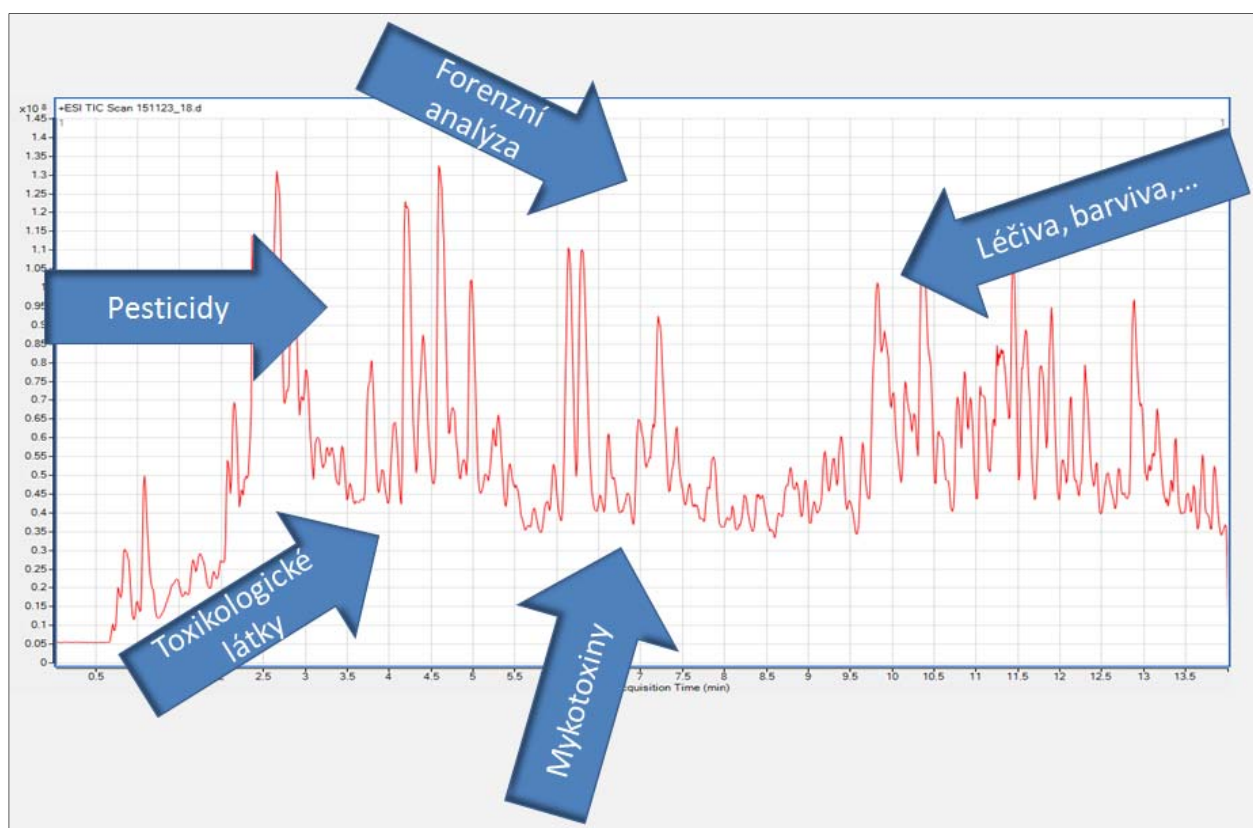


**Obrázek 2.** Stejný extrahovaný iontových chromatogram amidosulfuronu jako na obrázku 1. Extrakce s chybou 5 ppm.



## 7.2 Retrospektivní analýza dat

Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr může pracovat jak v režimu cílené, tak i necílené analýzy. V necílené analýze se používají dva přístupy screeningu. Buď data-dependent, nebo data-independent analysis. Oba přístupy umožňují retrospektivní analýzu dat. Je umožněna re-analýza již dříve změřených dat, bez nutnosti opětovné přípravy extraktu vzorku a jeho analýzy na přístroji. Tohoto lze využít například v případě, že byl daný vzorek testován na přítomnost určitého rozsahu pesticidů, avšak v budoucnu může být požadavek na tento rozsah změněn, nebo se mohou dostat do popředí zájmu i jiné analyty, nežli pesticidy (např. léčiva, přírodní toxiny, doplňkové látky...) (Obrázek 3).



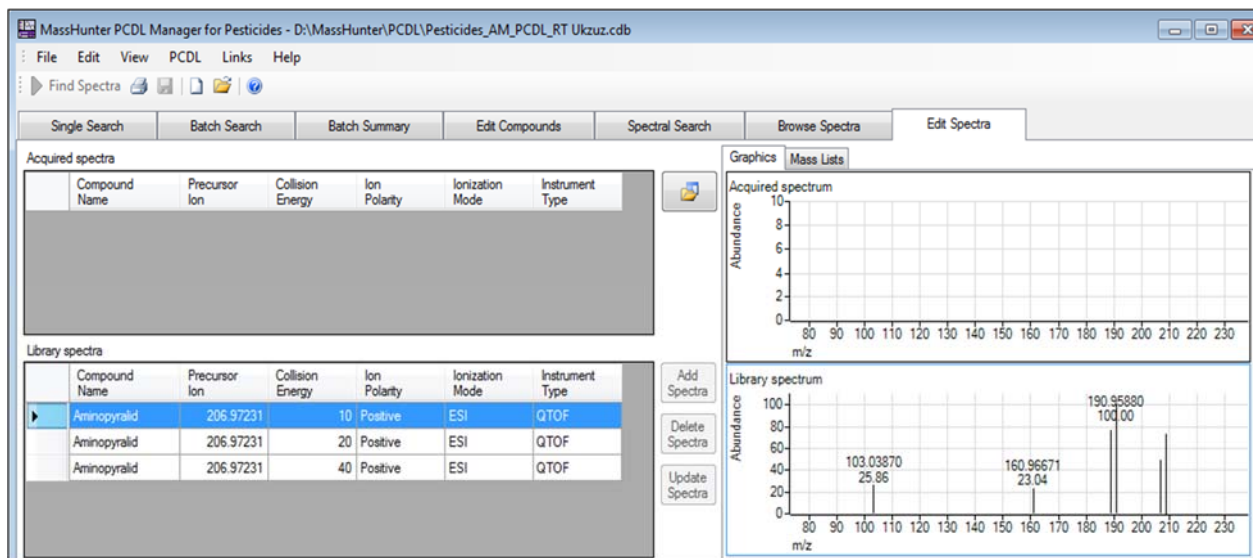
**Obrázek 3.** Chromatogram z necíleného screeningu změřeného pomocí HRMS lze využít pro různé účely.

## 7.3 Nastavení kvantifikační metody

### Tvorba knihovny MS/MS spekter

Součástí LC-HRMS systému je také softwarová knihovna spekter pesticidních látek, díky které lze identifikovat analyty ve vzorcích, které byly změřeny cílenou, ale i necílenou analýzou. Tato knihovna může být libovolně rozšiřována o další analyty. K tomuto účelu je zapotřebí získat

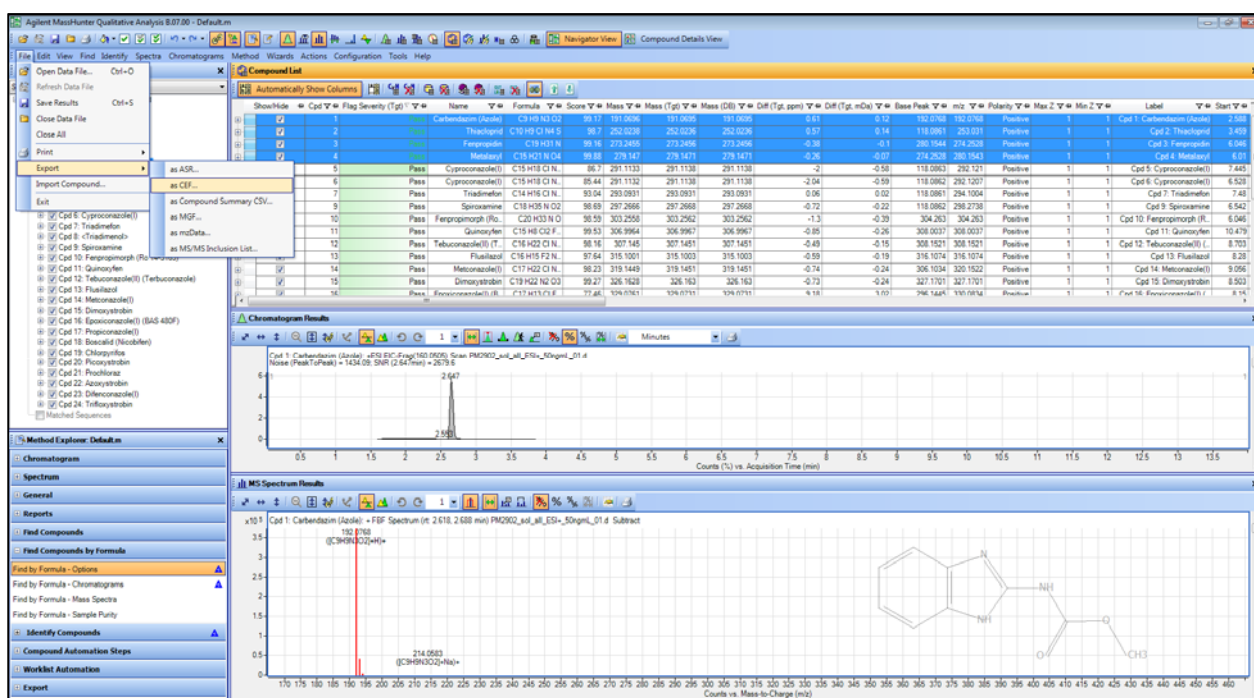
fragmentační spektrum standardní látky, které se změní při různých kolizních energiích (nejčastěji 10 eV, 20 eV a 40 eV). Každé fragmentační spektrum se softwarově pročistí a nahraje do knihovny spekter (Obrázek 4).



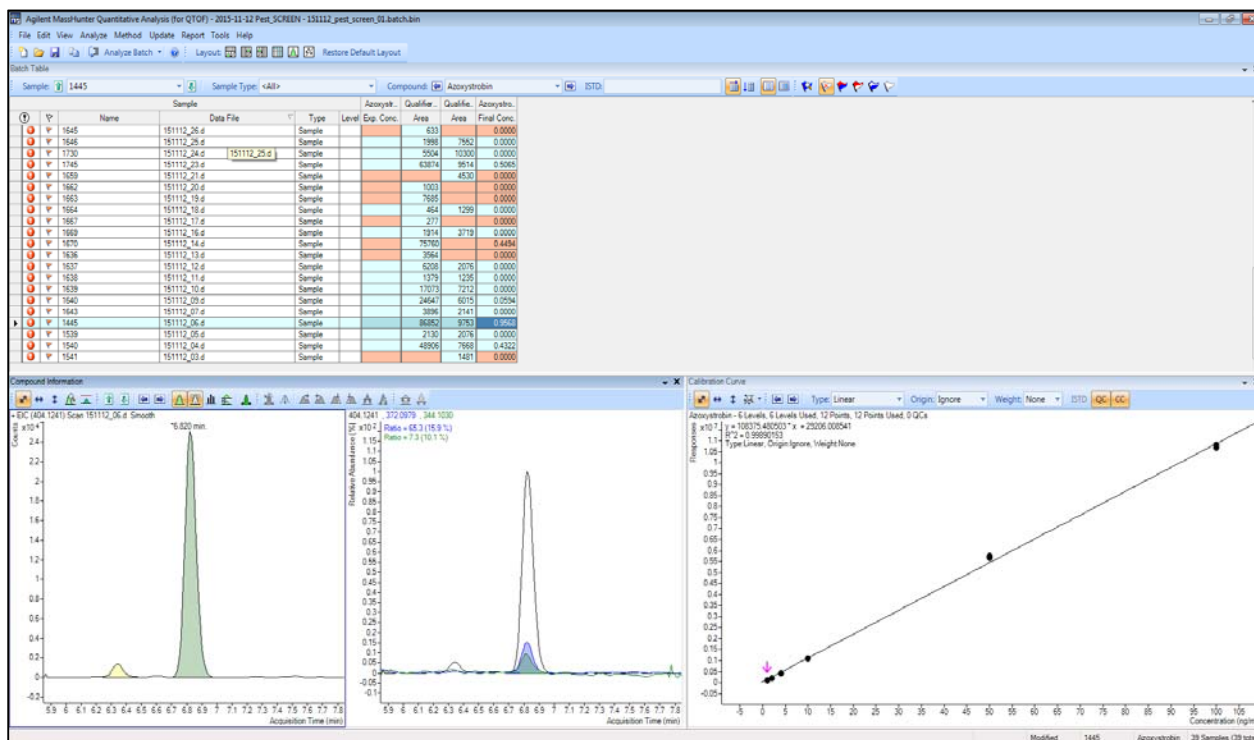
**Obrázek 4. Fragmentační hmotnostní spektrum aminopyralidu získané fragmentací prekurzoru s neutrálními atomy dusíku s kolizní energií 10 eV.**

### Kvalitativní identifikace a nastavení kvantifikační metody

Standardy pesticidů byly analyzovány metodou popsanou v odstavci 6. Sloučeniny byly nalezeny algoritmem Find By Formula (FBF) (Obrázek 5). Poté byla získaná data exportována do MassHunter Quantitative Analysis software s použitím vytvořeného CEF souboru. Tím byly automaticky získány informace o analytech, jejich názvy, retenční časy, prekurzorové a fragmentační ionty při různých kolizních energiích a jejich relativní zastoupení. Takto získané nastavení kvantifikační metody pro přibližně 100 látek bylo aplikováno na vzorky a standardy (Obrázek 6).



Obrázek 5. Export výsledků kvalitativních identifikačních parametrů (RT, název...) do kvantitativní metody s použitím souboru Compound Exchange Format (CEF).



Obrázek 6. Aplikace výsledné kvantifikační metody. Prekurzorový ion a kvalifikační iony azoxystrobinu.

## 7.4 Validace metody

Metoda pro stanovení reziduí pesticidů a jejich metabolitů byla validována podle SANTE/11945/2015. Identifikace analytů probíhala v souladu s platnou legislativou, která požaduje sledování alespoň dvou iontů s přesností do 5 ppm, ideálně jeden molekulární ion a jeden fragment. Schopnost metody pro stanovení pesticidů byla testována analýzou čtyř následujících matric: krmivo, půda, pšenice a vojtěška. Linearita byla testována s použitím kalibračních křivek v matrici o koncentraci 4 µg/kg – 400 µg/kg. Byl vypočítán koeficient determinace ( $R^2$ ). Většina pesticidů vykazovala dobrou linearitu ( $R^2 > 0,993$ ). Reportovací limity byly různé pro kombinace analytu a matrice, ale u většiny pesticidů byly nižší než 10 µg/kg ve všech testovaných materiálech. Pro verifikaci na základě přesné hmoty je požadováno dosažení chyby alespoň 5 ppm. TOF systém, který byl použit pro tuto studii, poskytoval nejčastěji výsledky s chybou do 2,5 ppm. Výsledky z validace počátečního testovacího setu pesticidů jsou uvedeny v následující Tabulce 3.

**Tabulka 3. Reportovací limity (RL) a korelační koeficienty ( $R^2$ ) startovacího setu vybraných pesticidů.**

Materiál				Krmivo		Půda		Pšenice		Vojtěška	
Pesticide	Formula	Precursor ion m/z	ESI+/ESI-	RL (µg/kg)	$R^2$	RL (µg/kg)	$R^2$	RL (µg/kg)	$R^2$	RL (µg/kg)	$R^2$
2,4,-D	C8H6Cl2O3	218,9621	ESI-	16	0,9997	8	0,9976	8	0,9995	16	0,9991
2,4-DP (Dichlorprop)	C9H8Cl2O3	160,9567	ESI-	200	NC	200	NC	40	0,9995	16	0,9993
Acetochlor	C14H20ClNO2	148,1121	ESI+	4	0,9996	8	0,9999	8	0,9996	16	0,9990
Aclonifen	C12H9ClN2O3	263,0229	ESI-	40	0,9960	40	0,9966	200	NC	200	NC
Alachlor	C14H20ClNO2	270,1255	ESI+	8	0,9993	4	0,9986	4	0,9995	16	0,9968
Amidosulfuron	C9H15N5O7S2	370,0486	ESI+	4	0,9996	4	0,9987	4	0,9997	4	0,9999
Aminopyralid	C6H4Cl2N2O2	206,9723	ESI+	8	0,9964	8	0,9964	4	0,9971	16	0,9959
Asulam	C8H10N2O4S	231,0434	ESI+	4	0,9954	4	0,9988	4	0,9925	16	0,9967
Atrazine	C8H14ClN5	216,101	ESI+	4	0,9997	4	0,9991	4	0,9979	16	10,000
Atrazine-2-hydroxy	C8H15N5O	198,1351	ESI+	8	0,9971	4	0,9989	8	0,9956	40	0,9930
Atrazine-desethyl	C6H10ClN5	188,0699	ESI+	16	0,9998	4	0,9997	8	0,9986	40	0,9954
Atrazine-desethyl-desisopropyl	C3H4ClN5	146,0228	ESI+	40	0,9989	16	0,9999	8	0,9984	200	NC
Azoxystrobin	C22H17N3O5	404,1235	ESI+	4	0,9992	4	0,9996	4	0,9989	4	0,9998
Bentazone	C10H12N2O3S	239,0495	ESI-	8	0,9972	4	0,9977	8	0,9998	8	0,9976
Boscalid	C18H12Cl2N2O	343,0399	ESI+	4	0,9990	4	0,9978	4	0,9993	8	0,9909
Bromoxynil	C7H3Br2NO	275,8488	ESI-	4	0,9990	4	0,9983	4	0,9996	4	0,9999
Carbendazim	C9H9N3O2	192,0768	ESI+	4	0,9981	4	0,9997*	4	0,9937	16	0,9983
Chloridazon	C10H8ClN3O	222,0429	ESI+	8	0,9995	8	0,9968	8	0,9959	16	0,9997
Chlorotoluron	C10H13ClN2O	213,0789	ESI+	4	0,9996	4	0,9999	4	0,9988	40	0,9881

Materiál				Krmivo		Půda		Pšenice		Vojtěška	
Pesticide	Formula	Precursor ion m/z	ESI+/ESI-	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>
Chlorpropham	C10H12ClNO2	212,0484	ESI-	16	0,9941	16	0,9981	8	0,9993	ND	NC
Chlorpyrifos	C9H11Cl3NO3PS	349,9336	ESI+	8	0,9996	8	0,9992	8	0,9993	4	0,9992
Chlorsulfuron	C12H12ClN5O4S	358,0371	ESI+	8	0,9996	4	0,9988	4	0,9999	8	0,9999
Clomazone	C12H14ClNO2	240,0786	ESI+	4	0,9998	4	0,9997	4	0,9998	ND	NC
Clopyralid	C6H3Cl2NO2	189,9468	ESI-	40	0,9998	16	0,9959	16	0,9968	4	0,9967
Cyproconazole	C15H18ClN3O	292,1211	ESI+	4	0,9995	4	0,9997	4	0,9997	40	0,9988
Cyprosulfamide	C18H18N2O5S	375,1009	ESI+	4	0,9998	4	0,9920	4	0,9999	4	0,9996
Desmedipham	C16H16N2O4	318,1448	ESI+	4	0,9999	4	0,9972	4	0,9998	40	0,9966
Dicamba	C8H6Cl2O3	218,9621	ESI-	16	0,9998	8	0,9982	8	0,9986	8	0,9996
Dichlormid	C8H11Cl2NO	208,029	ESI+	40	0,9994	40	0,9981	8	0,9987	40	0,9910
Difenoconazole	C19H17Cl2N3O3	406,072	ESI+	4	0,9947	4	0,9913	8	0,9998	8	0,9993
Diflufenican	C19H11F5N2O2	395,0813	ESI+	4	0,9989	4	0,9984	4	0,9995	4	0,9999
Dimethachlor	C13H18ClNO2	256,1099	ESI+	4	0,9998	4	0,9999	4	0,9999	16	0,9985
Dimethenamid	C12H18ClNO2S	276,082	ESI+	4	0,9994	4	0,9985	4	0,9996	4	0,9940
Dimethomorph	C21H22ClNO4	388,131	ESI+	4	0,9992	4	0,9933	4	0,9999	40	0,9943
Dimoxystrobin	C19H22N2O3	327,1703	ESI+	4	0,9997	4	0,9998	4	0,9996	4	0,9962*
Diuron	C9H10Cl2N2O	233,0243	ESI+	4	0,9993	4	0,9995	4	0,9989	40	0,9895
Epoxiconazole	C17H13ClF3N3O	330,0804	ESI+	4	0,9995	8	0,9980	4	0,9999	8	0,9996
Fenhexamid	C14H17Cl2NO2	302,0709	ESI+	8	0,9997	4	0,9959	8	0,9996	16	0,9986
Fenpropidin	C19H31N	274,2529	ESI+	8	1,0000*	4	0,9994	4	0,9999*	16	0,9965
Fenpropimorph	C20H33NO	304,2635	ESI+	8	0,9991	4	0,9999	8	0,9918	40	0,9907
Florasulam	C12H8F3N5O3S	360,0373	ESI+	8	0,9997	4	0,9993	4	0,9998	4	0,9991
Fluazifop	C15H12F3NO4	328,0791	ESI+	4	0,9995	4	0,9965	4	0,9996	16	0,9968
Fluazifop-P-butyl	C19H20F3NO4	384,1417	ESI+	4	0,9964	4	0,9968	4	0,9936	4	0,9982
Flurochloridone	C12H10Cl2F3NO	312,0164	ESI+	16	0,9997	16	0,9997	8	0,9998	16	0,9978
Fluroxypyr	C7H5Cl2FN2O3	254,9734	ESI+	40	0,9996	40	0,9943	16	0,9920	16	0,9925
Flusilazole	C16H15F2N3Si	316,1076	ESI+	4	0,9987	4	0,9973	4	0,9996	4	0,9999
Foramsulfuron	C17H20N6O7S	453,1187	ESI+	8	0,9994	4	0,9983	4	0,9992	4	0,9999
Haloxyfop	C15H11ClF3NO4	362,0402	ESI+	8	0,9991	8	0,9959	16	0,9998	4	0,9997
Haloxyfop-2-ethoxyethyl	C19H19ClF3NO5	434,0977	ESI+	4	0,9970	4	0,9997	4	0,9994	4	0,9993
Haloxyfop-methyl	C16H13ClF3NO4	376,0558	ESI+	4	0,9984	4	0,9998	4	0,9996	4	0,9990
Hexazinone	C12H20N4O2	253,1659	ESI+	4	0,9984	4	10,000	4	0,9977	4	0,9994
Iodosulfuron-methyl	C14H14IN5O6S	507,9782	ESI+	4	0,9999	4	0,9976	8	0,9979	ND	NC
Isoproturon	C12H18N2O	207,1492	ESI+	4	0,9984	4	0,9996*	8	0,9957	4	0,9959
Isoxadifen-ethyl	C18H17NO3	296,1281	ESI+	4	0,9999	4	0,9987	4	0,9988	4	0,9937
Isoxaflutole	C15H12F3NO4S	356,0366	ESI-	4	0,9989	4	0,9976	4	0,9988	16	0,9912
Lenacil	C13H18N2O2	235,1441	ESI+	8	0,9999	4	0,9985	4	0,9997	4	0,9953
Linuron	C9H10Cl2N2O2	249,0192	ESI+	4	0,9997	4	10,000	4	0,9998	8	0,9983
MCPA	C9H9ClO3	199,0167	ESI-	4	0,9999	4	0,9991	8	0,9999	16	0,9989
Mecoprop	C10H11ClO3	213,0324	ESI-	8	0,9987	4	0,9985	8	0,9997	16	0,9991
Mefenpyr-diethyl	C16H18Cl2N2O4	373,0716	ESI+	4	0,9985	4	0,9984	4	0,9999	4	0,9999
Mesotrione	C14H13NO7S	340,0485	ESI+	4	0,9998	8	0,9992	8	0,9995	40	0,9941
Metalaxyl-M	C15H21NO4	280,1543	ESI+	8	0,9971	4	0,9987	4	0,9978	8	0,9991
Metamitron	C10H10N4O	203,0927	ESI+	16	0,9986	4	0,9964	8	0,9965	16	0,9991

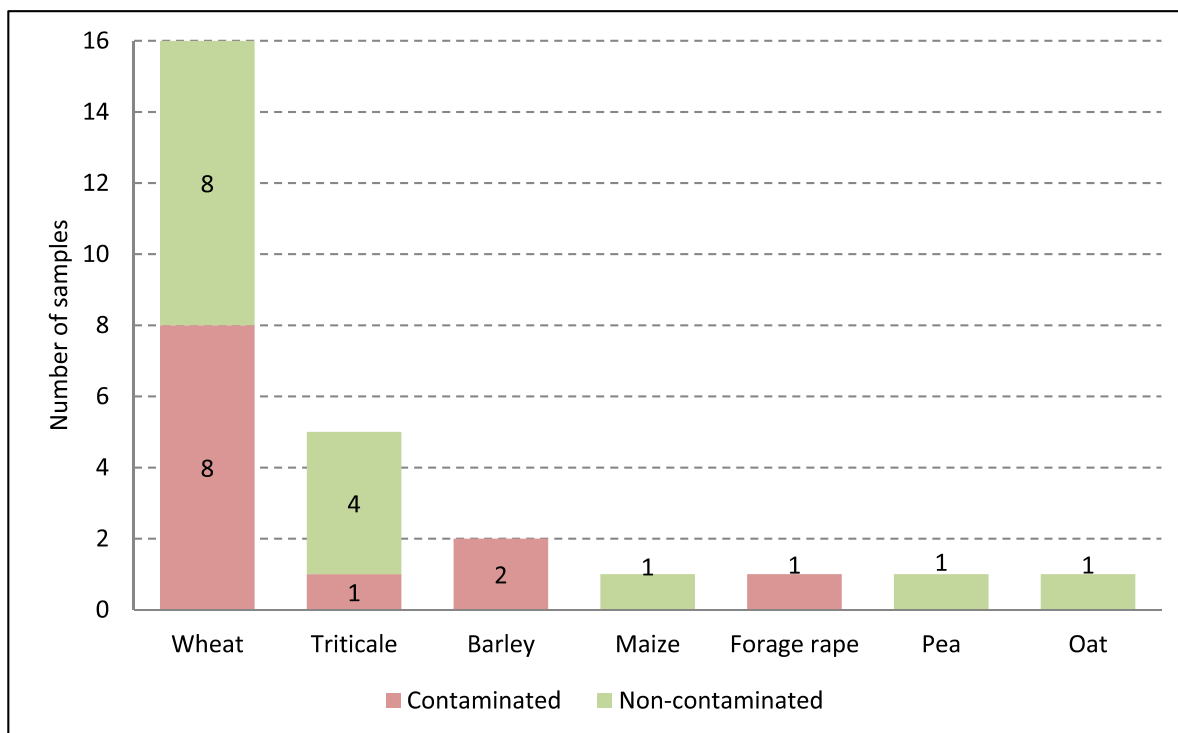
Materiál				Krmivo		Püda		Pšenice		Vojtěška	
Pesticide	Formula	Precursor ion m/z	ESI+/ESI-	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>
Metazachlor	C14H16ClN3O	278,1055	ESI+	4	0,9998	4	0,9996	4	0,9998	16	0,9888
Metconazole	C17H22ClN3O	320,1524	ESI+	4	0,9985	4	0,9918	4	10,000	4	0,9940
Methoxyfenozide	C22H28N2O3	369,2173	ESI+	16	0,9959	4	0,9998	16	0,9991	40	0,9981
Metolachlor	C15H22ClNO2	284,1412	ESI+	4	0,9996	4	0,9998	4	0,9996	4	0,9992
Metribuzin	C8H14N4OS	215,0961	ESI+	16	0,9987	4	0,9963	8	0,9960	16	0,9988
Metsulfuron-methyl	C14H15N5O6S	382,0816	ESI+	4	0,9999	4	0,9987	4	0,9993	4	0,9998
Nicosulfuron	C15H18N6O6S	411,1081	ESI+	200	NC	40	0,9935	16	0,9955	16	0,9978
Pendimethalin	C13H19N3O4	282,1448	ESI+	40	0,9909	8	0,9956	8	0,9992	8	0,9940
Pentoxamid	C16H22ClNO2	296,1412	ESI+	8	0,9997	4	0,9993	4	0,9998	8	0,9985
Picloram	C6H3Cl3N2O2	240,9333	ESI+	16	0,9965	40	0,9959	40	0,9942	40	0,9922
Picoxystrobin	C18H16F3NO4	368,1104	ESI+	4	0,9997	4	0,9987	4	0,9999	4	0,9986
Pirimicarb	C11H18N4O2	239,1503	ESI+	4	0,9989	4	0,9986	4	0,9974	4	0,9995
Pirimicarb-desmethyl	C10H16N4O2	225,1346	ESI+	4	0,9907	4	0,9993*	4	0,9999*	8	0,9985
Pirimiphos-methyl	C11H20N3O3PS	306,1036	ESI+	4	0,9997	4	0,9984	4	0,9951	4	0,9971
Prochloraz	C15H16Cl3N3O2	376,0381	ESI+	4	0,9995	4	0,9996	4	0,9993	4	0,9997
Prometryn	C10H19N5S	242,1434	ESI+	4	0,9998	4	0,9980*	4	0,9973	4	0,9992
Propachlor	C11H14ClNO	212,0837	ESI+	4	0,9999	4	0,9998	4	0,9997	8	0,9995
Propamocarb	C9H20N2O2	189,1598	ESI+	4	0,9998	4	0,9976	4	0,9975	8	0,9998
Propaquizafop	C22H22ClN3O5	444,1321	ESI+	4	0,9959	4	0,9993	4	0,9997	8	0,9998
Propiconazole	C15H17Cl2N3O2	342,0771	ESI+	8	0,9990	4	0,9995	16	0,9993	8	10,000
Prosulfocarb	C14H21NOS	252,1417	ESI+	4	0,9975	4	0,9999	4	0,9990	8	0,9999
Prothioconazole-desthio	C14H15Cl2N3O	312,0665	ESI+	4	0,9998	4	0,9965	4	0,9998	4	0,9963
Quinclorac	C10H5Cl2NO2	241,977	ESI+	4	0,9996	4	0,9982	4	0,9997	4	0,9999
Quinmerac	C11H8ClNO2	222,0316	ESI+	4	0,9999	4	0,9999	4	0,9996	8	0,9995
Quinoxifen	C15H8Cl2FNO	308,004	ESI+	4	0,9906	4	0,9996	4	0,9996	4	0,9998
Quizalofop-P-ethyl	C19H17ClN2O4	373,095	ESI+	4	0,9938	4	0,9989	4	0,9999	4	0,9986*
Rimsulfuron	C14H17N5O7S2	432,0642	ESI+	8	0,9999	4	0,9987	4	0,9998	4	0,9999
Simazine	C7H12ClN5	202,0854	ESI+	4	0,9999	4	0,9992	4	0,9975	8	0,9986
Simazine-2-hydroxy	C7H13N5O	184,1193	ESI+	4	0,9966	4	0,9931	4	0,9960	8	0,9997
Spiroxamine	C18H35NO2	298,2741	ESI+	4	0,9992	4	0,9996	4	0,9998	ND	NC
Sulfosulfuron	C16H18N6O7S2	471,0751	ESI+	4	0,9999	4	0,9992	4	0,9999	8	0,9999
Tebuconazole	C16H22ClN3O	308,1524	ESI+	4	0,9991	4	0,9992	4	0,9998	8	0,9943
Terbuthylazine	C9H16ClN5	230,1167	ESI+	4	0,9971	4	0,9989	4	0,9995	8	0,9949
Terbuthylazine-2-hydroxy	C9H17N5O	212,1506	ESI+	8	0,9994	4	0,9987	8	0,9987	16	0,993
Terbuthylazine-desethyl	C7H12ClN5	202,0854	ESI+	16	0,9995	4	0,9995	4	0,9997	40	0,9954
Terbuthylazine-desethyl-2-hydroxy	C7H13N5O	184,1193	ESI+	40	0,9990	4	0,9997	16	0,9979	40	0,9998
Terbutryn	C10H19N5S	242,1434	ESI+	4	0,9940	4	0,9994	4	0,9947	4	0,999
Thiacloprid	C10H9ClN4S	253,0309	ESI+	4	0,9997	4	0,9998	4	0,9994	4	0,9993
Thiencarbazone-methyl	C12H14N4O7S2	391,0377	ESI+	8	0,9995	4	0,9913	8	0,9977	8	0,9992

Materiál				Krmivo		Půda		Pšenice		Vojtěška	
Pesticide	Formula	Precursor ion m/z	ESI+/ESI-	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>	RL (µg/kg)	R <sup>2</sup>
Thifensulfuron-methyl	C12H13N5O6S2	388,038	ESI+	4	0,9998	4	0,9983	4	0,9989	8	0,9999
Thiophanate-methyl	C12H14N4O4S2	343,0529	ESI+	4	0,9997	4	0,9991	4	0,9975	8	0,9994
Triadimefon	C14H16CIN3O2	294,1004	ESI+	8	0,9992	8	0,9936	4	0,9997	16	0,9996
Triadimenol	C14H18CIN3O2	296,116	ESI+	4	0,9997	8	0,993	16	0,9996	ND	NC
Triasulfuron	C14H16CIN5O5S	402,0633	ESI+	4	0,9998	4	0,9924	8	0,9998	8	0,9996
Triclopyr	C7H4Cl3NO3	253,9184	ESI-	16	0,9946	16	0,9979	16	0,9952	8	0,996
Trifloxystrobin	C20H19F3N2O4	409,137	ESI+	4	0,9995	4	0,9992	4	0,9980	4	0,9932
Triticonazole	C17H20CIN3O	318,1368	ESI+	8	0,9985	4	0,9988	8	0,9993	8	0,9996

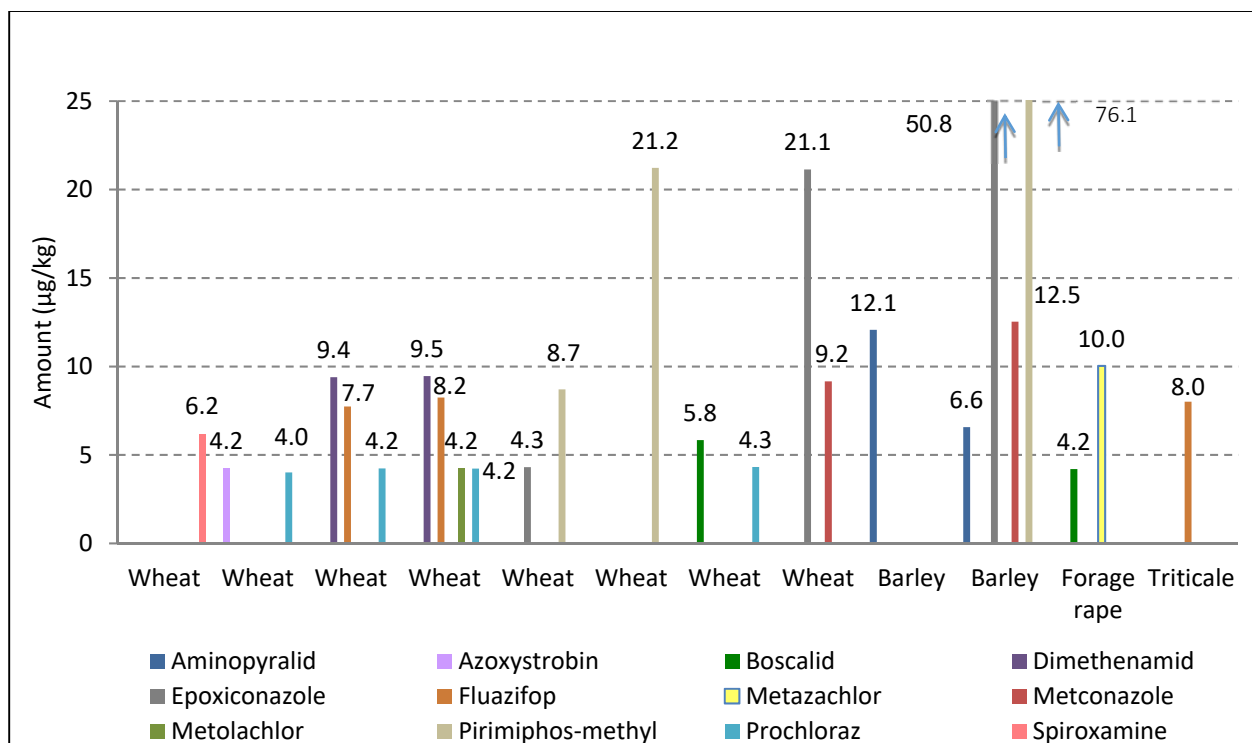
\* ... Lineární v rozsahu RL - 200 µg/kg; NC ... nevy počteno; ND ... nedetekováno

## 7.5 Analýza krmiv s použitím metody pro stanovení pesticidů pomocí LC-HRMS analýzy

Metoda byla použita pro analýzu přítomnosti pesticidů ve vzorcích krmiv a materiálu pro jejich výrobu. Pesticidy byly obsaženy ve 44 % vzorků (Obrázek 7). Žádný vzorek však neobsahoval pesticidy v množství, které by převyšovalo MRL (Obrázek 8).



Obrázek 7. Pozitivní a negativní nálezy pesticidů v testovaných vzorcích.



Obrázek 8. Výskyt pesticidů v testovaných vzorcích.

## 7.6 Ověření funkčnosti metody v testu způsobilosti

Možnosti screeningu byly ověřeny účastí v mezinárodním mezilaboratorním porovnávacím testu pořádaného Evropskou referenční laboratoří pro ovoce a zeleninu s označením EUPT-FV-SM-07. Celková úspěšnost detekce pesticidů činila 100 %.

## 8 Závěr

Últraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s vysokorozlišujícím hmotnostním spektrometrem umožňuje měřit přesné hmotnosti sloučenin. Tento systém je vhodný pro rutinní analýzy velkého množství pesticidů v různorodých matricích. Vzhledem k tomu, že mohou být některé fragmenty produkovány také z matričních koextraktů nebo strukturně podobných koelujících látek, je vhodnější k identifikaci látky použít více než jeden fragment a eliminovat tak riziko náhodné interference.

Hlavními výhodami použití této techniky pro screening pesticidů jsou: (i) produktové ionty jsou teoreticky eluovány pro každý analyt v každé analýze – za předpokladu jeho extrakce z matrice a ionizace; (ii) jak molekulární ion, tak fragmenty mohou být použity pro kvantifikaci; a vysoká rychlost sběru dat, která umožňuje kvantifikaci analytů.



Tato metoda může být použita jak pro cílenou analýzu reziduí pesticidů, tak pro screening necílených látek. Navíc může být aplikována retrospektivní analýza dat k detekci necílových látek, a to bez nutnosti opakování analýzy daného vzorku.

## 9 Literatura

1. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015.
2. Varga et. al, RAFA (2013), 340.
3. Koesukwiwat, online [10.03.2016]:
4. [http://www.covance.com/content/dam/covance/assetLibrary/articles/PesticideResidues\\_A\\_RTNCFS001.pdf](http://www.covance.com/content/dam/covance/assetLibrary/articles/PesticideResidues_A_RTNCFS001.pdf).
5. Gómez-Ramos et. al, Journal of Chromatography A, 1287 (2013), 24–37.
6. Zomer et. al, Food Additives & Contaminants: Part A, 32 (2015), 1628–1636.

# **Zavedení metody založené na analýze mikrosatelitů (SSR markerů) pro identifikaci odrůd kukuřice**

*Kateřina Staňková*

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

## **1 Úvod**

Tradiční identifikace odrůd kukuřice v praxi probíhá na základě porovnání charakteristických morfologických znaků. Projev morfologických charakteristik je závislý na přírodních podmínkách, individuální rostlinné biologii, fázi vývinu rostliny a zdravotním stavu rostliny. Genetické markery se staly vhodným způsobem, jak nejen urychlit a zefektivnit proces identifikace odrůd, tvorby odrůd nových, ale i současně kontrolovat základní parametry množitelského materiálu – odlišitelnost, vyrovnanost a stálost.

Pro identifikaci odrůd kukuřice se prozatím ukázala jako nejvhodnější metoda SSR (Simple Sequence Repeat, mikrosatelity). Mikrosatelitní markery jsou druhově specifické, vysoce polymorfní, kodominantní, rovnoměrně zastoupeny v celém genomu, nezávislé na podmínkách vnějšího prostředí a jednoduše detekovatelné pomocí polymerázové řetězové reakce.

## **2 Princip**

Princip metody SSR je založen na amplifikaci mikrosatelitních oblastí (úseků DNA), které jsou stále v rámci jedné odrůdy, ale vysoce odlišné ve srovnání mezi odrůdami. Tyto krátké motivy se proto dají využít jako klíč k identifikaci neznámých odrůd. Mikrosatelity představují oblasti v DNA složené z mnohokrát se opakujících jednoduchých motivů o délce 1 až 6 nukleotidů jako jsou např. (A)<sub>n</sub>, (AG)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>. Tyto opakující se motivy se nazývají repeticce. Jejich celková délka obvykle nepřesahuje 100 bp.

Základem metody je detekce SSR pomocí polymerázové řetězové reakce (dále PCR). Jedná se o hojně používanou metodu, při které dochází k mnohonásobnému namnožení (amplifikaci) oblasti, která výše uvedená opakování obsahuje. PCR se provádí automatizovaně v termálním

cyklu. 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 krátké oligonukleotidy (primery) specifické k úsekům DNA bezprostředně přiléhajícím k mikrosatelitní sekvenci. Ve třetím kroku cyklu, tzv. extenzi, jsou primery prodlužovány DNA-polymerázou. Následující cyklus začíná opět denurací dvouvláknové DNA a vše se opakuje. Počet cyklů PCR je závislý na optimalizaci teplot a doby trvání jednotlivých kroků reakce, složení reakční směsi a množství templátové DNA. Celkový produkt PCR se nazývá ampikon. Má definovanou délku pohybující se od desítek až po stovky párů bází (bp), která se stanoví pomocí kapilární elektroforézy na fragmentovém analyzátoru.

### **3 Cíl**

Cílem práce bylo zavést metodu pro identifikaci odrůd kukuřice pomocí dvanácti SSR markerů (mikrosatelitů), konkrétně bnlgl1129, phi015, phi083, phi102228, phi109275, phi233376, umc1061, umc1117, umc1133, umc1448, umc1478 a umc1545. Tyto makery doporučuje mezinárodní asociace pro zkoušení osiv (ISTA) jako vhodné deskriptory pro identifikaci odrůd kukuřice. Pro výše uvedené markery není dostupná databáze umožňující porovnání výsledků analýz SSR markerů testovaných vzorků.

### **4 Materiál a metody**

Při práci se vycházelo z v laboratoři dosud zavedených metod:

JPP ÚKZÚZ 10250 Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR

JPP ÚKZÚZ 40300.1 Stanovení přítomnosti fytoplazem metodou PCR

a ze zkušeností získaných při zavádění metody založené na analýze mikrosatelitů pro identifikaci odrůd révy vinné.

## 4.1 Přístroje a pomůcky

Sterilní třecí misky s tloučky vychlazené na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Rotorový rychlomlýnek Pulverisette 14, FRITSCH, DEU .

Váhy s přesností 0,01 g.

Navážovací lžička nebo kopistka.

Vortex.

Chlazená centrifuga.

Vodní lázeň nebo termoblok ( $65^{\circ}\text{C}$ ).

Nízkoobjemový spektrofotometr (230; 260; 280) nm, NanoDrop2000, Thermo Scientific, USA.

Minicentrifuga.

PCR box.

Termální cykler, C1000 Touch <sup>TM</sup> Thermal Cykler, BIO-RAD, USA.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Elektroforetická vana a zdroj napětí.

Transiluminátor.

Fotodokumentační zařízení s příslušným SW.

Fragmentový analyzátor se SW PROSize 2,0, Fragment Analyzer, Advanced Analytical, USA.

pH metr.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000)  $\mu\text{l}$  a sterilní špičky s filtrem.

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

96jamkové a hlubokojamkové destičky.

Samolepicí fólie.

Centrifuga pro 96jamkové destičky.

Výrobník ledu.

Mrazicí box,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Chladnička.

Horkovzdušná sušárna.

Přenosná UV lampa.

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

Materiál se sterilizuje a dekontaminuje buď tepelně, tj. v sušárně 1 h při ( $115 - 120$ )  $^{\circ}\text{C}$ , nebo chemicky, např. dekontaminačním roztokem, (0,5 – 1)% chlornanem sodným, apod. Zvolený způsob záleží na povaze materiálu.

## 4.2 Chemikálie

### 4.2.1 DNeasy® Plant Mini Kit - kit pro izolaci genomické DNA z rostlinných buněk a pletiva (Qiagen)

DNeasy Mini Spin Columns (bezbarvé).

QIAshredder Mini Spin Columns (fialové).

Collection Tubes (2 ml).

Buffer AP1.

Buffer P3.

Buffer AW1 (koncentrát), před prvním použitím se ředí (95 – 100)% etanolem podle návodu výrobce kitu.

Buffer AW2 (koncentrát), před prvním použitím se ředí (95 – 100)% etanolem podle návodu výrobce kitu.

Buffer AE.

RNase A (100 mg/ml).

### 4.2.2 Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen)

Type-it Multiplex PCR Master Mix, 2×.

RNase-Free voda.

### 4.2.3 Amplifikační primery

#### Referenční gen

IVRI-F: CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC.

IVRI-R: GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C.

#### SSR markery

bnlg1129 F: GAG AGT ATG CTA CTC GCC GC.

bnlg1129 R: GAC GAG TTT GGA GTG CCA TT.

phi015 F: GCA ACG TAC CGT ACC TTT CCG A.

phi015 R: ACG CTG CAT TCA ATT ACC GGG AAG.

phi083 F: CAA ACA TCA GCC AGA GAC AAG GAC.

phi083 R: ATT CAT CGA CGC GTC ACA GTC TAC T.

phi102228 F: ATT CCG ACG CAA TCA ACA.

phi102228 R: TTC ATC TCC TCC AGG AGC CTT.

phi109275 F: CGG TTC ATG CTA GCT CTG C.

phi109275 R: GTT GTG GCT GTG GTG GTG.  
phi233376 F: CCG GCA GTC GAT TAC TCC.  
phi233376 R: CGA GAC CAA GAG AAC CCT CA.  
umc1061 F: AGC AGG AGT ACC CAT GAA AGT CC.  
umc1061 R: TAT CAC AGC ACG AAG CGA TAG ATG.  
umc1117 F: AAT TCT AGT CCT GGG TCG GAA CTC.  
umc1117 R: CGT GGC CGT GGA GTC TAC TAC T.  
umc1133 F: ATT CGA TCT AGG GTT TGG GTT CAG.  
umc1133 R: GAT GCA GTA GCA TGC TGG ATG TAG.  
umc1448 F: ATC CTC TCA TCT TTA GGT CCA CCG.  
umc1448 R: CAT ATA CAG TCT CTT CTG GCT GCT CA.  
umc1478 F: GAA GCT TCT CCT CTC GCG TCT C.  
umc1478 R: CAG TCC CAG ACC CTA GCT CAG TC.  
umc1545 F: GAA AAC TGC ATC AAC AAC AAG CTG.  
umc1545 R: ATT GGT TGG TTC TTG CTT CCA TTA.

### **Příprava amplifikačních primerů**

Primery se rozpustí, ředí a rozdělí do potřebných množství následujícím způsobem.

#### ***Zásobní roztok o koncentraci 100 $\mu$ M***

Do zkumavky s primerem v podobě prášku na dně se přidá pracovní roztok TE pufru v množství, které uvádí výrobce. Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok, který se rozpipetuje po 30  $\mu$ l do zkumavek o objemu 0,5 ml. Zkumavky s primery se zamrazí a uchovávají při  $-20$  °C.

#### ***Pracovní roztok o koncentraci 10 $\mu$ M***

Do jedné zkumavky zásobního roztoku se přidá devítinásobný objem pracovního roztoku TE pufru. Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se po 15  $\mu$ l a zamrazí se na  $-20$  °C. Do reakční směsi PCR se přidávají pracovní roztoky primerů.

### **4.2.4 DNF-900 ds DNA reagent Kit, (35 – 500) bp (Advanced Analytical)**

FA dsDNA Gel, 35 bp – 500 bp.

Interkalační barvivo.

5  $\times$  koncentrovaný dsDNA Inlet Buffer.

5 × koncentrovaný Capillary Conditioning Solution.

35/500 bp marker.

(75 – 400) bp DNA Ladder.

Minerální olej.

1 × ředící TE pufr.

Příprava dsDNA gelu:

Gel se skladuje při 4 °C, interkalační barvivo při –20 °C. Před použitím se obě reagenty vytemperují na laboratorní teplotu. Smíchají se příslušné objemy gelu a interkalačního barviva v množství podle počtu analyzovaných vzorků, viz Tabulka 1. Mírným poklepem o dlaň se v gelu rozmíchá interkalační barvivo. Při míchání se dbá na to, aby nedocházelo ke vzniku bublin. Zkumavka s gelem se umístí do přístroje.

**Tabulka 1. Tabulka znázorňující potřebné množství gelu a interkalačního barviva pro uvedený počet analyzovaných vzorků (jamek).**

Počet analyzovaných vzorků	Objem interkalačního barviva (μl)	Objem gelu (ml)
12	0,5	10
24	0,75	15
36	1,0	20
48	1,25	25
96	2,25	45

Příprava 1 × Inlet buffer

5 × Inlet buffer se skladuje při 4 °C. Před ředěním se vytemperuje na laboratorní teplotu. Do 50ml kónické zkumavky se nalije 10 ml 5 × Inlet buffer a doplní se vodou do objemu 50 ml. Třepáním se promíchá. Takto připravený roztok se napipetuje v množství 1 μl do každé jamky řady A hlubokojamkové destičky. Destička se umístí do přístroje. Zbylý naředěný roztok se skladuje při 4 °C

Příprava 1 × Capillary conditional solution

5 × Capillary conditional solution se skladuje při laboratorní teplotě. Do 50ml kónické zkumavky se nalije 10 ml 5 × Capillary conditional solution a doplní se vodou do objemu 50 ml. Třepáním se promíchá. Zkumavka s capillary conditional solution se umístí do přístroje. Naředěný roztok se skladuje při laboratorní teplotě.

Příprava 35bp/500 bp markeru

35/500 bp marker se skladuje při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před použitím se vytemperuje na laboratorní teplotu. Po rozpuštění se roztok protřepe nebo promíchá na vortexu a centrifuguje na minicentrifuze. Do každé jamky řady A 96 - jamkové PCR destičky se napipetuje 30  $\mu\text{l}$  markeru. Destička se zcentrifuguje na deskové centrifuze (3000 rpm, 2 min). Každá jamka se překryje 20  $\mu\text{l}$  minerálního oleje, aby se zajistila možnost opětovného použití. Deska se umístí do přístroje. Takto připravená deska se může použít pro 30 aplikací.

Příprava DNA Ladderu 75-400 bp

DNA Ladder 75-400 bp se skladuje při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před použitím se vytemperuje na laboratorní teplotu. Po rozpuštění se roztok protřepe nebo promíchá na vortexu a zcentrifuguje na minicentrifuze.

#### **4.2.5 Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE**

Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .

Trizma base.

Ledová kyselina octová.

Příprava TAE pufru:

##### ***Příprava zásobního roztoku 50 $\times$ TAE***

1. Příprava 0,5 M zásobního roztoku EDTA:

186,1 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  se vmíchá do (750 – 800) ml (re)destilované vody.  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  se úplně nerozpustí, dokud nebude pH vyšší než 7,0. pH se upraví na 8,5 přidáním 1M NaOH. Potom se doplní (re)destilovanou vodou do objemu 1000 ml. Přefiltruje se přes hustý filtrační papír. Roztok se skladuje neomezeně při laboratorní teplotě.

2. Příprava 2 M Tris:

Naváží 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 $\times$ TAE pro elektroforézu***

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



## **Příprava agarózového gelu**

Používá se 1% gel pro stanovení kvality vyizolované DNA (0,5 g agarózy) a 2% gel pro hodnocení amplifikačních fragmentů referenčního genu (1 g agarózy). Do Erlenmeyerovy baňky se naváží dané množství práškové agarózy a přidá se 50 ml pracovního 1 × TAE pufru. Vaří se při teplotě (150 – 200) °C na elektromagnetickém míchadle (15 – 20) min do doby, až se vyčeří roztok a vymizí vzduchové bubliny. Mezitím se připraví nalévací vanička a vhodný hřebínek. Po mírném zchlazení se přidá 7,5 µl pracovního roztoku ethidiumbromidu (interkalační barvivo, které slouží ke zviditelnění DNA v gelu) a míchá se 1 min. Poté se míchadlo vyjme 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 × TAE pufru.

### **4.2.6 Ostatní**

(96 – 100)% etanol.

Voda vhodná pro PCR.

(re)destilovaná voda.

Zásobní roztok Tris-EDTA buffer solution 100 × (dále TE pufr). Pracovní roztok 1 × se získá zředěním zásobního roztoku (re) destilovanou vodou.

Agaróza.

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

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

6 × Loading Dye Solution.

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

Capillary storage buffer, Advanced Analytical.

Tekutý dusík.

(0,5 – 1)% roztok chlornanu sodného.

70% etanol.

Dekontaminační roztok.

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.

## 5 Testovaný materiál

Pro otestování bylo vybráno dvacet vzorků kukuřice. Od každého vzorku byl otestován čerstvý rostlinný materiál – list a osivo. Vzorky byly rozděleny do několika skupin, viz Tabulka 2.

**Tabulka 2. Seznam vzorků kukuřice dodaných pro analýzu SSR markerů.**

1	R09050 x R05056	na poli potvrzené podobné odrůdy
2	R10040 x R09050	
3	SM599	na poli potvrzené podobné odrůdy
4	SM598	
5	Celive	srovnání nového osiva pro prodloužení registrace a standardního vzorku uloženého po registraci
6	Celive	
7	Gavott	srovnání nového osiva pro prodloužení registrace a standardního vzorku uloženého po registraci
8	Gavott	
9	CSM2259	srovnání osiva z úřadu z Belgie a dodaného pro účely registrace
10	CSM2259	
11	Cejih	kontrola vzorce jednoduchého hybridu
12	2169	
13	2629	
14	Cewel	kontrola vzorce složitějšího hybridu
15	2232 x 2079	
16	2232	
17	2079	
18	2550	
19	SL14078	Jednoduchý hybrid na pozici matky a na pozici otce. Od této dvojice nevím co očekávat.
20	SL14256	

## 6 Pracovní postup

### Homogenizace rostlinného materiálu pomocí tekutého dusíku

1. DNA se extrahuje z materiálu čerstvého nebo zamraženého na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nejdříve se tekutým dusíkem vychladí třecí misky i tloučky tak, že se tekutý dusík nalije do misky a postupně se přilévá až do řádného zchlazení misky, při kterém již nedochází k výraznému odpařování dusíku.

K dusíku v misce se přidá tkáň a pomocí tloučky se rozmělní na jemný prášek. 100 mg získaného prášku se vychlazenou kopistkou či lžičkou přenesou do zkumavky s 500  $\mu\text{l}$  pufru AP1.

Aby se zamezilo nukleolytickému štěpení DNA, musí se s rozmělněným materiálem pracovat rychle. Nenechává se roztát, co nejdříve se přenese do extrakčního pufru AP1. Po započetí lýze vzorku se s roztokem manipuluje velmi jemně a opatrně, protože vlákna DNA, která se do roztoku uvolňují, jsou velmi náchylná na mechanické poškození. Opatrným zacházením se zajistí co nejlepší celistvost vyextrahované DNA.

### **Homogenizace osiva pomocí rotorového rychlomlýnku**

Celý vzorek osiva se mele v rotorovém rychlomlýnku. Doba mletí a rychlost rotace se uzpůsobí množství vzorku. Je nutné dbát na to, aby se vzorek při mletí nezahřál nad 40 °C, aby nedošlo ke znehodnocení DNA. Po ukončení mletí se veškeré součásti mlýnku omyjí vodou a dekontaminačním roztokem. Vzorek se navažuje v množství 100 mg na 0,01 g do sterilních předem označených zkumavek.

### **Izolace DNA**

Vlastní extrakce DNA probíhá v několika krocích.

Prvním krokem extrakce DNA je buněčná lyze. Do každé zkumavky se vzorkem a pufrem AP1 se přidají 4 µl RNázy A. Obsah zkumavek se krátce promíchá na vortexu. Inkubuje se 10 min při 65 °C ve vodní lázni. Během inkubace se vzorky otočením zkumavky 2 × až 3 × promíchají. Získá se buněčný lyzát. Dalším krokem je vysrážení zbytků. K buněčnému lyzátu se přidá 130 µl pufru P3, promíchá se a inkubuje se 5 min na ledu. Centrifuguje se 5 min při 14000 ot/min. Supernatant se pipetuje do QIAshreddes Mini spin kolonek (fialové), které jsou umístěny ve sběrných 2ml zkumavkách a centrifuguje se 2 min při 14000 ot/min. Fialová kolonka slouží k mechanické filtraci zbytků buněčných stěn, precipitovaných proteinů a polysacharidů.

Následuje vázání DNA. Proteklá tekutina se přenese do nové 2ml zkumavky a přidá se 750 µl pufru AW1. Promíchá se opakovaným pipetováním. Napipetuje se 650 µl vzniklé směsi do kolonek DNeasy Mini spin (bezbarvé), umístěných ve sběrných zkumavkách. Centrifuguje se při 8000 ot/min. Proteklá tekutina se vylije. Zopakuje se předchozí krok se zbytkem směsi. V bílých kolonkách dochází k zachycení precipitované DNA, zatímco zbytkové proteiny a polysacharidy jsou odstraněny dvěma po sobě jdoucími promývacími kroky. DNeasy Mini spin kolonky se přemístí do nových sběrných zkumavek a přidá se 500 µl pufru AW2. Centrifuguje se 1 min při 8000 ot/min. Proteklá tekutina se vylije. Znovu se přidá 500 µl pufru AW2 a centrifuguje se 2 min při 14000 ot/min. Posledním krokem extrakce DNA je její eluce. Dochází při ní k uvolnění navázené DNA z membrány kolonky. Kolonky DNeasy Mini spin

se přemístí do nových zkumavek a přesně na membránu se napipetuje 100  $\mu$ l pufru AE. Inkubuje se 5 min při laboratorní teplotě a poté se centrifuguje 1 min při 8000 ot/min. Proteklá tekutina neboli eluát obsahuje čistou genomovou DNA. Pro krátkodobé skladování se uchovává při teplotě (2 – 8) °C, pro dlouhodobé při –20 °C.

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

Důležitým krokem po vyextrahování DNA je spektrofotometrické stanovení její koncentrace a čistoty (tj. dalších příměsí) a zjištění její kvality – celistvosti pomocí gelové elektroforézy v 1% agarózovém gelu.

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

Měření při vlnových délkách (230, 260 a 280) nm umožňuje vedle 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). Hodnota  $\sim$  1,8 se označuje jako čistá DNA. Jestliže je naměřená hodnota pod 1,7, je DNA znečištěná proteiny nebo polyfenoly. Pokud je naměřená hodnota nad 2,0, je DNA znečištěná RNA.

Hodnoty poměru 260/230 musejí být vyšší než 1,5. Ideální hodnoty jsou (2,0 – 2,2). Pokud je naměřená hodnota nižší než 1,5, je získaná DNA kontaminovaná polysacharidy a fenoly.

### **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 AE z kitu DNeasy Mini Kit). Použijí se 2  $\mu$ l vzorku. Každý vzorek se měří 2  $\times$ . Naměřené hodnoty se zprůměrují. Pro následnou PCR zpravidla vyhovují koncentrace v rozmezí (10 – 20) ng/ $\mu$ l templátové DNA. Pokud je její koncentrace vyšší, je třeba ji na tuto hodnotu naředit vodou vhodnou pro PCR podle níže uvedeného vztahu. Snížením koncentrace DNA se sníží i koncentrace případných inhibitorů reakce, které mohou být ve vzorku přítomny.

$$d = (x \times y)/z \quad v = x - d$$

x požadované množství naředěné DNA ( $\mu\text{l}$ ),

y požadovaná koncentrace DNA ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ),

z změřená koncentrace DNA ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ),

d množství námi vyextrahovaného vzorku potřebného pro přípravu x  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci DNA z ( $\mu\text{l}$ ),

v množství PCR vody potřebné pro ředění vyextrahované DNA na požadovanou koncentraci.

### **Určení kvality vyextrahované DNA**

Pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu se zjistí kvalita vyextrahované DNA (zda je celistvá nebo degradovaná), přítomnost RNA a proteinů.

Vzorky se smíchají s barvivem 6  $\times$  Loading Dye Solution v množství 1  $\mu\text{l}$  barviva a 5  $\mu\text{l}$  vyextrahované DNA a spolu s Load Precision Molecular Mass standardem se nanesou do jamek gelu a spustí se elektroforéza (70 V, 75 min).

Po dostatečném rozdělení fragmentů se vyjme gel z lázně a prosvítí se na transiluminátoru. Proveďte se fotodokumentace. Snímky se popíší a vyhodnotí.

### **Polymerázová řetězová reakce**

PCR box se 30 min vysvítí UV zářením. Předměty umístěné v boxu a jeho prostor se dekontaminují dekontaminačním roztokem. 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 kontrola a kontrola prostředí). Podle tabulky 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 jejím převrácením nebo krátkým a jemným vortexováním a zcentrifugují se na minicentrifuze. PCR směs se připravuje na ledu. Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce (Tabulka 3). Reakční směs se opatrně, ale důkladně promíchá (obracení zkumavky, vortex) a rozdělí se po 20  $\mu\text{l}$  do označených zkumavek. Poté se do zkumavek přidá 5  $\mu\text{l}$  templátové DNA. Do beztemplátové kontroly a kontroly prostředí se místo DNA přidá voda vhodná pro PCR. Pipetuje se v tomto pořadí: beztemplátová kontrola (Bt), vzorky a kontrola prostředí (ENV). Zkumavky se pečlivě zavíčkují, aby se zabránilo

vypařování směsi během reakce. Zkumavka s kontrolou prostředí se nechá otevřená po celou dobu pipetování. Zkumavky se promíchají mírným poklepem, zcentrifugují se na minicentrifuze, vloží se do termálního cykleru a zahájí se příslušná PCR amplifikace.

**Tabulka 3. Složení reakční směsi.**

Složka	1 reakce (μl)
PCR voda	5,5
Type-it Multiplex PCR Master Mix, 2×	12,5
Primer F	1
Primer R	1
Templát	5

Objem amplifikačního kitu Type-it je neměnný. Objemy templátu, primerů a vody vhodné pro PCR se mohou měnit za účelem dosažení optimálního průběhu PCR reakce, přičemž voda pouze doplňuje reakci na požadovaný objem 25 μl.

### Kukuřičný referenční gen neboli škrobová invertáza

primery: IVRI-F, IVRI-R

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

Délka amplikonu: 225bp.

### bnlg1129

primery: bnlgl1129F, bnlgl1129 R

Amplifikační program	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	62	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka amplikonů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 170 bp až 210 bp.

### phi015

primery: phi015F, phi015R

Amplifikační program	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	66,5	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 80 bp až 110 bp.

### phi083

primery: phi083F, phi083R

Amplifikační program	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	66,5	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 120 bp až 140 bp.

### phi102228

amplifikační primery: phi102228F, phi102228R

Amplifikační program	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	66,5	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 120 bp až 130 bp.

**phi109275**

amplifikační primery: phi109275F, phi109275R

Amplifikační program	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	68	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 120 bp až 150 bp.**phi233376**

amplifikační primery: phi233376F, phi233376R

Amplifikační program	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	68	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 130 bp až 165 bp.**umc1061**

amplifikační primery: umc1061F, umc1061R

Amplifikační program	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	62	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 90 bp až 120 bp.



**umc1117**

amplifikační primery: umc1117F, umc1117R

<b>Amplifikační program</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas (s)</b>	<b>Počet cyklů</b>
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	66,5	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 140 bp až 170 bp.**umc1133**

amplifikační primery: umc1133F, umc1133R

<b>Amplifikační program</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas (s)</b>	<b>Počet cyklů</b>
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	66,5	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 90 bp až 140 bp.**umc1448**

amplifikační primery: umc1448F, umc1448

<b>Amplifikační program</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas (s)</b>	<b>Počet cyklů</b>
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	66,5	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 160 bp až 185 bp.

## umc1478

amplifikační primery: umc1478F, umc1478R

Amplifikační program	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	68	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 130 bp až 150 bp.

## umc1545

amplifikační primery: umc1545F, umc1545R

Amplifikační program	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	66,5	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

Délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, přibližně v rozmezí 60 bp až 85 bp.

## Detekce DNA fragmentů

Elektroforéza amplifikačních fragmentů referenčního genu v 2% agarózovém gelu

Objem vzorku nanášeného do jamky závisí na typu hřebínku. Promyslí se rozvržení vzorků a markerů. Vzorky před nanesením do jamek se barví roztokem 6 × Loading Dye Solution. Po nanesení vzorků amplifikátů a markerů se spustí chod elektroforézy (80 – 100) V, (60 – 75) min. Po dostatečném rozdělení fragmentů se vyjme gel z lázně a prosvítí se na transiluminátoru. Provede se fotodokumentace. Snímky se popíše a vyhodnotí.

Kapilární elektroforéza

Do každé z jamek 1 až 11 v 96jamkové destičce, která bude obsahovat vzorek, se napipetuje 1 × ředící TE pufr a vzorek. Ideální objem je 23 μl 1 × ředícího pufru a 3 μl vzorku. Tyto objemy lze měnit podle potřeby s tím, že celkový objem v jamce musí být minimálně 24 μl.

Do 12. jamky se napipetuje 24 μl DNA Ladderu. Směs v jamkách se promíchá opakovaným nasáváním pipetou nebo vortexem. Po promíchání se deska překryje samolepicí fólií

a centrifuguje 2 min při 3000 rpm. Pokud se nespustí elektroforéza ihned po napipetování vzorků, překryje se každá jamka 20  $\mu$ l minerálního oleje, aby se zabránilo vypařování vzorku. Takto připravená deska se umístí do fragmentového analyzátoru a spustí se elektroforéza. Po ukončení kapilární elektroforézy se vyhodnotí získaná data pomocí vyhodnocovacího software přístroje.

## 7 Výsledky a diskuse

Při této se vycházelo z literárních rešerší, doporučení ISTA a z dosavadních znalostí a zkušeností. U všech vzorků, tj. jak osiva, tak i listů, byl otestován způsob homogenizace, extrakce DNA a optimalizace podmínek pro amplifikaci níže uvedených dvanácti SSR markerů (Tabulka 4), které byly zvoleny z doporučení ISTA.

**Tabulka 4. 12 SSR markerů podle doporučení ISTA.**

	SSR marker	Opakovaný motiv	Rozmezí bp	Pozorovaný počet alel
1	bnlg1129	(AG) <sub>12</sub>	170 – 210	5
2	phi015	AAAC	80 – 140	6
3	phi083	(AGCT) <sub>2</sub>	120 – 140	5
4	phi102228	AAGC	120 – 130	3
5	phi109275	AGCT	120 – 150	5
6	phi233376	CCG	130 – 165	6
7	umc1061	(TCG) <sub>6</sub>	90 – 120	4
8	umc1117	(TCGCA) <sub>4</sub>	130 – 170	3
9	umc1133	ATAC	90 – 140	3
10	umc1448	(GCT) <sub>5</sub>	150 – 185	5
11	umc1478	(GGAG) <sub>4</sub>	130 – 150	4
12	umc1545	(AAGA) <sub>4</sub>	60 - 90	4

### Homogenizace vzorků

Listy byly zamrazeny na  $-80$  °C. Homogenizace proběhla pomocí tekutého dusíku a třecí misky s tloučkem. Výhodou homogenizace v tekutém dusíku je, že se listy mohou zamrazit na  $-80$  °C

na delší dobu a mohou se postupně zpracovávat, kdežto čerstvý rostlinný materiál by se musel zpracovat v co nejkratší době.

Osivo bylo pomleto na rotorovém rychlomlýnku Pulverisette 14. Bylo otestováno minimální potřebné množství pro jednorázové mletí osiva, a to konkrétně (2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 a 50) g a nastavení otáček/min v rozsahu (15000 – 19000). Pro další práci a současně i velikost dodaného vzorku bylo zvoleno množství 5 g a 17000 otáček/min.

### **Extrakce DNA**

Pro extrakci DNA byl zvolen komerčně dodávaný kit DNeasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen, se kterým má laboratoř dobré zkušenosti. Extrakce DNA pomocí tohoto kitu není časově náročná. Součástí kitu jsou dva typy kolonek. Fialová (QIAshredder column) kolonka umožňuje mechanickou filtraci zbytků buněčných stěn, precipitovaných proteinů a polysacharidů. Membrána bezbarvé kolonky (DNeasy column) adsorbuje DNA a opakovanými promývacími kroky umožňuje odstranění sacharidů, polyfenolů a ostatních rostlinných metabolitů. Každý vzorek byl vyextrahován ve dvou paralelních stanoveních.

Z hodnot poměrů absorbancí 260/280 a 260/230 uvedených v Tabulce 2 vyplývá, že tato extrakční metoda je vhodná pro extrakci DNA kukuřice jak z osiva, tak i z listů.

### **Koncentrace a čistota DNA**

Po vyextrahování DNA byla určena její koncentrace a čistota na nízkoobjemovém spektrofotometru. Každý vzorek byl změřen dvakrát a naměřené hodnoty byly zprůměrovány. Koncentrace DNA byla vyšší u osiva než u listů. Čistota DNA z osiva se příliš nelišila od čistoty DNA z listů. Pro následnou amplifikaci by se měla použít stejná koncentrace DNA u každého vzorku, a to 10 ng/μl. Všechny vzorky se naředily na požadovanou hodnotou vodou vhodnou pro PCR. Naředěním vzorků došlo i ke snížení inhibičního účinku kontaminujících látek. Naředěná DNA všech vzorků byla amplifikovatelná.

### **Kvalita DNA**

Kvalita DNA byla určena elektroforézou na 1% agarózovém gelu. U většiny vzorků se získala vysokomolekulární DNA. V některých případech vzorků listů se získala DNA horší kvality,

### **Polymerázová řetězová reakce**

#### **Otestování amplifikovatelnosti DNA**

Pro otestování amplifikovatelnosti vyextrahované DNA byl zvolen tzv. referenční kukuřičný gen - škrobová invertáza. Jedná se o produkt PCR o velikosti 225 bp.

Vyextrahovaná DNA všech vzorků byla amplifikovatelná. Produkt PCR reakce byl detekován elektroforézou na 2% agarózovém gelu.

### **Amplifikace SSR markerů**

Před zahájením vlastních analýz bylo nutné optimalizovat podmínky PCR pro jednotlivé markery. Cílem optimalizace bylo nastavení parametrů reakce tak, aby měla specifický průběh, tj. aby vznikaly detekovatelné produkty specifické velikosti a minimalizoval se výskyt nespecifických produktů a artefaktů, např. stochastický efekt, alelický drop out, nulová alela, stutter píky. Stochastický efekt je způsoben malým množstvím templátové DNA ve vzorku. Může dojít k nevyvážené amplifikaci následované nenasednutím primeru na příslušnou sekvenci. Alelický drop out nastává výpadkem alely v průběhu amplifikace. Důvodem je malá koncentrace templátové DNA. Jedna alela není amplifikovaná, a to vede k falešnému určení homozygota, i když se jedná o heterozygotní genotyp. Nulovými alelami jsou označovány alely, které jsou ve vzorku přítomny, ale nejsou amplifikovány. Příčinou je mutace v sekvenci pro primer, která má za následek nenasednutí primeru a nezamplifikování dané alely. Stutter píky se hojně vyskytují u dinukletidových repetíci. K jejich vzniku dochází prokluzem polymerázy v průběhu elongace DNA. V elektroforetickém záznamu jsou vidět jako menší píky před značenými alelami. Stuttery mohou komplikovat vyhodnocování výsledků.

Z výše uvedených informací vyplývá, že výsledné produkty PCR amplifikace jsou nejvíce ovlivněny kvalitou, čistotou a množstvím DNA.

Optimalizace zahrnovala otestování koncentrace primerů F, R a DNA templátu, teplot denaturace, annealingu a extenze, jejich dobu trvání a počet cyklů. Vybrány byly vzorky 11, 12 a 13. Vzorek č. 11 je jednoduchý hybrid vzniklý křížením mateřské linie - vz. č. 12 a otcovské linie - vz. č. 13.

Pro každý marker byla na celkový objem reakce 25  $\mu$ l reakce vyzkoušena koncentrace (0,2; 0,3; a 0,4)  $\mu$ M každého z primerů F a R a 50 a 100 ng templátové DNA získané z osiva. Amplifikační program vycházel z manuálu ke kitu Type-it<sup>®</sup> Microsatellite PCR. Teplota 95 °C a čas 5 min počáteční denaturace zůstaly podle doporučení manuálu kitu (tato teplota a doba krom úplné denaturace DNA také aktivuje HotStar Taq polymerázu), pro cyklicky se opakující denuraci se ponechala teplota 95 °C a otestovala se doba trvání 30 s a 35 s. Pro teplotu annealingu (přisedání primerů) každého markeru byl využit teplotní gradient termocykleru v rozmezí teplot (53 – 68) °C a otestována doba trvání annealingu 60 s a 75 s. Teplota extenze byla vyzkoušena v rozmezí (68 – 72) °C a době trvání 30 s a 35 s. Pro každý marker bylo

vyzkoušeno (30, 35, 38) cyklů. Pro závěrečnou extenzi byly otestovány teploty 68 °C a 72 °C, doba trvání 10 min a 15 min. Výsledky optimalizace jsou uloženy v PC autorky zprávy.

Po optimalizaci byly pro amplifikaci SSR markerů zvoleny podmínky uvedené v odstavci 6 Pracovní postup. Jak je vidět na obrázcích elektroforeogramů, ani pomocí rozsáhlé optimalizace se nepodařilo odstranit všechny nespecifické produkty PCR reakce. V některých případech se je podařilo alespoň minimalizovat.

Separace produktů amplifikace byla provedena pomocí kapilární elektroforézy na fragmentovém analyzátoru. Výrobce uvádí separační rozlišení fragmentového analyzátoru (5 – 10) bp a správnost DNA sizingu  $\pm 5$  %. Z dále uvedených výsledků je patrné, že pokud probíhá PCR za optimálních podmínek a s DNA o dostatečné koncentraci a kvalitě, lze dosáhnout i separačního rozlišení (2 – 3) bp.

Detekovatelnost ampliconů DNA je závislá na kvalitě gelu a provedení kapilární elektroforézy. Během kapilární elektroforézy může dojít ke vzniku artefaktů, které ovlivní následné vyhodnocení získaných dat. Mezi tyto artefakty patří šum pozadí, pull-up píky nebo spike píky. K šumu pozadí dochází u starších kapilár, staršího gelu, přítomností nečistot v přístroji nebo změnami napětí v průběhu elektroforézy. Pull-up píky jsou malé píky, které se vyskytují přímo pod velkými píky. Jejich vznik způsobuje špatná fluorescenční barva nebo silný signál velkých píků, který vynese barvu píků malých. Spike píky jsou artefakty způsobené nárůstem proudu v kapiláře.

Získaná data byla vyhodnocena pomocí software PROSize 2,0.

Dvanáct výše uvedených markerů bylo otestováno u dvaceti vzorků kukuřice.

Amplifikace každého vzorku a markeru byla provedena ve dvou paralelních stanoveních A a B. Paralela A obsahovala DNA získanou z osiva a paralela B DNA získanou z listu. Vzhledem k tomu, že pro odrůdy kukuřice není dostupná databáze SSR markerů, nebylo možné námi získané výsledky porovnat. Z odborné literatury (viz bod 6 Literatura 9. - 15.) se získala pouze přibližná rozmezí velikostí jednotlivých markerů. Tato rozmezí jsou uvedena ve sloupci předpokládané rozmezí velikostí v tabulkách 5 až 15. Jelikož se testovaly české odrůdy a informace jsou pouze z literatury zahraniční, jsou uvedená rozmezí pouze orientační.

Výsledky amplifikací SSR markerů u jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulkách 5 až 15.

## 1. R09050xR05056 (vzorek č. 1)

Získané výsledky amplifikace jednotlivých SSR byly porovnány s hodnotami uvedenými v odborné literatuře, viz sloupec předpokládané rozmezí velikostí. U většiny markerů byly amplifikací získány produkty odpovídající rozmezí velikostí bp uvedených v Tabulce 5. V některých případech se velikosti námi získaných produktů o 2 bp až 7 bp liší. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byla použita v dostupné odborné literatuře, nebo české odrůdy nemusejí odpovídat uvedenému rozmezí. U markeru bnlgl129 se vedle produktu o velikosti 194 bp, který odpovídá předpokládanému rozmezí velikostí, vyskytuje ještě druhý produkt o velikosti 217 bp. U tohoto produktu je rozdíl proti předpokládanému rozmezí velikostí o 7 bp větší. Při porovnání výšky (hodnoty RFU) obou píků bylo vidět, že pík s velikostí 217 bp je mnohonásobně menší než pík o velikosti 194 bp. Může se jednat o nespecifický produkt, který nesouvisí s markerem bnlgl129. Marker umc1545 se u vzorku č. 1 nevyskytuje.

SSR markery osiva i listů se shodují v rámci správnost DNA sizingu přístroje.

Na některých elektroforeogramech jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se pomocí optimalizace nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

**Tabulka 5. Výsledky amplifikací SSR markerů vzorku č. 1 - R09050xR05056 získané analýzou produktů PCR na fragmentovém analyzátoru.**

SSR marker	Předpokládané rozmezí velikostí	1A	1B
	bp	bp	bp
<b>bnlg1129</b>	170 – 210	194,217	194,217
<b>phi015</b>	80 – 140	98,106	97,105
<b>phi083</b>	120 – 140	129,132,141	129,132,141
<b>phi102228</b>	120 – 130	125	125
<b>phi109275</b>	120 – 150	130,133,136	130,132,136
<b>phi233376</b>	130 – 165	137,139	137,139
<b>umc1061</b>	90 – 120	99,102,104	99,102,104
<b>umc1117</b>	130 – 170	128,131,140	127,131,141
<b>umc1133</b>	90 – 140	90	89
<b>umc1448</b>	150 – 185	151,155,164	151,155,163
<b>umc1478</b>	130 – 150	134,144	134,144
<b>umc1545</b>	60 – 90	-	-

## 2. R10040 x R09050 (vzorek č. 2)

Získané výsledky amplifikace jednotlivých SSR byly porovnány s hodnotami uvedenými v odborné literatuře (viz sloupec předpokládané rozmezí velikostí). U většiny markerů byly amplifikací získány produkty odpovídající rozmezí velikostí bp uvedených v Tabulce 6. V některých případech se velikosti námi získaných produktů o 1bp až 7 bp liší. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byly použity v dostupné odborné literatuře, nebo české odrůdy nemusí odpovídat uvedenému rozmezí. U markeru bnlgl129 se vedle produktu o velikosti 194 bp, který odpovídá předpokládanému rozmezí velikostí, vyskytuje ještě druhý produkt o velikosti 217 bp stejně jako u vzorku č. 1. U tohoto produktu je rozdíl proti předpokládanému rozmezí velikostí o 7 bp větší. Při porovnání výšky (hodnoty RFU) obou pík bylo vidět, že pík s velikostí 217 bp je mnohonásobně menší než pík o velikosti 194 bp. Může se jednat o nespecifický produkt, který nesouvisí s markerem bnlgl129. Marker umc1545 se u vzorku č. 2 nevyskytuje.

SSR markery osiva i listů se shodují v rámci správnost DNA sizingu přístroje.

Na některých elektroforeogramech jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se pomocí optimalizace nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

**Tabulka 6. Výsledky amplifikací SSR markerů vzorku č. 2 - R10040 x R09050 získané analýzou produktů PCR na fragmentovém analyzátoru.**

SSR marker	Předpokládané rozmezí velikostí	2A	2B
	bp	bp	bp
<b>bnlg1129</b>	170 – 210	194,217	194,217
<b>phi015</b>	80 – 140	98,105	98,105
<b>phi083</b>	120 – 140	129,132,141	129,132,141
<b>phi102228</b>	120 – 130	125	125
<b>phi109275</b>	120 – 150	130,132,136	130,132,136
<b>phi233376</b>	130 – 165	137,139	137,139
<b>umc1061</b>	90 – 120	98,101,104	99,102,104
<b>umc1117</b>	130 – 170	129,131,142	128,131,141
<b>umc1133</b>	90 – 140	89	89
<b>umc1448</b>	150 – 185	149,154,163	149,154,162
<b>umc1478</b>	130 – 150	133,143	133,143
<b>umc1545</b>	60 – 90	-	-



U vzorků č. 1 a 2 se jednalo o na poli potvrzené podobné odrůdy. Z porovnání výsledků uvedených v tabulkách 5 a 6 je patrné, že se tyto odrůdy v jednotlivých SSR markerech shodují, a tudíž se jedná o odrůdy stejné nebo velice blízce si podobné.

### 3. SM599 (vzorek č. 3)

Získané výsledky amplifikace jednotlivých SSR byly porovnány s hodnotami uvedenými v odborné literatuře (viz sloupec předpokládané rozmezí velikostí). U většiny markerů byly amplifikací získány produkty odpovídající rozmezí velikostí bp uvedených v Tabulce 7. V některých případech se velikosti námi získaných produktů o 1 bp až 3 bp liší. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byly použity v dostupné odborné literatuře, nebo české odrůdy nemusí odpovídat uvedenému rozmezí. SSR markery osiva i listů se shodují v rámci správnost DNA sizingu přístroje.

Na některých elektroforeogramech jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se pomocí optimalizace nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

**Tabulka 7. Výsledky amplifikací SSR markerů vzorku č. 3 - SM599 získané analýzou produktů PCR na fragmentovém analyzátoru.**

SSR marker	Předpokládané rozmezí velikostí	3A	3B
	bp	bp	bp
<b>bnlg1129</b>	170 – 210	183,205	183, 205
<b>phi015</b>	80 – 140	97,105	97,105
<b>phi083</b>	120 – 140	126,138	126,138
<b>phi102228</b>	120 – 130	117	117
<b>phi109275</b>	120 – 150	130,132,136	130,132,136
<b>phi233376</b>	130 – 165	138,140	137,140
<b>umc1061</b>	90 – 120	99,102,104	99,102,104
<b>umc1117</b>	130 – 170	129,132,142	129,132,142
<b>umc1133</b>	90 – 140	97,101	97,101
<b>umc1448</b>	150 – 185	151,154,163	151,155,164
<b>umc1478</b>	130 – 150	133,143	134,144
<b>umc1545</b>	60 - 90	73,83	73,83

#### 4. SM598 (vzorek č. 4)

Získané výsledky amplifikace jednotlivých SSR byly porovnány s hodnotami uvedenými v odborné literatuře (viz sloupec předpokládané rozmezí velikostí). U většiny markerů byly amplifikací získány produkty odpovídající rozmezí velikostí bp uvedených v Tabulce 8. V některých případech se velikosti námi získaných produktů o 1 bp až 3 bp liší. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byly použity v dostupné odborné literatuře, nebo české odrůdy nemusejí odpovídat uvedenému rozmezí. SSR markery osiva i listů se shodují v rámci správnost DNA sizingu přístroje.

Na některých elektroforeogramech jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se pomocí optimalizace nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

**Tabulka 8. Výsledky amplifikací SSR markerů vzorku č. 4 - SM598 získané analýzou produktů PCR na fragmentovém analyzátoru.**

SSR marker	Předpokládané rozmezí velikostí	4A	4B
	bp	bp	bp
<b>bnlg1129</b>	170 – 210	183,205	183,205
<b>phi015</b>	80 – 140	97,105	97,105
<b>phi083</b>	120 – 140	124, 136	124,135
<b>phi102228</b>	120 – 130	117	117
<b>phi109275</b>	120 – 150	130,133,136	130,133,136
<b>phi233376</b>	130 – 165	137,140	138,140
<b>umc1061</b>	90 – 120	99,102,104	99,102,105
<b>umc1117</b>	130 – 170	128,130,141	128,131,140
<b>umc1133</b>	90 – 140	98,102	97,102
<b>umc1448</b>	150 – 185	149,153,162	149,153,163
<b>umc1478</b>	130 – 150	134,144	134,144
<b>umc1545</b>	60 - 90	73,83	73,83

U vzorků č. 3 a 4 se jednalo o na poli potvrzené podobné odrůdy. Z porovnání výsledků uvedených v tabulkách 7 a 8 je patrné, že se tyto odrůdy v jednotlivých SSR markrech shodují, a tudíž se jedná o odrůdy stejné nebo velice blízce si podobné.

#### 5. Celive (vzorky č. 5 a 6)

Získané výsledky amplifikace jednotlivých SSR byly porovnány s hodnotami uvedenými v odborné literatuře (viz sloupec předpokládané rozmezí velikostí). U většiny markerů byly

amplifikací získány produkty odpovídající rozmezí velikostí bp uvedených v Tabulce 9. V některých případech se velikosti námi získaných produktů o 1 bp až 14 bp liší. U markeru bnlgl129 se vedle produktů o velikosti 177 bp a 193 bp, které odpovídají předpokládanému rozmezí velikostí, vyskytuje ještě třetí produkt o velikosti 224 bp. U tohoto produktu je rozdíl proti předpokládanému rozmezí velikostí o 14 bp větší. Při porovnání výšky (hodnoty RFU) všech píků bylo vidět, že pík s velikostí 224 bp dosahuje zhruba poloviny výšky píku o velikosti 177 bp a blíží se píku o velikosti 193 bp. Vzhledem k jeho hodnotě RFU se nepředpokládá, že se jedná o nespecifický produkt PCR reakce. U markeru umc1448 se u obou vzorků vyskytují další produkty mimo předpokládané rozmezí, a to v rozmezí velikostí (211 – 251) bp. Výšky těchto píků (hodnoty RFU) jsou víc než o polovinu hodnoty RFU menší než produkty hlavní o velikosti (151 – 154) bp. Může se jednat o nespecifické produkty, které nebylo možné pomocí optimalizace PCR reakce odstranit.

U markeru umc1478 se u obou vzorků vyskytují také produkty mimo předpokládané rozmezí, a to rozmezí velikostí (180 – 192) bp. Při porovnání výšky píků bylo vidět, že u vzorku č. 5 jsou velikosti těchto píků vůči píkům odpovídajícím předpokládanému rozmezí zhruba poloviční, ale u vzorku č. 6, jsou výšky všech píků téměř srovnatelné. V případě tohoto markeru nelze jednoznačně říct, že se jedná o nespecifické produkty. Výše uvedené produkty jsou u SSR bnlgl129, umc1448 a umc1478 jsou sice mimo předpokládané rozmezí velikostí, ale i tak produkty odpovídají hodnotám opakujícího se motivu SSR, a to AG u bnlgl129, GCT u umc1448 a GGAG u umc1478. Některé mírné odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byly použity v dostupné odborné literatuře, nebo české odrůdy nemusejí odpovídat uvedenému rozmezí. SSR markery osiva i listů se shodují v rámci správnost DNA sizingu přístroje.

Na některých elektroforeogramech jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se pomocí optimalizace nepodařilo odstranit nebo minimalizovat. U vzorků č. 5 a 6 se jednalo o srovnání nového osiva pro prodloužení registrace a standardního vzorku uloženého po registraci. Z porovnání výsledků uvedených v tabulce 9 je patrné, že se tyto odrůdy ve všech SSR markerech shodují. Jedná se o stejné odrůdy.

**Tabulka 9. Výsledky amplifikací SSR markerů vzorků č. 5 a 6 - Celive získané analýzou produktů PCR na fragmentovém analyzátoru.**

SSR marker	předpokládané rozmezí velikostí	5A	5B	6A	6B
	bp	bp	bp	bp	bp
<b>bnlg1129</b>	170 – 210	177,193,224	177,193,224	176,193,223	177,193,224
<b>phi015</b>	80 – 140	97,105	97,105	97,105	97,105
<b>phi083</b>	120 – 140	125,128,137	125,128,137	126,129,137	126,129,137
<b>phi102228</b>	120 – 130	125	125	125	125
<b>phi109275</b>	120 – 150	125,130,135,147	125,130,135,148	126,132,140,151	126,132,140,152
<b>phi233376</b>	130 – 165	137,140	137,140	137,140	137,140
<b>umc1061</b>	90 – 120	98,102,105	99,102,104	99,102,104	99,102,104
<b>umc1117</b>	130 – 170	127,130,140	128,131,141	128,131,141	128,131,141
<b>umc1133</b>	90 – 140	90	90	89	89
<b>umc1448</b>	150 – 185	151,155,161,164, 173, 214,227,238,250	151,155,161,164, 173, 215,228,239,251	152,155,160,164, 174, 211,223,236,247	152,156,161,164, 174, 212,223,236,248
<b>umc1478</b>	130 – 150	135,141,145,152, 182,191	136,142,146,152, 182,191	137,143,146,153, 180,189	136,142,146,152, 182,192
<b>umc1545</b>	60 - 90	77,86	77,86	77, 86	77, 86

## 6. Gavott (vzorky č. 7 a 8)

Získané výsledky amplifikace jednotlivých SSR byly porovnány s hodnotami uvedenými v odborné literatuře (viz sloupec předpokládané rozmezí velikostí). U většiny markerů byly amplifikací získány produkty odpovídající rozmezí velikostí bp uvedených v Tabulce 10. V některých případech se velikosti námi získaných produktů o 1bp až 3 bp liší. U markerů **bnlg1129** a **umc1448** se u obou vzorků vyskytují další produkty mimo předpokládané rozmezí, a to produkty o velikosti 243 bp a 276 bp pro **bnlg1129** a produkty o rozmezí velikostí (215 – 252) bp pro **umc1448**. Odchyly mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byly použity v dostupné odborné literatuře, nebo české odrůdy nemusejí odpovídat uvedenému rozmezí. U SSR markeru **bnlg1129** jsou produkty 243 bp a 276 bp víc než o polovinu hodnoty RFU menší než produkty hlavní o velikosti (184 - 207) bp. Může se jednat o nespecifické produkty, které nebylo možné pomocí optimalizace PCR reakce odstranit.

SSR markery osiva i listů se shodují v rámci správnost DNA sizingu přístroje.

Na některých elektroforeogramech jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se pomocí optimalizace nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

U vzorků č. 7 a 8 se jednalo o srovnání nového osiva pro prodloužení registrace a standardního vzorku uloženého po registraci. Z porovnání výsledků uvedených v tabulce 10 je patrné, že se tyto odrůdy ve všech SSR markrech shodují. Jedná se o stejné odrůdy.

**Tabulka 10. Výsledky amplifikací SSR markerů vzorků č. 7 a 8 - Gavott získané analýzou produktů PCR na fragmentovém analyzátoru.**

SSR marker	předpokládané rozmezí velikostí	7A	7B	8A	8B
	bp	bp	bp	bp	bp
<b>bnlg1129</b>	170 – 210	184,193,207,243,276	185,194,207,243,276	185,194,207,243,276	185,194,207,243,276
<b>phi015</b>	80 – 140	98,106,114,132	98,106,114,132	98,106,115,131	98,106,114,132
<b>phi083</b>	120 – 140	130,142	130,141	131,142	131,142
<b>phi102228</b>	120 – 130	117,124	118,126	117,124	118,126
<b>phi109275</b>	120 – 150	130,133,136	130,133,136	130,133,136	130,133,136
<b>phi233376</b>	130 – 165	146,149	147,149	146,149	146,149
<b>umc1061</b>	90 – 120	102,105,107	102,105,107	102,104,107	103,105,107
<b>umc1117</b>	130 – 170	127,131,140	127,130,140	128,131,140	127,130,140
<b>umc1133</b>	90 – 140	90,101,124	90,101,124	89,101,124	89,101,124
<b>umc1448</b>	150 – 185	151,161,164,173,215,228,239,252	152,161,165,174,216,229,239,252	152,161,164,173,215,227,239,251	152,161,164,174,215,227,238,251
<b>umc1478</b>	130 – 150	134,144	134,144	134,144	134,144
<b>umc1545</b>	60 - 90	67,77	67,77	67,77	67,77

## 7. CSM2259 (vzorky č. 9 a 10)

Získané výsledky amplifikace jednotlivých SSR byly porovnány s hodnotami uvedenými v odborné literatuře (viz sloupec předpokládané rozmezí velikostí). U většiny markerů byly amplifikací získány produkty odpovídající rozmezí velikostí bp uvedených v Tabulce 11. V některých případech se velikosti námi získaných produktů o 1 bp až 3 bp liší. U markerů bnlg1129, umc1117, umc1448 a umc1478 se u obou vzorků vyskytují další produkty mimo předpokládané rozmezí, a to produkty o rozmezí velikostí (232 – 260) bp pro bnlg1129, (177 – 187) bp pro umc1117, (214 – 234) bp pro umc1448 a (159 – 173) pro umc1478. Odchytky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byly použity v dostupné odborné literatuře, nebo české odrůdy nemusí odpovídat uvedenému rozmezí. U všech čtyř výše uvedených SSR markerů jsou produkty mimo rozmezí velikostí bp o polovinu menší než produkt v rozmezí bp.

Může se jednat o nespecifické produkty, které nebylo možné pomocí optimalizace PCR reakce odstranit.

SSR markery osiva i listů se shodují v rámci správnost DNA sizingu přístroje.

Na některých elektroforeogramech jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se pomocí optimalizace nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

U vzorků č. 9 a 10 se jednalo o osiva z úřadu z Belgie dodaného pro účely registrace.

Z porovnání výsledků uvedených v tabulce 11 je patrné, že se tyto odrůdy ve všech SSR markrech shodují. Jedná se o stejné odrůdy.

**Tabulka 11. Výsledky amplifikací SSR markerů vzorků č. 9 a 10 - CSM2259 získané analýzou produktů PCR na fragmentovém analyzátoru.**

SSR marker	předpokládané rozmezí velikostí	9A	9B	10A	10B
	bp	bp	bp	bp	bp
<b>bnlg1129</b>	170 – 210	185,195,207,233,259	186,196,208,235,259	185,195,207,232,260	185,195,206,232,260
<b>phi015</b>	80 – 140	98,106	98,106	98,106	98,106
<b>phi083</b>	120 – 140	130,133,141	130,133,141	130,133,141	130,133,141
<b>phi102228</b>	120 – 130	117,121	118,122	117,120	118,122
<b>phi109275</b>	120 – 150	124,127,131	124,127,131	124,127,131	125,127,131
<b>phi233376</b>	130 – 165	137,140,154,157	137,140,154,159	138,140,155,157	138,140,154,157
<b>umc1061</b>	90 – 120	103,105,107	103,105,107	103,105,107	103,105,107
<b>umc1117</b>	130 – 170	133,137,140,144 148,170,177,181 187	134,137,140,145 148,171,177,181 81 187	133,137,139,144 148,170,177,180 187	133,136,139,144 148,170,176,180 186
<b>umc1133</b>	90 – 140	90,102,123	89,101,122	90,102,123	90,101,122
<b>umc1448</b>	150 – 185	152,156,164,178, 214,221,226,234	153,156,165,178, 214,221,226,224	152,156,165,178, 214,221,226,233	152,155,164,178, 214,221,225,233
<b>umc1478</b>	130 – 150	138,143,146,148, 154,160,172	138,143,145,148, 154,159,171	138,143,146,148, 151,160,172	139,144,147,149, 155,161,173
<b>umc1545</b>	60 - 90	67,74,77	67,74,77	67,74,77	67,74,77

## 8. Cejih (vzorek č. 11), 2169 (vzorek č. 12) a 2629 (vzorek č. 13)

Získané výsledky amplifikace jednotlivých SSR byly porovnány s hodnotami uvedenými v odborné literatuře (viz sloupec předpokládané bp uvedených v Tabulce 12). V některých případech se velikosti námi získaných produktů o 2 bp až 6 bp liší. Odchytky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byly použity v dostupné odborné literatuře, nebo české

odrůdy nemusejí odpovídat uvedenému rozmezí. U vzorků č. 11, 12 a 13 se jednalo o kontrolu vzorce jednoduchého hybridu, kde vzorek č. 11 je jednoduchý hybrid vzniklý křížením rodičovských linií vzorku č. 12 a vzorku č. 13. Z níže uvedených výsledků analýzy SSR markerů vyplývá, že se vzorky 11, 12, 13 v SSR markerech bnlg1129, phi015, phi233376 a umc1478 shodují, tzn., že jednoduchý hybrid získal SSR o stejné velikosti bp od obou rodičů. Velikosti produktů bp SSR markerů phi083, phi109275, umc1061, umc1117, umc1133, umc1448 a umc1545 se liší, v Tabulce 13 jsou barevně označeny alely, které vzorek jednoduchého hybridu získal od jedné či druhé rodičovské linie. U SSR markeru umc1545 vzorku č. 13 byl získán pouze minimální produkt. Optimalizací PCR se nepodařilo získat produktu více.

U vzorku č. 11 se u markerů phi083, phi109275, umc 1117, umc1133 a umc1448 vyskytují další produkty mimo předpokládané rozmezí, a to produkty o rozmezí velikostí (182 – 195) bp pro phi083, 148 bp pro phi109275, (161 – 183) bp pro umc1117, 123 bp pro umc1133 a (223 – 241) bp pro umc1448. Rodičovské linie tyto produkty neobsahují. Není zřejmé, odkud tyto produkty pocházejí. Optimalizací PCR je nebylo možno odstranit.

SSR markery osiva i listů se shodují v rámci správnost DNA sizingu přístroje.

Na některých elektroforeogramech jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se pomocí optimalizace nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

Z níže uvedených výsledků (viz Tabulka 12) nelze jednoznačně říci, že vzorek č. 11 je jednoduchým hybridem vzniklým křížením vzorků č. 12 a 13, a to z toho důvodu, že u SSR markerů phi083, phi109275, umc1117, umc1133 a umc1448 se u vzorku č. 11 vyskytují produkty mimo očekávané rozmezí velikostí, které se ale nevyskytují u vzorků č. 12 a 13. U jednoduchého hybridu se předpokládá, že F1 generace (tj. vzorek č. 11) bude obsahovat pouze produkty získané od rodičovské linie P, tj. vzorků 12 a 13.

**Tabulka 12. Výsledky amplifikací SSR markerů vzorků č. 11 – Cejih (2169 x 2629), 12 - 2169 a 13 - 2629 získané analýzou produktů PCR na fragmentovém analyzátoru. Barevně jsou označeny alely, které vzorek jednoduchého hybridu získal od jedné či druhé rodičovské linie.**

SSR marker	předpokládané rozmezí velikostí	11A	11B	12A	12B	13A	13B
	bp	bp	bp	bp	bp	bp	bp
<b>bnlg1129</b>	170 – 210	193,216	194,217	193,216	193,216	193,216	193,216
<b>phi015</b>	80 – 140	97,106	97,106	98,106	97,106	98,106	98,106
<b>phi083</b>	120 – 140	127,132 138,143 182,185 195	127,132 138,144 182,185 195	131, 143	131, 143	126, 137	125,137
<b>phi102228</b>	120 – 130	118,122	117,121	117	117	121	121
<b>phi109275</b>	120 – 150	126,132 138,148	125,131 136,148	125,131 138	125,131 138	130, 136	130,136
<b>phi233376</b>	130 – 165	137,140	137,140	137,140	137,139	138,140	138,140
<b>umc1061</b>	90 – 120	102,105	103,105	102	102	105	105
<b>umc1117</b>	130 – 170	129,132 137,142 150 161,167 175,180	129,132 138,142 150 162, 167 175,183	136,139 149	136,139 149	128,131 141	128,131 141
<b>umc1133</b>	90 – 140	90,102, 123	90,102, 123	102	102	89	88
<b>umc1448</b>	150 – 185	150,157 161,164 169,223 236,241	152,157 162,164 170, 223 236,241	151,155 164	151,155 164	157,161 170	156,160 169
<b>umc1478</b>	130 – 150	135,145	135,145	135,145	135,145	135,145	135,145
<b>umc1545</b>	60 - 90	77,86	77,86	77,86	77,86	77	77

**9. Cewel (vzorek č. 14), 2232 x 2079 (vzorek č. 15), 2232 (vzorek č. 16), 2079 (vzorek č. 17) a 2550 (vzorek č. 18)**

Získané výsledky amplifikace jednotlivých SSR byly porovnány s hodnotami uvedenými v odborné literatuře (viz sloupec předpokládané bp uvedených v Tabulce 13 a 14). V některých případech se velikosti námi získaných produktů o 1 bp až 13 bp liší. Odchytky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byly použity v dostupné odborné literatuře, nebo české odrůdy nemusejí odpovídat uvedenému rozmezí.

U vzorků č. 14, 15, 16, 17 a 18 se jednalo o kontrolu vzorce složitěho hybridu. V Tabulce 13 jsou uvedeny výsledky vzorků 15, 16, 17, kde vzorek 15 (2232 x 2079) je hybridem vzorků 16 (2232) a 17 (2079). Z níže uvedených výsledků analýzy SSR markerů vyplývá, že se vzorky 15, 16 a 17 v SSR markerech bnlg1129, phi083, phi102228, phi233376, umc1061, umc1133



a umc1478 shodují, tzn., že vzorek č. 15 získal SSR o stejné velikosti bp od obou rodičů. Velikosti produktů bp SSR markerů phi015, phi109275, umc1117, umc1448 a umc1545 se liší, v Tabulce 13 jsou barevně označeny alely, které vzorek č. 15 získal od jedné či druhé rodičovské linie. U vzorku č. 15 se u markerů phi015, umc 1117 a umc1448 vyskytují další produkty, a to produkty o velikostech 112 bp a 125 bp pro phi015, 164 bp pro umc1117 a 184 bp a 198 bp pro umc1448. Rodičovské linie tyto produkty neobsahují. U vzorku č. 17 se u markerů phi109275, umc1448 a umc1545 také vyskytují další produkty, a to 144 bp u phi109275, 177 bp u umc1448 a 74bp u umc1545. Vzorek č. 15 tyto produkty neobsahuje. Optimalizací PCR je nebylo možno odstranit.

V Tabulce 14 jsou uvedeny výsledky vzorků č. 14, 15 a 18, kde vzorek 14 (Cewel – (2232 x 2079) x 2550) je hybridem vzorků 15 (2232 x 2079) a 18 (2550). Z níže uvedených výsledků analýzy SSR markerů vyplývá, že se vzorky 14, 15 a 18 v SSR markerech bnlgl129, phi102228, phi109275 a umc1478 shodují, tzn., že vzorek č. 14 získal SSR o stejné velikosti bp od obou rodičů. Velikosti produktů bp SSR markerů phi015, phi083, umc1061, umc1117, umc1133, umc1448 a umc1545 se liší, v Tabulce 14 jsou barevně označeny alely, které vzorek č. 14 získal od jedné či druhé rodičovské linie. U vzorku č. 14 se u markerů phi015, phi083, umc 1133 a umc1448 vyskytují další produkty, a to produkty o velikostech 138 bp pro phi015, 93 bp pro phi083, 120 bp pro umc1133 a (212 – 239) bp pro umc1448. Rodičovské linie tyto produkty neobsahují. U vzorku č. 18 se u markeru umc1133 vyskytuje vedlejší produkt o velikosti 100 bp. Pravděpodobně se jedná o vedlejší produkty, které nebylo možné pomocí optimalizace PCR odstranit.

SSR markery osiva i listů se shodují v rámci správnost DNA sizingu přístroje.

Na některých elektroforeogramech jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se pomocí optimalizace nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

Z níže uvedených výsledků (viz Tabulky 13 a 14) nelze jednoznačně říct, že vzorky č. 14 a 15 jsou hybridy vzniklé křížením výše uvedených vzorků, a to z toho důvodu, že u SSR markerů obou vzorků výsledných hybridů vyskytují produkty některé i o velikosti mimo očekávané rozmezí velikostí, které se ale nevyskytují rodičovských linií. U hybridů se předpokládá, že potomci budou obsahovat pouze produkty získané od rodičovských linií.

**Tabulka 13. Výsledky amplifikací SSR markerů vzorků 15 -2232 x 2079, 16 – 2232 a 17 - 2079 získané analýzou produktů PCR na fragmentovém analyzátoru. Barevně jsou označeny alely, které vzorek hybrida získal od jedné či druhé rodičovské linie.**

SSR marker	předpokládané rozmezí velikostí	15A	15B	16A	16B	17A	17B
	bp	bp	bp	bp	bp	bp	bp
<b>bnlg1129</b>	170 – 210	192,217	194,217	191,214	191,213	193,216	193,217
<b>phi015</b>	80 – 140	87,94,98, 106 112,125	87,94,99, 106 112,126	98,105	97,105	86,94	86,94
<b>phi083</b>	120 – 140	126,137	126, 137	126,137	126,138	127,138	127,138
<b>phi102228</b>	120 – 130	125	125	125	125	125	125
<b>phi109275</b>	120 – 150	131,138	132,138	132,138	130,136	132,138, 144	132,138, 144
<b>phi233376</b>	130 – 165	139,141	139,141	139,141	139,141	139,142	139,141
<b>umc1061</b>	90 – 120	102	101	101	101	101	101
<b>umc1117</b>	130 – 170	129,131, 135,142, 146, 164	129,131, 135,141, 146, 164	132,135, 145	132,136, 145	128,130, 141	128,130, 141
<b>umc1133</b>	90 – 140	89	90	89	90	90	89
<b>umc1448</b>	150 – 185	161,165, 172, 184,198	161,164, 171, 183,197	161,165, 174	160,164, 173	165,177	165,177
<b>umc1478</b>	130 – 150	134,144	134,144	134,144	134,144	134,144	134,144
<b>umc1545</b>	60 - 90	67,77,86	67, 77,86	77,86	77,86	67,74	67,74

**Tabulka 14. Výsledky amplifikací SSR markerů vzorků č. 14 – Cewel ((2232x2079) x 2550), 15 – (2232 x 2079) a 18 - 2550 získané analýzou produktů PCR na fragmentovém analyzátoru. Barevně jsou označeny alely, které vzorek hybridu získal od jedné či druhé rodičovské linie.**

SSR marker	předpokládané rozmezí velikostí	14A	14B	15A	15B	18A	18B
	bp	bp	bp	bp	bp	bp	bp
<b>bnlg1129</b>	170 – 210	192,217	194,217	192,217	194,217	192,215	192,215
<b>phi015</b>	80 – 140	87,91,99, 105,109, 123,138	87,91,99, 104,108, 122,138	87,94,98, 106,112, 125	87,94,99, 106,112, 126	104,111	104,111
<b>phi083</b>	120 – 140	93,127, 131, 137,142	93,127, 130 138,142	126,137	126,137	131,142	130,142
<b>phi102228</b>	120 – 130	125	125	125	125	125	125
<b>phi109275</b>	120 – 150	132,138	132,138	131,138	132,138	130,136	130,136
<b>phi233376</b>	130 – 165	139,141	139,141	139,141	139,141	140,141	139,141
<b>umc1061</b>	90 – 120	102,105	102,105	102	101	104	103
<b>umc1117</b>	130 – 170	129,133, 136,141, 146,162	129,133, 136,141, 146,162	129,131, 135,142, 146,164	129,131, 135,141, 146,164	132,134, 145	132,135, 146
<b>umc1133</b>	90 – 140	89,98,120	90,97,120	89	90	96,100	96,100
<b>umc1448</b>	150 – 185	153,158, 165,173, 184,198 216,222, 228,239	153,156, 165,175, 183,197 212,224, 227,239	161,165, 172, 184,198	161,164, 171, 183,197	150,155, 164	150,155, 165
<b>umc1478</b>	130 – 150	134,144	134,144	134,144	134,144	134,145	134,144
<b>umc1545</b>	60 - 90	67,74,77, 85	67,73,77, 85	67,77,86	67,77,86	73,82	73,83

#### 10. SL14078 (vzorek č. 19) a SL14256 (vzorek č. 20)

Získané výsledky amplifikace jednotlivých SSR byly porovnány s hodnotami uvedenými v odborné literatuře (viz sloupec předpokládané rozmezí velikostí). U většiny markerů byly amplifikací získány produkty odpovídající rozmezí velikostí bp uvedených v Tabulce 15. V některých případech se velikosti námi získaných produktů o 1 bp až 8 bp liší. U SSR markeru **bnlg1129** se u obou vzorků vyskytují další produkty mimo předpokládané rozmezí, a to produkty o rozmezí velikostí (232 – 274) bp. Odchytky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byly použity v dostupné odborné literatuře, nebo české odrůdy nemusí odpovídat uvedenému rozmezí. Může se také jednat o nespecifické produkty, které nebylo možné pomocí optimalizace PCR reakce odstranit.

U SSR markeru phi083 se u vzorku 19 vyskytují tři produkty a u vzorku 20 čtyři produkty. Je zde navíc produkt o velikosti 136 bp u vzorku 20 A a 137 bp u vzorku 20B. U markeru umc1133 je mezi vzorky 19 a 20 nepatrný rozdíl velikostí bp u druhého produktu, zde mohlo dojít k mírnému posunu píků během elektroforézy.

SSR markery osiva i listů se shodují v rámci správnost DNA sizingu přístroje.

Na některých elektroforeogramech jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se pomocí optimalizace nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

U vzorků č. 19 a 20 se jednalo o jednoduchého hybrida na pozici matky a na pozici otce. Nebyly uvedeny informace o tom, zda by se měly vzorky lišit nebo shodovat. Z porovnání výsledků uvedených v tabulce 15 je patrné, že se tyto odrůdy téměř ve všech SSR markrech shodují, liší se pouze v markeru phi083 a nepatrně v markeru umc1133. Jedná se o odrůdy blízce si podobné.

**Tabulka 15. Výsledky amplifikací SSR markerů vzorků č. 19 - SL1407 a 20 - SL14256 získané analýzou produktů PCR na fragmentovém analyzátoru.**

SSR marker	předpokládané rozmezí velikostí	19A	19B	20A	20B
	bp	bp	bp	bp	bp
<b>bnlg1129</b>	170 – 210	185,193,215,236,258,273	185,193,215,235,258,273	185,195,217,232,260,273	186,196,218,233,261,274
<b>phi015</b>	80 – 140	97,106	97,106	97,106	97,106
<b>phi083</b>	120 – 140	130,133,142	130,133,142	130,132,136,141	130,132,137,142
<b>phi102228</b>	120 – 130	118	118	117	117
<b>phi109275</b>	120 – 150	126,131,138,144,150	127,132,140,145,152	126,131,138,144,150	126,131,138,144,149
<b>phi233376</b>	130 – 165	137,140	137,140	139,141	139,141
<b>umc1061</b>	90 – 120	104	101	103	104
<b>umc1117</b>	130 – 170	127,130,140	128,131,141	127,130,139	127,130,141
<b>umc1133</b>	90 – 140	89,96,120	89,97,121	89,100,123	90,101,123
<b>umc1448</b>	150 – 185	152,155,164	151,155,164	151,155,164	152,156,165
<b>umc1478</b>	130 – 150	134,144	134,143	134,144	133,143
<b>umc1545</b>	60 - 90	67,75	67,75	67,74	67,74

## 8 Závěr

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci odrůd kukuřice pomocí analýzy SSR markerů. Vzhledem k tomu, že není dostupná databáze SSR markerů kukuřice, získané výsledky nebylo

možné porovnat. Z literatury byla získána pouze rozmezí hodnot velikostí bp jednotlivých markerů. Získané hodnoty jednotlivých SSR markerů ve většině případů odpovídaly výše uvedeným rozmezím hodnot. V některých případech byly získány produkty (jednotlivé SSR markery), které byly mírně mimo rozmezí očekávaných hodnot, a to asi do 5 %. Všechny tyto píky byly mnohonásobně menší velikosti (hodnoty RFU) proti referenčním píkům. Došlo i k získání produktů zcela mimo rozmezí očekávaných hodnot, ale pouze v jednotkách případů. V současné podobě je výše popsaná metoda vhodná pouze pro vzájemné porovnávání testovaného (neznámého) vzorku se vzorkem referenčním (známým) za účelem potvrzení nebo vyvrácení, zda se jedná o stejnou nebo podobnou odrůdu a pro tvorbu a postupné rozšiřování databáze, než bude získáno dostatečné množství dat, se kterými se budou porovnávat výsledky testovaných vzorků bez potřeby současného testování s referenčním materiálem.

## 9 Literatura

1. Molekulární metody – hodnocení genotypů – Marker Assisted Breeding, Metodické listy OPVK, Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.
2. Manuál kitu DNeasy®Plant Handbook, Qiagen, 2012
3. Manuál kitu Type-it®Microsatellite PCR Handbook, Qiagen 2011
4. Manuál kitu DNF-900 dsDNA Reagent Kit User Guide for use with the Fragment Analyser™ Automated CE System, Advanced Analytical, 2014
5. Methods in Molecular Biology – PCR Protocols, John M. S. Bartlett, David Stirling,
6. Taberlet at al., 2006
7. PCR reactions set up and amplification conditions, Online Publication, 2010
8. [www.labguide.cz](http://www.labguide.cz)
9. Separation of DNA by Capillary Electrophoresis, Herb Schwartz, Andreas Guttman
10. Maize genetics and genomics database [www.maizegdb.org](http://www.maizegdb.org)
11. Development and mapping of SSR markers for maize, Natalya Sharapova at al. Plant Molecular Biology 48: 463–481, 2002
12. The Maize Genetics and Genomics Database. The Community Resource for Access to Diverse Maize Data Carolyn J. Lawrence, Trent E. Seigfried, and Volker Brendel, Plant Physiol. Vol. 138, 2005
13. Application of SSR and SNP in maize variety identification and database construction, UPOV, Working group on BMT, 2010
14. Standards for helping to determinant EDV Status in maize (*Zea mays* L.) using SSR'S and future prosepcts using SNP'S, UPOV, Working group on BMT, 2010
15. Overview of DNA technologies – current uses and applications, ISTA, Dr. Kae – Kang Hwu, 2013
16. International rules for seed testing, Chapter 8: Species and variety testing, ISTA, 2017

---

**Bulletin Národní referenční laboratoře XXII 2018/2**

Ročník: XXII, č. 2

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2018

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 51

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196