

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2017

Ročník XXI, číslo 2/2017

Brno 2017

Obsah

- 1 Zavedení metody založené na analýze mikrosatelitů (SSR markerů) pro identifikaci odrůd u révy vinné**
Kateřina Staňková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB NRL,
Hroznová 2, 656 06 Brno 1
- 2 Převedení metod pro sledování mykotoxinů a dalších nežádoucích látek v krmivech z LC-MS (iontová past) na jiný LC-MS systém**
Martina Čumová, Zuzana Nehybová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 34
- 3 Analýza obsahu feromonových odparníků**
Pavla Tieffová, Veronika Nagyová, Přemysl Fiala
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno a Sekce zemědělských vstupů, Oddělení půdy a lesnictví,
Hroznová 2, 656 06 Brno 37

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Zavedení metody založené na analýze mikrosatelitů (SSR markerů) pro identifikaci odrůd u révy vinné

Kateřina Staňková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB, Hroznová 2, 656 06 Brno
katerina.stankova@ukzuz.cz

1 Úvod

Réva vinná je jednou z nejstarších kulturních rostlin pěstovaných člověkem. Odrůdy révy vinné se tradičně identifikují na základě porovnání charakteristických morfologických znaků, jako jsou plně vyvinuté listy dospělé rostliny, květy, plody, ale i nástup jednotlivých fenofází. Projev morfologických charakteristik je závislý na přírodních podmínkách, individuální rostlinné biologii, fázi vývinu a zdravotním stavu rostliny. U rostlin mladších pěti let se neprojevují typické znaky pro dospělé 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 se prozatím ukázala jako nejvhodnější metoda SSR (Simple Sequence Repeat, mikrosatelity). Mikrosatelitní markery jsou vysoce polymorfní, kodominantní a opakovatelné. Pro révu byl vyvinut doposud nejpropracovanější systém identifikace. V rámci mezinárodního projektu EU GENRES 081 bylo určeno a doporučeno šest mikrosatelitních lokusů jako identifikační minimum.

2 Cíl

Cílem práce bylo zavést metodu pro identifikaci odrůd révy vinné pomocí šesti SSR markerů (mikrosatelitů), a to konkrétně VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 a VrZAG79. Tyto markery doporučuje ECP/RG (European Cooperative Program for Crop Genetic Resources Network) jako druh vhodných deskriptorů pro identifikaci odrůd révy vinné. Pro výše uvedené

markery je na www.eu-vitis.de dostupná databáze, která umožňuje porovnání výsledků analýz SSR markerů testovaných vzorků révy vinné s hodnotami referenčních odrůd.

3 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. $(A)_n$, $(AG)_n$, $(GATA)_n$. Tyto opakující se motivy se nazývají repetice. Jejich celková délka obvykle nepřesahuje 100 bp. Podle složení lze mikrosatelity rozdělit na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalý mikrosatelit je tvořen souvislou jednotkou repetice, např. $(AG)_{20}$, u nedokonalého mikrosatelitu je jednotka repetice přerušena sledem náhodných bází. Složený mikrosatelit je tvořen několika různými jednotkami repetice, např. $(AG)_{14}(AT)_{35}$.

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 cykleru. Před vlastní PCR je důležité provést úplnou počáteční denaturaci DNA. Tím se zajistí, že při prvním kroku cyklu nedojde pouze k částečnému oddělení komplementárních řetězců, ale všechny molekuly původní DNA budou jednořetězcové a přístupné primerům. Následuje denaturační krok prvního cyklu. Během druhého kroku, tzv. annealingu, přisedají 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 amplikon. Má definovanou délku pohybující se od desítek až po stovky párů bází (bp), která se stanoví kapilární elektroforézou na fragmentovém analyzátoru. Protože má réva vinná diploidní sadu chromozomů, je v případě homozygotního znaku (mikrosatelitu) detekován amplikon jeden, v případě heterozygotního znaku (mikrosatelitu) jsou detekovány amplikony dva.

4 Materiál a metody

Práce vychází z dosud zavedených metod, které pracoviště používá. Jedná se o Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ č. 10250.1 Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR a postup č. 40300.1 Stanovení přítomnosti fytoplazem metodou PCR, dále ze Závěrečné zprávy NAZV QC 1156, z příruček ke kitu DNeasy®Plant Mini Kit (Qiagen, Německo), Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen, Německo). Zdrojem sekvencí amplifikačních primerů pro amplifikaci SSR markerů je The European Vitis Database.

4.1 Přístroje a pomůcky

Sterilní třecí misky s tloučky.

Homogenizátor Roller, Meku Pollaehne, Německo.

Ponorný mixér.

Pasteurovy pipety.

Petriho misky.

Váhy s přesností 0,01 g.

Navažovací lžička nebo kopistka.

Vortex.

Chlazená centrifuga.

Vodní lázeň nebo termoblok (65 °C).

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

Minicentrifuga.

PCR box.

Termální cykler, C1000 Touch™ Thermal Cyclor, BIO-RAD, USA.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Elektroforetická vana a zdroj napětí.

Transiluminátor.

Fotodokumentační zařízení a příslušný software.

Fragmentový analyzátor a software PROSize 2,0, Fragment Analyzer, Advanced Analytical, USA.

pH metr.

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

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

96jamkové a hlubokojamkové destičky.

Samolepící fólie.

Centrifuga pro 96jamkové destičky.

Výrobník ledu.

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

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. Zvolený způsob záleží na povaze materiálu.

4.2 Chemikálie

4.2.1 Homogenizace rostlinného materiálu (pufr Dellaporta)

Hydrogenfosforečnan draselný trihydrát p. a.

Dihydrogenfosforečnan draselný p. a.

Sacharóza p. a.

Bovine serum albumin frakce V.

Polyvinylpyrrolidon.

Kyselina askorbová p. a.

Příprava pufru Dellaporta

43,4 g hydrogenfosforečnanu draselného, 8,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 200 g sacharózy, 3 g séra a 40 g polyvinylpyrrolidonu se rozpustí ve sterilní vodě a doplní se do objemu 2 l. Takto připravený roztok se uchovává při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před použitím k homogenizaci rostlinného materiálu se rozmrazí a přidá se kyselina askorbová v množství 1,06 g/200 ml pufru. Pomocí NaOH se upraví pH na 7,6. Pufr se používá vytemperovaný na teplotu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do druhého dne se spotřebuje.

4.2.2 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).

4.2.3 Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen)

Type-it Multiplex PCR Master Mix, 2×.

RNase-Free voda.

4.2.4 Amplifikační primery

Plastid A1: CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG.

Plastid A2: GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC.

VVS2 F: CAG CCC GTA AAT GTA TCC ATC.

VVS2R: AAA TTC AAA ATT CTA ATT CAA CTG G.

VVMD5F: CGA GAG CTA CGC CAA TCC AA.

VVMD5R: TAT ACC AAA AAT CAT ATT CCT AAA.

VVMD7F: AGA GTT GCG GAG AAC AGG AT.

VVMD7R: CGA ACC TTC ACA CGC TTG AT.

VVMD27F: GTA CCA GAT CTG AAT ACA TCC GTA AGT.

VVMD27R: ACG GGT ATA GAG CAA ACG GTG T.

VrZAG62F: GGT GAA ATG GGC ACC GAA CAC ACG C.

VrZAG62R: CCA TGT CTC TCC TCA GCT TCT CAG C.

VrZAG79F: AGA TTG TGG AGG AGG GAA CAA ACC G.

VrZAG79R: TGC CCC CAT TTT CAA ACT CCC TTC C.

Příprava amplifikačních primerů

Primery se rozpustí, ředí a rozdělí do potřebných množství takto.

Zásobní roztok o koncentraci 100 μ 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 μ l do zkumavek o objemu 0,5 ml. Zkumavky s primery se zamrazí a uchovávají při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pracovní roztok o koncentraci 10 μ M

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

4.2.5 DNF-900 ds DNAreagent Kit, (35 – 500) bp (Advanced Analytical)

FA dsDNA Gel, 35 bp – 500 bp, skladuje se v chladu, při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Interkalační barvivo, skladuje se při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5 $\times$ koncentrovaný dsDNA Inlet Buffer, skladuje se v chladu, při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5 $\times$ koncentrovaný Capillary Conditioning Solution.

35/500 bp marker, skladuje se při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

(75 – 400) bp DNA Ladder, skladuje se při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Minerální olej.

1 $\times$ ředící TE pufr.

Příprava FA dsDNA gelu

Gel se skladuje při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, interkalační barvivo při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před použitím se obě reagenty vytemperují na laboratorní teplotu. V 50ml zkumavce s konickým dnem se smíchají příslušné objemy gelu a interkalačního barviva v množství podle počtu analyzovaných vzorků, viz Tabulka 1. Interkalační barvivo se v gelu rozmíchá tak, že se zkumavka mírně poklepe o dlaň. Při míchání se dbá na to, aby nedocházelo ke vzniku bublin. Zkumavka s gelem se umístí fragmentového analyzátoru.

Tabulka 1. 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 × ds DNA Inlet buffer

5 × ds DNA 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 fragmentového analyzátoru. 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 fragmentového analyzátoru. Naředěný roztok se skladuje při laboratorní teplotě.

Příprava 35bp/500 bp markeru

35/500 bp marker se skladuje při -20 °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 μl markeru. Destička se centrifuguje na centrifuze (3000 rpm, 2 min). Každá jamka se překryje 20 μl minerálního oleje. Deska se umístí do fragmentového analyzátoru. Takto připravená deska se může použít pro 30 aplikací.

Příprava DNA Ladder 75-400 bp

DNA Ladder 75-400 bp se skladuje při -20 °C. Před použitím se vytemperuje na laboratorní teplotu. Po rozpuštění se roztok protřepe nebo promíchá na vortexu a krátce centrifuguje na minicentrifuze.

4.2.6 Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE

Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Na₂EDTA.

Trizma base.

Ledová kyselina octová.

Příprava TAE pufru

Příprava zásobního roztoku 50 × TAE

1. Příprava 0,5 M zásobního roztoku EDTA

186,1 g Na₂EDTA se vmíchá do (750 – 800) ml (re)destilované vody. Na₂EDTA se úplně nerozpustí, dokud nebude pH vyšší než 7,0. pH se upraví na 8,5 přidáním NaOH. Potom se doplní (re)destilovanou vodou do objemu 1000 ml. Přefiltruje se přes hustý filtrační papír. Roztok se skladuje při laboratorní teplotě.

2. Příprava 2 M Tris

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

3. Příprava pracovního roztoku 1 × TAE pro elektroforézu

Odměří se 20 ml zásobního roztoku 50 × 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 (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 po dobu (15 – 20) minut do doby, až se vyčeří roztok a vymizí vzduchové bubliny. Mezitím se připraví nalévací vanička a vhodný hřebínek.

Po mírném zchladnutí se přidá 7,5 µl pracovního roztoku ethidiumbromidu (interkalační barvivo sloužící ke zviditelnění DNA v gelu) a míchá se 1 min. Poté se vyjme míchadlo 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.

4.2.7 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.

Tekutý dusík.

(0,5 – 1)% roztok chlornanu sodného.

70% etanol.

Dekontaminační roztok.

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

4.3 Testovaný materiál

Podle klasifikátoru OIV, European Vitis Database (Obr. 1) a Klíče pro identifikaci odrůd pomocí SSR (Baránek et al.) (Obr. 2) byly vybrány odrůdy vhodné pro otestování. Byly zvoleny

odrůdy s jedinečnou kombinací alel a odrůdy s podobnými velikostmi alel u daného lokusu. Celkem bylo z pokusné stanice v Oblekovicích dodáno deset vzorků révy vinné. Devět vzorků odrůd bylo označených, desátý vzorek byl kontrolní – anonymní. Desátý kontrolní anonymní vzorek byl jeden z devíti uvedených, pro ověření metody. U každé odrůdy byl otestován vzorek v různých fenofázích, a to mladý list, dospělý list, hrozen a réví. Jednalo se o směsné vzorky složené z pěti různých rostlin jedné odrůdy, které splňovaly podmínky uniformity odrůdy a během vegetace nebyly odlišné. Vzorky jednotlivých fenofází byly vždy odebrány ze stejných keřů révy. U odrůdy Chardonnay (vzorek č. 1) byly porovnány SSR markery u pěti samostatných rostlin a směsného vzorku mladého a dospělého listu pro porovnání výsledků mezi rostlinami v rámci jedné odrůdy.

		VVS2		VVM5		VVM7		VVM27		VrZAG62		VrZAG79	
		N = (121 - 124) bp		N = (218 - 224) bp		N = (229 - 235) bp		N = (171 - 175) bp		N = (172 - 178) bp		N = (234 - 238) bp	
		alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2
1	Chardonnay (Chardonnay B)	N+14	N+20	N+12	N+16	N+8	N+12	N+6	N+14	N+14	N+22	N+6	N+8
		CH1	CH2	CH1	CH2	CF1	GE1	CF1	CS2	CH1	CH2	CH1	CH2
2	Sylvánské zelené (Silvaner B)	N+28	N+30	N+4	N+10	N+12	N+14	N+14	N+19	N+14	N+30	N+12	N+14
		SI1	SI2	CF1	GE1	GE1	ME2	CS2	MU2	CH1	CF2	SI1	GE2
3	Tramín červený (Gewürztraminer RG)	N+28	N+28	N+10	N+16	N+12	N+26	N+14	N+14	N+14	N+20	N+8	N+14
		SI1	SI1	GE1	CH2	GE1	GE2	CS2	CS2	CH1	CF1	CH2	GE2
4	Modrý Portugal (Portugieser N)	N+20	N+28	N+6	N+12	N+12	N+24	N+6	N+19	N+14	N+30	N+12	N+22
		CH2	SI1	CF1	GE1	GE1	PO2	CF1	MU2	CH1	CF2	SI1	CF2
5	Merlot (Merlot N)	N+16	N+28	N+4	N+14	N+8	N+16	N+14	N+16	N+20	N+20	N+22	N+22
		CF1	SI1	CF1	MU2	CF1	ME2	CS2	ME2	CF1	CF1	CF2	CF2
7	Rulandské bílé (Pinot B)	N+14	N+28	N+6	N+16	N+8	N+12	N+10	N+14	N+14	N+20	N+2	N+8
		CH1	SI1	MU1	CH2	CF1	GE1	PI1	CS2	CH1	CF1	PN1	CH2
8	Chardonnay (klon Sd Latous, Německo)	N+14	N+20	N+12	N+16	N+8	N+12	N+6	N+14	N+14	N+22	N+6	N+8
		CH1	CH2	CH1	CH2	CF1	GE1	CF1	CS2	CH1	CH2	CH1	CH2

Obr. 1. Seznam referenčních odrůd révy vinné s uvedenými velikostmi alel jednotlivých SSR markerů a se systémem kódování podle European Vitis Database.

		VVS2		VVM5		VVM7		VVM27		VrZAG62		VrZAG79	
		N = (121 - 124) bp		N = (218 - 224) bp		N = (229 - 235) bp		N = (171 - 175) bp		N = (172 - 178) bp		N = (234 - 238) bp	
		alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2
6	Malverina	N+10	N+28	N+14	N+18	N+20	N+20	N+6	N+16	N+20	N+20	N+18	N+22
		BA1	CF2	MU2	CF2	FE1	FE1	CF1	ME2	CF1	CF1	MU2	CF2
9	Cabernet Moravia	N+20	N+24	N+4	N+4	N+8	N+32	N+4	N+14	N+20	N+30	N+0	N+8
		CH2	CF2	CF1	CF1	CF1	CF2	MU1	CS2	CF1	CF2	RO1	CH2

Obr. 2. Seznam odrůd révy vinné s uvedenými velikostmi alel jednotlivých SSR markerů a systémem kódování dle Klíče pro identifikaci odrůd pomocí SSR (Baránek et al.)

5 Pracovní postup

5.1 Homogenizace rostlinného materiálu

Homogenizace listů pomocí tekutého dusíku

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

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 tloučku se rozmělní na jemný prášek. Získaný prášek se vychlazenou kopistkou nebo lžičkou přenese do zkumavky s 500 μl pufru AP1. Objem extrakčního pufru se pohybuje kolem 500 μl na 100 mg tkáně.

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 listů a réví pomocí pufru Dellaporta

Jako vzorek se používají cévní svazky čerstvých listů (středové žilky) a lýko z réví. Do Petriho misky se nastříhají středové žilky listů, nebo se naškrábe lýko (asi 2 g). Přelije se 5 ml vychlazeného pufru Dellaporta. Materiál se potom vloží do homogenizátoru Roller. Během homogenizace se přelije dalšími asi 15 ml uvedeného pufru a ten se sbírá do 50ml zkumavky. Inkubuje se 10 min na ledu nebo v lednici. Pak se vzorek centrifuguje 4 min v předem vychlazené centrifuze při 1000 g. Supernatant se slije do nové 50ml zkumavky. Centrifugací se odstraní hrubý balast. Dále se centrifuguje 25 min při 10000 g. Supernatant se vylije a získaný pelet se použije pro extrakci DNA. Do 50ml zkumavky s peletem z rostlinného materiálu se napipetuje 1000 μl pufru AP1 a řádně se promíchá. Poté se přenese Pasteurovou pipetou $2 \times 500\text{ }\mu\text{l}$ této suspenze do dvou čistých 2ml zkumavek. Takto se získají z jednoho homogenizovaného vzorku dva vzorky paralelní.

Homogenizace hroznů pomocí ponorného mixéru

Ponorným mixérem se rozmixuje celý hrozen, tj. třapina i bobule. Z rozmixovaných hroznů se extrahuje dvěma způsoby. Přibližně 500 μl rozmixované směsi se napipetuje do sterilních

2ml zkumavek s 500 μ l pufru AP1 a dále se postupuje podle níže uvedeného extrakčního protokolu. Druhý způsob je, že se napipetuje 1500 μ l směsi a centrifuguje se 5 min při 13 000 ot/min. Tekutá fáze se vylije a na usazeninu se napipetuje 500 μ l pufru AP1.

Zbýlý rozmixovaný vzorek se zmrazí v plastových obalech při teplotě -80°C .

5.2 Extrakce DNA

Vlastní extrakce DNA probíhá v několika krocích. Nejdřív se připraví pracovní plocha. Pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů roztokem chlornanu sodného a dekontaminačním roztokem a působením UV záření po dobu 30 min. Vodní lázeň se přehřeje na teplotu 65°C .

Prvním krokem extrakce DNA je buněčná lyze. Do každé zkumavky se vzorkem a pufrům AP1 se přidají 4 μ l 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 $2 \times$ až $3 \times$ promíchají. Získá se buněčný lyzát. Dalším krokem je vysrážení zbytků. K buněčnému lyzátu se přidá 130 μ l 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 přenesení do nové 2ml zkumavky a přidá se 750 μ l pufru AW1. Promíchá se opakovaným pipetováním. Napipetuje se 650 μ l 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 se odstraní dvěma po sobě jdoucími promývacími kroky. DNeasy Mini spin kolonky se přemístí do nových sběrných zkumavek a přidá se 500 μ l pufru AW2. Centrifuguje se 1 min při 8000 ot/min. Proteklá tekutina se vylije. Znovu se přidá 500 μ l pufru AW2 a centrifuguje se 2 min při 14000 ot/min. Posledním krokem extrakce DNA je její eluce. Dochází při ní k uvolnění navázané DNA z membrány kolonky. Kolonky DNeasy Mini spin se přemístí do nových zkumavek a přesně na membránu se napipetuje 100 μ 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.

5.3 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; 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 μ l vzorku. Každý vzorek se měří 2 $\times$. Vypočítá se průměr z naměřených hodnot. Pro následnou PCR zpravidla vyhovují koncentrace v rozmezí (10 – 20) ng/ μ 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.

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

- x požadované množství naředěné DNA (μ l),
- y požadovaná koncentrace DNA (ng/ μ l),
- z změřená koncentrace DNA (ng/ μ l),
- d množství námi vyextrahovaného vzorku potřebného pro přípravu x μ l roztoku o koncentraci DNA z (μ 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 μ l barviva a 5 μ l vyextrahované DNA a spolu s Load Precision Molecular Mass standardem se nanesou do jamek gelu a spustí se elektroforéza (70 V, 75 minut).

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

5.4 Polymerázová řetězová reakce

PCR box se 30 min vysvítí UV zářením. Předměty umístěné v PCR 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 2) 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.

Type-it Microsatellite PCR

Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce 2. Reakční směs se opatrně, ale důkladně promíchá (obracení zkumavky, vortex) a rozdělí se po 20 μ l do označených zkumavek. Poté se do zkumavek přidá 5 μ 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 (EV). Zkumavky se pečlivě zavičkují, aby se zabránilo vypařování směsi během reakce. Zkumavka s kontrolou prostředí se ponechá otevřená po celou dobu pipetování. Zkumavky se promíchají mírným poklepem, centrifugují se na minicentrifuze, vloží se do termálního cykleru a zahájí se příslušná PCR amplifikace.

Tabulka 2. Složení reakční směsi.

Složka	1 reakce (μ l)
PCR voda	4,5 až 5,5
Type-it Multiplex PCR Master Mix, 2 $\times$	12,5
Primer F	1 až 1,5
Primer R	1 až 1,5
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 μ l.

trnL(UAA) neboli plastid:

primery: Plastid A1 (F), Plastid A2 (R)

amplifikační program:

	Teplota ($^{\circ}$ C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	55	30	
Extenze	72	120	
Závěrečná extenze	72	300	1

délka amplikonu: pro révu vinnou 542 až 543 bp

VVS2:

primery: VVS2 F, VVS2 R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	59	75	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	900	1

délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, 123 až 162 bp

VVMD5

primery: VVMD5 F, VVMD5 R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	58	85	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	900	1

délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, 222 až 268 bp

VVMD7

primery: VVMD7 F, VVMD7 R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	30
Annealing	55,2	70	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	1200	1

délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, 231 až 265 bp

VVMD27

amplifikační primery: VVMD27 F, VVMD27 R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	30
Annealing	60	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	900	1

délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, 171 až 219 bp

VrZAG62

amplifikační primery: VrZAG62 F, VrZAG62 R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	30
Annealing	51	70	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	900	1

délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, 174 až 220 bp

VrZAG79

amplifikační primery: VrZAG79 F, VrZAG79 R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	1
Denaturace	95	30	30
Annealing	55,2	60	
Extenze	72	30	
Závěrečná extenze	68	600	1

délka ampliconů: v závislosti na odrůdě, 235 až 262 bp

5.5 Elektroforéza amplifikačních fragmentů v 2% agarózovém gelu

Objem vzorku nanášeného do jamky závisí na typu hřebínku. Promyslí se rozvřzení 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. Proveďte se fotodokumentace. Snímky se popíše a vyhodnotí.

Kapilární elektroforéza

Do každé z jamek 1 – 11 destičky, které budou obsahovat vzorek, se pipetuje 1 × ředící TE pufr a vzorek. Ideální objem je 22 µl 1× ředícího pufru a 2 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 samolepící fólií a centrifuguje 2 min při 3000 rpm. Pokud se nespustí elektroforéza ihned po napipetování vzorků, překryje se každá jamka 20 µl 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 dodaného k přístroji.

6 Výsledky a diskuze

Při práci se vycházelo z literárních rešerší, informací získaných z European Vitis Database, Klíče pro hodnocení odrůd, Závěrečné zprávy NAZV QC 1156 a z dosavadních znalostí a zkušeností. U vzorků v různých fenofázích, tj. u mladého listu, dospělého listu, hroznů a réví, byl otestován způsob homogenizace, extrakce DNA a optimalizace podmínek pro amplifikaci šesti SSR markerů. U odrůdy Chardonnay (vzorek č. 1) byly porovnány SSR markery u pěti samostatných rostlin a směšného vzorku mladého a dospělého listu pro porovnání výsledků mezi rostlinami v rámci jedné odrůdy.

Homogenizace vzorků

U mladých i dospělých listů byla vyzkoušena homogenizace lisováním čerstvých listů na homogenizátoru Roller s pufrem Dellaporta a minimálně dva dny předem na –80 °C zmražených listů pomocí tekutého dusíku a třecí misky s tloučkem. Ze vzorků zhomogenizovaných pomocí tekutého dusíku se získala minimálně dvojnásobná koncentrace

DNA na rozdíl od vzorků lisovaných. Čistota získané DNA byla srovnatelná. Výhoda homogenizace v tekutém dusíku vedle získání vyšší koncentrace DNA je, že se listy mohou zamrazit na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na delší dobu a mohou se postupně zpracovávat, kdežto čerstvý rostlinný materiál se musí zpracovat v co nejkratší době.

Celé hrozny (tj. třapina i bobule) byly ihned po doručení rozmixovány ponorným mixérem. Bezprostředně po rozmixování se mošt zmrazil v 50ml mrazicích zkumavkách při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby, než byla provedena extrakce DNA.

Pro réví byla použita metoda homogenizace pomocí homogenizátoru Roller s pufrem Dellaporta.

Všechny uvedené metody homogenizace jednotlivých vzorků révy byly vhodné pro následnou extrakci DNA.

Extrakce DNA

Extrakce genomické DNA z révy vinné je obtížná kvůli obsahu sekundárních metabolitů – polyfenolů, polysacharidů, taninů a dalších, které interferují s extrakčními postupy a následujícími amplifikacemi. Polyfenoly irreverzibilně vyvazují nukleové kyseliny a proteiny do formy vysokomolekulárních komplexů, polysacharidy inhibují aktivitu enzymů, např. Taq polymerázy a zvyšují viskozitu získané DNA, která se stává neamplifikovatelná. Nejvíce polyfenolů a polysacharidů je obsaženo v listech a hroznech.

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 colum) 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 vyplynulo, že tato extrakční metoda pravděpodobně není zcela vhodná pro extrakci DNA u révy vinné. Hodnoty poměrů ukazují na přítomnost polysacharidů a polyfenolů.

Poznámky

1. *Laboratoř měla k dispozici kit GenElute™Plant Genomic DNA Miniprep Kit od firmy Sigma – Aldrich, který se používá pro extrakci DNA z rostlinného materiálu. Princip extrakce DNA tímto kitem je stejný, jako u kitu DNeasy Plant Mini. Získaná DNA se koncentrací a kvalitou nelišila.*

Koncentrace a čistota DNA

Po extrakci DNA byla určena koncentrace a čistota DNA na nízkoobjemovém spektrofotometru. Každý vzorek byl změřen dvakrát a naměřené hodnoty byly zprůměrovány. Koncentrace DNA byla nejvyšší z mladého listu, nejnižší z hroznů a réví. Co se týče čistoty, nejlépe vycházely vzorky réví. Nízké hodnoty čistoty DNA u listů a hroznů ukazovaly na přítomnost polysacharidů a fenolů.

Pro následnou amplifikaci by se měla použít stejná koncentrace DNA u každého vzorku, a to v rozmezí (10 – 20) ng/μl. Vzorky s koncentrací DNA nad požadovanou hodnotou se na uvedenou hodnotu naředily vodou vhodnou pro PCR. Naředěním vzorků došlo i ke snížení inhibičního účinku kontaminujících látek. Vzorky s koncentrací pod 10 ng/μl se neředily.

Získaná DNA byla amplifikovatelná. To umožnilo pokračování v práci.

Kvalita DNA

Kvalita DNA byla určena elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Ze vzorků listů se získala vysokomolekulární DNA, ze vzorků réví byla DNA degradovaná.

Polymerázová řetězová reakce

Otestování amplifikovatelnosti DNA

Pro otestování amplifikovatelnosti vyextrahované DNA byl zvolen tzv. plastid (interleukin trnL). Jedná se o univerzální nekódující sekvenci, která se vyskytuje v chloroplastové DNA všech rostlin. U révy vinné má velikost 543 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 pro jednotlivé markery optimalizovat podmínky PCR. Cílem optimalizace bylo nastavit parametry reakce tak, aby měla specifický průběh, tj. aby vznikaly detekovatelné produkty specifické velikosti (podle European Vitis Database) a minimalizoval se výskyt nespecifických produktů a artefaktů. 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.

Pro každý marker byla na celkový objem reakce 25 μ l reakce vyzkoušena koncentrace (0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6) μ M každého z primerů F a R a (25; 50; 75; 100) ng templátové DNA získané z mladého listu. Amplifikační program vycházel z manuálu ke kitu Type-it[®] Microsatellite PCR. Teplota a čas počáteční denaturace byly podle doporučení manuálu kitu 95 °C a 5 min. Tato teplota a čas krom úplné denaturace DNA také aktivuje HotStar Taq polymerázu. Pro cyklicky se opakující denaturaci se ponechala teplota 95 °C a otestovala se doba trvání (25; 30; 35; 40; 45) s. Pro teplotu annealingu (přisídání primerů) každého markeru byl využit teplotní gradient termocykleru v rozmezí teplot (44 – 67) °C a otestován čas trvání annealingu (45; 50; 60; 70; 85) s. Teplota extenze byla vyzkoušena v rozmezí (68 – 72) °C a době trvání (25; 30; 35; 40; 45) s. Pro každý marker bylo vyzkoušeno (30; 35; 38; 40; 42; 45) cyklů. Pro závěrečnou extenzi byly otestovány teploty (68; 70; 72) °C a doba trvání (10; 15; 20; 25; 30) min.

Separace produktů amplifikace byla provedena pomocí kapilární elektroforézy na fragmentovém analyzátoru. Výrobce fragmentového analyzátoru uvádí separační rozlišení (5 – 10) bp a správnost DNA sizingu ± 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.

Získaná data byla vyhodnocena pomocí softwaru PROSize 2,0.

Šest výše uvedených markerů bylo otestováno u devíti vzorků známých odrůd révy vinné. Desátým vzorkem byl vzorek kontrolní bez označení pro otestování, zda je metoda vhodná pro určení odrůdy. Amplifikace každého vzorku a markeru byla provedena ve dvou paralelních stanoveních. Protože má réva vinná diploidní počet chromozomů, výsledkem amplifikace každého markeru jsou dva produkty - 2 alely - N1 a N2 s odlišnou velikostí bp, pokud je heterozygotní. V případě, že je daný marker homozygotní, je amplifikační produkt pouze jeden a velikost bp N1 je shodná s N2. U každé odrůdy byl otestován vzorek v různých fenofázích: mladý list, dospělý list, hrozen a réví. Jak se předpokládalo, velikosti alel jednotlivých markerů byly u všech fenofází shodné. Ve vzorcích s vyšší koncentrací DNA a možností jejího ředění a tím i naředění případných inhibičních látek vycházely ve většině případů větší a tím pádem lépe viditelné produkty amplifikace. Na závěr byla u vzorků 1 – 9 testována opakovatelnost měření. Byla vybrána DNA mladého listu z důvodu vyšší koncentrace DNA a možnosti ji naředit a snížit tak množství inhibičních látek v izolátu obsažených. Na každém vzorku byly provedeny dvě na sobě nezávislé PCR pro každý marker. Výsledky se u jednotlivých odrůd shodovaly. Výsledky amplifikace bylo vyhodnoceno porovnáním velikostí alel referenčních odrůd uvedených v European Vitis Database s výsledky získanými v laboratoři.

Chardonnay

Výsledky amplifikace byly vyhodnoceny porovnáním velikostí alel referenčních odrůd uvedených v European Vitis Database (Tabulka 3) s výsledky získanými v laboratoři (Tabulka 4). U většiny markerů byly amplifikací získány produkty odpovídající rozmezí velikostí bp uvedených v Tabulce 5. V některých případech se velikosti získaných produktů liší o (1 – 3) bp. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byla použita pro tvorbu databáze nebo průběhem kapilární elektroforézy a jsou podle European Vitis Database přípustné.

U odrůdy Chardonnay byly navíc dodány vzorky mladého a dospělého listu z každé rostliny zvlášť pro porovnání výsledků mezi rostlinami v rámci jedné odrůdy. Bylo otestováno pět samostatných rostlin a jeden směsný vzorek z nich připravený. Rozdíly ve velikostech alel mezi jednotlivými odrůdami nejsou (Tabulka 5).

Tabulka 3. Chardonnay - Rozmezí velikostí alel určených dle European Vitis Database.

	N1 (bp)	N2 (bp)
VVS2	135 – 138	141 – 144
VVMD5	230 – 236	234 – 240
VVMD7	237 – 243	241 – 247
VVMD27	177 – 181	185 – 189
VrZAG62	186 – 192	194 – 200
VrZAG79	240 – 244	242 – 246

Tabulka 4. Chardonnay - Výsledky amplifikací SSR markerů analyzované na fragmentovém analyzátoru.

Fáze fenotypu	Číslo vzorku	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VrZAG62		VrZAG79	
		N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)
Mladý list	1AA	135	141	232	236	240	244	175	183	184	192	242	242
Mladý list	1AB	135	141	232	237	240	244	176	184	184	192	243	243
Dospělý list	1BA	135	141	232	236	241	244	175	183	183	191	243	243
Dospělý list	1BB	136	141	232	236	240	244	175	183	185	193	243	243
Hrozen	1CA	135	141	232	236	241	244	174	183	187	192	243	243
Hrozen	1CB	136	142	232	236	240	244	175	183	183	191	244	244
Réví	1DA	136	141	231	235	240	243	176	185	186	194	245	245
Réví	1DB	136	142	232	236	240	243	176	184	185	193	245	245

Tabulka 5. Chardonnay - Výsledky amplifikací SSR markerů analyzované na fragmentovém analyzátoru – porovnání výsledků mezi rostlinami v rámci jedné odrůdy.

Fáze fenotypu	Číslo vzorku	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VrZAG62		VrZAG79	
		N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)
Mladý list	1/1A	135	141	231	236	237	240	174	182	187	197	242	242
Mladý list	1/2A	135	141	232	235	237	241	174	182	186	195	243	243
Mladý list	1/3A	135	140	231	235	240	244	174	182	188	195	242	242
Mladý list	1/4A	135	141	231	235	240	243	174	182	185	193	244	244
Mladý list	1/5A	135	141	231	235	239	243	184	183	186	197	244	244
Mladý list	1/SMA	134	140	231	235	240	243	175	183	186	197	241	241
Dospělý list	1/1B	134	140	232	236	240	244	174	182	184	191	243	243
Dospělý list	1/2B	135	140	231	235	236	240	174	182	184	192	242	242
Dospělý list	1/3B	135	140	231	235	236	240	174	182	182	191	243	243
Dospělý list	1/4B	135	141	230	235	238	242	175	183	184	193	242	242
Dospělý list	1/5B	135	140	231	235	237	240	175	183	184	195	241	241
Dospělý list	1/SMB	135	141	231	235	236	240	175	183	184	192	242	242

Sylvánské zelené

Výsledky amplifikace byly vyhodnoceny porovnáním velikostí alel referenčních odrůd uvedených v European Vitis Database (Tabulka 6) s výsledky získanými v laboratoři (Tabulka 7). U většiny markerů se amplifikací získané produkty liší o (1 – 3) bp. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byla použita pro tvorbu databáze nebo průběhem kapilární elektroforézy a jsou podle European Vitis Database přípustné.

Tabulka 6. Sylvánské zelené - rozmezí velikostí alel určených podle European Vitis Database.

	N1	N2
VVS2	149 – 152	151 – 154
VVMD5	222 – 228	228 – 234
VVMD7	241 – 247	245 – 251
VVMD27	185 – 189	190 – 210
VrZAG62	186 – 192	202 – 208
VrZAG79	246 – 250	248 – 252

Tabulka 7. Sylvánské zelené - Výsledky amplifikací SSR markerů analyzované na fragmentovém analyzátoru.

Fáze fenotypu	Číslo vzorku	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VrZAG62		VrZAG79	
		N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)
Mladý list	2AA	149	151	220	227	241	244	184	189	185	202	247	252
Mladý list	2AB	149	151	220	227	241	244	184	190	184	202	248	252
Dospělý list	2BA	149	151	219	225	241	243	182	187	184	201	246	251
Dospělý list	2BB	149	151	219	225	241	244	183	188	186	203	245	250
Hrozen	2CA	149	151	221	228	244	248	183	189	184	200	247	250
Hrozen	2CB	148	152	221	228	241	243	183	189	185	202	246	251
Réví	2DA	148	152	220	227	240	243	184	189	186	203	246	250
Réví	2DB	149	152	220	227	240	243	183	188	185	201	247	250

Tramín červený

Výsledky amplifikace byly vyhodnoceny porovnáním velikostí alel referenčních odrůd uvedených v European Vitis Database (Tabulka 8) s výsledky získanými v laboratoři (Tabulka 9). U většiny markerů se amplifikací získané produkty liší o (1 – 3) bp. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byla použita pro tvorbu databáze nebo průběhem kapilární elektroforézy a jsou podle European Vitis Database přípustné. Na většině elektroforeogramů jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

Tabulka 8. Tramín červený - Rozmezí velikostí alel určených podle European Vitis Database.

	N1	N2
VVS2	148 – 152	148 – 152
VVMD5	228 – 234	234 – 240
VVMD7	241 – 247	255 – 261
VVMD27	185 – 189	185 – 189
VrZAG62	186 – 192	192 – 198
VrZAG79	242 – 246	248 – 252

Tabulka 9. Tramín červený - Výsledky amplifikací SSR markerů analyzované na fragmentovém analyzátoru.

Fáze fenotypu	Číslo vzorku	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VrZAG62		VrZAG79	
		N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2
Mladý list	3AA	148	148	227	234	240	254	183	183	191	196	242	247
Mladý list	3AB	148	148	226	234	240	254	182	182	191	196	242	247
Dospělý list	3BA	148	148	228	235	240	254	183	183	189	195	240	246
Dospělý list	3BB	147	147	227	234	240	254	184	184	190	195	240	245
Hrozen	3CA	148	148	226	333	241	254	184	184	188	194	244	250
Hrozen	3CB	148	148	226	234	240	254	184	184	190	195	244	250
Réví	3DA	147	147	225	232	240	254	185	185	188	194	243	247
Réví	3DB	148	148	225	232	240	254	183	183	190	196	243	249

Modrý Portugal

Výsledky amplifikace byly vyhodnoceny porovnáním velikostí alel referenčních odrůd uvedených v European Vitis Database (Tabulka 10) s výsledky získanými v laboratoři (Tabulka 11). U většiny markerů se produkty získané amplifikací liší o (1 – 3) bp. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byla použita pro tvorbu databáze nebo průběhem kapilární elektroforézy a jsou podle European Vitis Database přípustné. Na většině elektroforeogramů jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se pomocí optimalizace nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

Tabulka 10. Modrý Portugal - Rozmezí velikostí alel určených podle European Vitis Database.

	N1	N2
VVS2	141 – 144	149 – 152
VVMD5	224 – 230	230 – 236
VVMD7	241 – 247	253 – 259
VVMD27	177 – 181	190 – 194
VrZAG62	186 – 192	202 – 208
VrZAG79	246 – 250	256 – 260

Tabulka 11. Modrý Portugal - Výsledky amplifikací SSR markerů analyzované na fragmentovém analyzátoru.

Fáze fenotypu	Číslo vzorku	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VrZAG62		VrZAG79	
		N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)
Mladý list	4AA	141	148	224	231	239	252	175	188	183	199	248	258
Mladý list	4AB	140	148	224	230	242	255	175	189	185	204	246	257
Dospělý list	4BA	141	148	227	233	242	254	175	189	184	201	247	257
Dospělý list	4BB	141	148	225	231	240	252	176	189	183	199	246	256
Hrozen	4CA	140	148	227	233	241	254	175	188	186	202	246	257
Hrozen	4CB	140	148	226	232	240	252	174	187	185	201	246	257
Réví	4DA	141	148	227	233	239	251	175	188	187	204	247	257
Réví	4DB	140	147	227	233	240	252	175	189	185	201	247	257

Merlot

Výsledky amplifikace byly vyhodnoceny porovnáním velikostí alel referenčních odrůd uvedených v European Vitis Database (Tabulka 12) s výsledky získanými v laboratoři (Tabulka 13). U většiny markerů se produkty získané amplifikací liší o (1 – 4) bp. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byla použita pro tvorbu databáze nebo průběhem kapilární elektroforézy a jsou podle European Vitis Database přípustné. Na většině elektroforeogramů jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

Tabulka 12. Merlot - Rozmezí velikostí alel určených podle European Vitis Database.

	N1	N2
VVS2	137 – 140	149 – 152
VVMD5	222 – 228	232 – 238
VVMD7	237 – 243	245 – 251
VVMD27	185 – 189	187 – 191
VrZAG62	192 – 198	192 – 198
VrZAG79	256 – 260	256 – 260

Tabulka 13. Merlot - Výsledky amplifikací SSR markerů analyzované na fragmentovém analyzátoru.

Fáze fenotypu	Číslo vzorku	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VrZAG62		VrZAG79	
		N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)
Mladý list	5AA	135	147	222	233	236	244	182	186	190	190	257	257
Mladý list	5AB	135	146	222	233	236	244	182	186	190	190	258	258
Dospělý list	5BA	135	146	225	236	237	244	182	186	188	188	254	254
Dospělý list	5BB	135	146	224	235	235	243	184	187	190	190	258	258
Hrozen	5CA	134	145	226	236	237	244	181	185	188	188	257	257
Hrozen	5CB	134	145	226	237	237	244	181	184	190	190	256	256
Réví	5DA	135	146	226	237	237	245	181	185	190	190	257	257
Réví	5DB	135	146	226	236	237	245	181	184	189	189	257	257

Malverina

Výsledky amplifikace byly vyhodnoceny porovnáním velikostí alel referenčních odrůd uvedených v European Vitis Database (Tabulka 14) s výsledky získanými v laboratoři (Tabulka 15). U většiny markerů se produkty získané amplifikací liší o (1 – 5) bp. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byla použita pro tvorbu databáze nebo průběhem kapilární elektroforézy a jsou podle European Vitis Database přípustné. Na většině elektroforeogramů jsou vedle očekávaných produktů vidět i nespecifické produkty, které se nepodařilo odstranit nebo minimalizovat.

Tabulka 14. Malverina - Rozmezí velikostí alel určených dle European Vitis Database.

	N1	N2
VVS2	130 – 134	136 – 140
VVMD5	232 – 238	236 – 242
VVMD7	249 – 255	249 – 255
VVMD27	177 – 181	187 – 191
VrZAG62	192 – 198	192 – 198
VrZAG79	252 – 258	256 – 260

Tabulka 16. Malverina - Výsledky amplifikací SSR markerů analyzované na fragmentovém analyzátoru.

Fáze fenotypu	Číslo vzorku	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VrZAG62		VrZAG79	
		N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)
Mladý list	6AA	132	137	234	238	247	247	176	185	187	187	254	257
Mladý list	6AB	132	137	233	238	247	247	176	185	187	187	253	257
Dospělý list	6BA	131	137	235	240	249	249	176	185	188	188	254	257
Dospělý list	6BB	131	137	235	239	251	251	176	185	187	187	254	256
Hrozen	6CA	131	137	235	239	246	246	175	185	187	187	253	255
Hrozen	6CB	131	137	234	239	246	246	176	185	188	188	252	255
Réví	6DA	132	137	235	240	247	247	176	185	190	190	255	256
Réví	6DB	132	137	235	239	247	247	177	186	190	190	252	255

Rulandské bílé

Výsledky amplifikace byly vyhodnoceny porovnáním velikostí alel referenčních odrůd uvedených v European Vitis Database (Tabulka 16) s výsledky získanými v laboratoři (Tabulka 17). U většiny markerů se amplifikací získané produkty liší o (1 – 5) bp. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byla použita pro tvorbu databáze nebo průběhem kapilární elektroforézy a jsou podle European Vitis Database přípustné.

Tabulka 16. Rulandské bílé – Rozmezí velikostí alel určených podle European Vitis Database.

	N1	N2
VVS2	135 – 138	149 – 152
VVMD5	224 – 230	234 – 240
VVMD7	237 – 243	241 – 247
VVMD27	181 – 185	185 – 189
VrZAG62	186 – 192	192 – 198
VrZAG79	236 – 240	242 – 246

Tabulka 17. Rulandské bílé Výsledky amplifikací SSR markerů analyzované na fragmentovém analyzátoru.

Fáze fenotypu	Číslo vzorku	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VrZAG62		VrZAG79	
		N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)
Mladý list	7AA	135	148	221	232	235	239	180	184	187	193	235	242
Mladý list	7AB	136	149	221	232	235	239	180	184	187	193	236	242
Dospělý list	7BA	135	148	221	232	235	239	182	186	186	192	235	242
Dospělý list	7BB	135	149	221	232	235	239	181	184	187	192	237	243
Hrozen	7CA	135	148	222	233	235	239	180	184	183	189	234	241
Hrozen	7CB	135	148	221	232	237	239	180	184	183	189	236	242
Réví	7DA	135	148	221	232	238	241	182	186	186	192	237	244
Réví	7DB	135	148	222	232	237	241	181	185	187	192	236	242

Chardonnay klon

Vzorky klonu odrůdy Chardonnay byly dodány pro srovnání, zda se velikosti SSR markerů klonu neliší od referenční odrůdy Chardonnay.

Výsledky amplifikace byly vyhodnoceny porovnáním velikostí alel referenčních odrůd uvedených v European Vitis Database (Tabulka 18) s výsledky získanými v laboratoři (Tabulka 19). V některých případech se velikosti námi získaných produktů liší o (1 – 4) bp. Malé odchylky mohou být způsobeny použitím jiné metody, než byla použita pro tvorbu databáze nebo průběhem kapilární elektroforézy a jsou podle European Vitis Database přípustné.

Analýzou bylo zjištěno, že se od sebe klon a referenční odrůda neliší.

Tabulka 18. Chardonnay klon - Rozmezí velikostí alel určených podle European Vitis Database.

	N1	N2
VVS2	135 - 138	141 - 144
VVMD5	230 - 236	234 - 240
VVMD7	237 - 243	241 - 247
VVMD27	177 - 181	185 - 189
VrZAG62	186 - 192	194 - 200
VrZAG79	240 - 244	242 - 246

Tabulka 19. Chardonnay klon Výsledky amplifikací SSR markerů analyzované na fragmentovém analyzátoru.

Fáze fenotypu	Číslo vzorku	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VrZAG62		VrZAG79	
		N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)
Mladý list	8AA	135	141	234	238	235	238	174	182	185	193	242	242
Mladý list	8AB	135	141	234	238	234	237	174	181	186	195	242	242
Dospělý list	8BA	135	141	232	236	234	238	174	182	187	195	241	241
Dospělý list	8BB	135	140	232	236	234	238	174	183	186	195	240	240
Hrozen	8CA	135	140	232	237	235	238	174	182	184	193	242	242
Hrozen	8CB	135	141	233	237	235	239	174	181	185	193	241	241
Réví	8DA	135	140	233	238	234	237	174	182	185	197	244	244
Réví	8DB	135	140	233	237	235	238	174	181	184	195	245	245

Cabernet Moravia

Výsledky amplifikace byly vyhodnoceny porovnáním velikostí alel referenčních odrůd uvedených v European Vitis Database (Tabulka 20) s výsledky získanými v laboratoři (Tabulka 21). U většiny markerů byly amplifikací získány produkty odpovídající rozmezí velikostí bp uvedených v Tabulce 20. V některých případech se velikosti námi získaných produktů liší o (1-4) bp.

Tabulka 20. Cabernet Moravia - Rozmezí velikostí alel určených podle European Vitis Database.

	N1	N2
VVS2	141 – 144	145 – 148
VVMD5	222 – 228	222 – 228
VVMD7	237 – 243	261 – 267
VVMD27	175 – 179	185 – 189
VrZAG62	192 – 198	202 – 208
VrZAG79	234 – 238	242 – 246

Tabulka 21. Cabernet Moravia Výsledky amplifikací SSR markerů analyzované na fragmentovém analyzátoru.

Fáze fenotypu	Číslo vzorku	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VrZAG62		VrZAG79	
		N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)
Mladý list	9AA	143	151	226	226	237	262	172	182	191	202	235	243
Mladý list	9AB	143	150	226	226	236	261	172	182	191	201	235	244
Dospělý list	9BA	144	151	227	227	236	261	172	182	192	202	235	243
Dospělý list	9BB	143	150	224	224	237	262	172	181	189	199	238	247
Hrozen	9CA	143	150	226	226	238	263	172	181	190	201	238	246
Hrozen	9CB	144	151	227	227	241	268	172	181	191	201	237	246
Réví	9DA	143	151	226	226	239	267	172	181	193	203	238	247
Réví	9DB	143	151	226	226	238	263	172	182	192	203	238	247

Kontrolní vzorek

Kontrolní vzorek měl být odebrán z rostlin jedné odrůdy z devíti odrůd testovaných. Vzorek byl dodán ve všech čtyřech fenofázích. Porovnáním výsledků amplifikací SSR markerů (tabulky 7, 17 a 22) bylo zjištěno, že došlo k omylu a vzorky mladého a dospělého listu byly odebrány z rostlin odrůdy Rulandské bílé a vzorky hroznu a réví z rostlin odrůdy Sylvánské zelené. Tuto skutečnost potvrdil i pracovník, který vzorky odebíral.

Tabulka 22. Výsledky amplifikací SSR markerů kontrolního vzorku analyzovaného na fragmentovém analyzátoru.

Fáze fenotypu	Číslo vzorku	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VrZAG62		VrZAG79	
		N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)	N1 (bp)	N2 (bp)
Mladý list	10AA	135	148	223	234	236	241	178	182	186	192	237	243
Mladý list	10AB	135	147	222	234	235	238	177	181	185	190	238	244
Dospělý list	10BA	135	148	223	233	234	239	177	181	185	191	238	244
Dospělý list	10BB	135	148	223	234	235	238	178	182	183	189	238	244
Hrozen	10CA	148	150	220	226	239	243	181	187	185	201	247	249
Hrozen	10CB	147	150	221	227	239	242	181	187	185	201	247	249
Réví	10DA	148	150	221	228	241	245	183	189	186	202	247	252
Réví	10DB	148	150	221	228	241	245	182	188	185	201	247	250

7 Závěr

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci odrůd révy vinné. Tento úkol se podařilo splnit. Testovaná metoda dokázala potvrdit identifikaci odrůd révy vinné popsanych v databázi a zjistit odrůdy z předložených kontrolních neoznačených vzorků.

8 Literatura

1. Vytvoření alternativní metodiky identifikace odrůd révy vinné založené na zhodnocení rozdílnosti ve struktuře DNA u jednotlivých odrůd, Závěrečná zpráva NAZV QC 1156, Doc. RNDr. Miroslav Pidra, CSc.
2. The European Vitis Database, www.eu-vitis.de
3. Klíč pro identifikaci odrůd révy pomocí SSR markerů, http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/571/databaze_revy/klice/klicSSR.html, Baránek et al.
4. Využití SSR metody při studiu neregistrovaných genotypů rodu Vitis, Diplomová práce, Andrea Štefková, 2013.
5. Molekulární metody – hodnocení genotypů – Marker Assisted Breeding, Metodické listy OPVK, Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.
6. Manuál kitu DNeasy® Plant Handbook, Qiagen, 2012.
7. Manuál kitu Type-it® Microsatellite PCR Handbook, Qiagen 2011.
8. Manuál kitu DNF-900 dsDNA Reagent Kit User Guide for use with the Fragment Analyser™ Automated CE System, Advanced Analytical, 2014.
9. A comparative study of the general utility of SSR markers for grapevine variety characterization and identification: developing a common standard for uniform labelling using reference cultivar-based allele codes, This at al., 2003, 116-142.
10. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars, This at al, 2004, 1448-1458.
11. A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis, Sandra Lo Piccolo at al., 2012, 10305-10308.
12. Two methods of DNA extraction of musts and leaves, Briciu Daniela at al., 2010.
13. Genetic profiling of nine grapevine cultivars from Romania, based on SSR markers, Ghetea at al., 2010, 116-124.
14. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants, Rajwant k. Kalia et al., 2010, 309 – 334.
15. Final Technical Activity Report GrapeGen06, 2012.
16. Methods in Molecular Biology – PCR Protocols, John M. S. Bartlett, David Stirling, Taberlet at al., 2006.
17. PCR reactions set up and amplification conditions, Online Publication, 2010 www.labguide.cz
18. Separation of DNA by Capillary Electrophoresis, Herb Schwartz, Andreas Guttman.

Převedení metod pro sledování mykotoxinů a dalších nežádoucích látek v krmivech z LC-MS (iontová past) na jiný LC-MS systém

Martina Čumová, Zuzana Nehybová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
martina.cumova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Metody pro sledování mykotoxinů a dalších nežádoucích látek v krmivech byly převedeny z LC-MS systému typu iontová past na LC-MS systém typu trojitého kvadrupólu.

Z LC-MS systému typu iontová past na LC-MS systém typu trojitého kvadrupólu byly převedeny tyto zkoušky:

333 Stanovení mykotoxinů metodou LC-MS/MS (Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, Fumonisin B₁, B₂, T-2 toxin a HT-2 toxin)

341 Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou LC-MS/MS

Změna se týká pouze typu hmotnostně spektrometrické detekce, která je novější a vykazuje lepší výkonnostní kritéria (např. citlivost, dynamický rozsah, přesnost...) než původní LC-MS sestava, a proto byly vzorky připravovány podle stávající metodiky. Jedná se o tyto JPP ÚKZÚZ

10530.2 Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou LC-MS

10570.1 Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – aflatoxin B₁, B₂, G₁ a G₂

10571.1 Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – fumonisin B₁ a B₂

10572.1 Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – toxin T-2 a HT-2.

Měřicí podmínky pro stanovení melaminu a kyseliny kyanurové odpovídaly parametrům uvedeným v JPP 10530.2. Měřicí podmínky pro stanovení mykotoxinů odpovídaly parametrům

uvedeným v JPP 10575.1. Všechny tyto postupy jsou zveřejněny na internetových stránkách ÚKZÚZ.

Správnost metody byla ověřena pomocí vzorků, které byly obohaceny standardy sledovaných látek a pomocí dostupných referenčních materiálů.

2 Výsledky a diskuse

2.1 Ověření správnosti zkoušky 341

Správnost metody pro stanovení melaminu a kyanurové kyseliny byla ověřena šestkrát opakovanou analýzou obohacených vzorků mléčného krmiva (MKS) a kompletní krmné směsi pro kočky (KKS) na třech hladinách 0,5 mg/kg; 5 mg/kg; 50 mg/kg. Výtěžnost melaminu se pohybovala v rozmezí (82 – 97) % a výtěžnost kyanurové kyseliny se pohybovala v rozsahu (93 – 105) %. Oba parametry splňovaly požadavky na tato výkonnostní kritéria (80 – 110) %, která jsou uvedena v Rozhodnutí komise 2002/657/ES. Správnost metody byla dále ověřena pomocí dvou vzorků interních referenčních materiálů (IRM) s deklarovanou hodnotou melaminu (viz Tabulka 1).

Tabulka 1. Ověření správnosti metody pro stanovení melaminu pomocí referenčních materiálů

IRM/rok	Matrice	Deklarované množství (ppm)	Povolená odchylka (ppm)	Stanovené množství (ppm)	z-skóre
Fapas 3027/2010	MKS	13,94	1,5	16,019	1,4
Fapas 3023/2009	Čokoláda	5,69	0,701	5,167	0,7

Správnost metody byla také hodnocena pomocí programu Effivaldation 3.0. Protokoly z tohoto programu jsou přiloženy k validační zprávě. Závěrem vyhodnocení je, že analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

2.2 Ověření správnosti zkoušky 333

Správnost metody pro stanovení zástupců mykotoxinů, kterými byly fumonisin B₁ a fumonisin B₂ byla ověřena pomocí certifikovaného referenčního materiálu (CRM) FAPAS T2264.

Pro kvantifikaci byla použita metoda izotopově značeného standardního přídatku. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Ověření správnosti metody pro stanovení fumonisinu B₁ a B₂ pomocí CRM.

CRM: FAPAS T2264				
Parametr	Naměřená Hodnota (ppb)	Referenční hodnota (ppb)	Referenční přesnost (ppb)	Hodnocení
Fumonisin B ₁	1357	935	460 – 1409	$z = 0,9$
Fumonisin B ₂	255	259	128 – 391	$z = - 0,03$

Závěrem vyhodnocení je, že analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

3 Závěr

Byly převedeny metody pro sledování mykotoxinů a dalších nežádoucích látek v krmivech z LC-MS systému typu iontová past na LC-MS systém typu trojitého kvadrupólu.

Následně byla ověřena správnost metod. Analytické metody poskytují statisticky správné výsledky.

4 Literatura

1. Rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků (oznámeno pod číslem K(2002) 3044). Text s významem pro EHP (2002/657/ES).
2. Martina Bolechová. Validační zpráva č. 3/2014. Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou LC-MS. ÚKZÚZ, 2014.
3. JPP ÚKZÚZ 10530.1 Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou LC-MS. 2014.
4. JPP ÚKZÚZ 10570.1 Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – Aflatoxin B₁, B₂, G₁ a G₂. 2009.
5. JPP ÚKZÚZ 10571.1 Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – Fumonisin B₁ a B₂. 2009.
6. JPP ÚKZÚZ 10572.1 Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – Toxin T-2 a HT-2. 2009.
7. JPP ÚKZÚZ 10575.1. Multireziduální metoda pro stanovení mykotoxinů metodou LC-MS/MS.

Analýza obsahu feromonových odparníků

Pavla Tieffová, Veronika Nagyová, Přemysl Fiala

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Sekce zemědělských vstupů, Oddělení půdy
a lesnictví, Hroznová 2, 656 06 Brno
veronika.nagyova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Feromonové odparníky se používají v lesnické praxi k vábení a signalizaci výskytu brouků lýkožroutů. V nabídce obchodní sítě je velké množství těchto výrobků, jejich kontrolou pověřilo ministerstvo zemědělství ÚKZÚZ.

První série kontrol proběhla už v letech 2006 až 2007. Byl zpracován přehled o feromonových přípravcích dostupných v naší distribuční síti a byly shromážděny informace o technických specifikacích těchto výrobků. Pro vybrané přípravky (FeSex Typo, Ipsgone, IT-Ecolure Extra a Pheroprax-A) byly založeny biologické zkoušky a byla zkontrolována hmotnost obsahu a analyzována náplň metodou GC-MS.

Druhá série kontrol pokračovala v letech 2014 až 2015. Ověřování probíhalo ve dvou cyklech, jarním a letním. Odparníky ke kontrole byly zakoupeny v maloobchodní síti, v roce 2014 to bylo 110 kusů (IT Ecolure, IT Ecolure Mega, PC-Ecolure a PCIT-Ecolure), v roce 2015 dalších 115 kusů (IT Ecolure a Pheagr IT-Extra). V analytické části zkoušení byla ověřena hmotnost náplně a její složení, biologická účinnost byla ověřena formou vyvěšení v lesním porostu.

Za každý rok zkoušení byla na MZe předána závěrečná zpráva s výsledky a hodnocením kontrol.

2 Úvod

Feromonové odparníky jsou pomocné přípravky určené pro monitorování a odchyt brouků lýkožroutů. Podle složení náplně a přítomnosti různých agregačních feromonů je deklarována

jejich účinnost pro vábení nejen lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*), ale i dalších druhů, například lýkožrouta severského, vrcholkového nebo lesklého (*Ips duplicatus*, *Ips acuminatus*, *Pytyogenes chalcographus*).

Obsah náplně byl analyzován pomocí plynové chromatografie s hmotnostně selektivní detekcí (GC-MS), identifikace deklarovaných látek byla provedena porovnáním hmotnostních spekter. Pro kvantifikaci obsahu byly zakoupeny analytické standardy deklarovaných složek náplně a látky vhodné jako vnitřní standard (*cis-verbenol*, *verbenone*, *ipsdienol*, *chalcogran*, *limonene*, *pinene*, *myrtenol*, *camphor* a *karvon*).

3 Materiál a metody

3.1 Analytické ověření obsahu náplně feromonových odparníků

Feromonová náplň odparníku je směsí těkavých rozpouštědel a terpenových látek s feromonovým a synergickým účinkem, napuštěná do sorpčního materiálu a uzavřená v nepropustné folii. Jednotlivé složky směsi lze identifikovat na základě retenčního času při dělení na chromatografické koloně a shody hmotnostního spektra látky s příslušným analytickým standardem. Obsah analytů lze spočítat z kalibrační závislosti odezvy signálu na koncentraci.

Po otevření obalu se těkavé složky začnou okamžitě uvolňovat do okolí a odebrat přesnou navážku vzorku není možné. Proto byla vypracována metoda nástríku vzorku z plynné fáze (HS - head space analýza).

3.1.1 HS kvalitativní analýza

Okamžitě po otevření odparníku se sorpční polštářek s náplní vloží do reakční HS vialky. Uzavřená vialka se vzorkem se diferenčně zváží a vzorek par se zanalyzuje pomocí plynového chromatografu se selektivním hmotnostně spektrometrickým detektorem (metoda GC-MS). Naměřená spektra látek nalezených ve vzorku se porovnají se spektrem analytických standardů deklarovaných složek odparníku.

3.1.2 Kvantifikace obsahu složek náplně

Po ukončení HS analýz se náplň extrahuje do rozpouštědla. Přes septum se do vialky přidá 5 ml acetonu (pomocí injekční jehly a 10ml plastové stříkačky) a extrakce se provede v ultrazvukové

lázni. Extrakt se podle potřeby naředí nepolárním rozpouštědlem, obohatí se přidavkem vnitřního standardu a tento roztok je připraven pro GC-MS kvantitativní analýzu.

3.1.3 Stanovení hmotnosti náplně

Sorpční polštářek se po ukončení HS analýz a extrakce do rozpouštědla vyjme z HS vialky a společně s prázdným obalem se vysuší do konstantní hmotnosti. Hmotnost vlastní náplně a navážka vzorku k analýze se stanoví z rozdílu hmotnosti neotevřeného odparníku a hmotnosti prázdného obalu a sorpčního materiálu.

3.1.4 Přístroje a pomůcky

Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem, GC-MS, Trace Ultra/ITQ 1100 (Thermo).

Kapilární analytická kolona, DB XLB 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm.

Autosampler s HS jednotkou, Combi Pal (CTC Analytics).

Plynotěsná stříkačka pro HS nástřik, 1 ml a pro kapalný nástřik, 10 μl.

Analytické váhy.

Laboratorní sklo a vybavení.

3.2 Biologické ověření účinnosti feromonových odparníků

Pro ověření biologické účinnosti odparníků byly v letech 2014 a 2015 založeny terénní zkoušky na lesních pozemcích stanic Třebíč, Myslbořice a Lány. Odparníky byly vyvěšeny do lapačů typu Tyson. Prostorové ovlivnění počtu lapených brouků bylo eliminováno pravidelným střídáním odparníků v lapačích, na stanoviště byl zařazen i srovnávací slepý vzorek, lapač bez odparníku. Výsledky byly uvedeny v průběžných zprávách pro MZe za příslušný rok. Biologická zkouška potvrdila srovnatelnou účinnost ověřovaných feromonových odparníků, která odpovídala dodržení potřebné technické kvality výrobku.

4 Výsledky a diskuze

Metodou GC-MS byla naměřena hmotnostní spektra hlavních složek náplně odparníku a porovnána se spektry analytických standardů rozpouštědel (metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol a jejich polohové izomery) a látek ze skupiny terpenů (cis/trans-verbenol, ipsdienol, myrcenol, limonen, pinen). Pro složky, u kterých byl deklarován požadovaný obsah, byl zakoupen analytický standard a obsah byl kvantifikován z kalibrační přímky ve vhodném

koncentračním rozsahu. Kvantifikace složek byla spočtena z ploch vybraných selektivních fragmentů, přesnost kvantifikace byla zajištěna použitím vnitřního standardu. Výsledky byly přepočteny na hmotnostní % obsahu stanovované složky v navážce náplně a porovnány s údaji uvedenými na etiketě přípravku, případně v technických specifikacích doložených při registraci výrobku.

Postupy zkoušení byly navrženy a optimalizovány v akreditované laboratoři ÚKZÚZ, protože vhodné metody nebyly v technické specifikaci pro odparníky uvedené vůbec, nebo byly zastaralé a nelogicky komplikované.

Metodou GC-MS je možné rozlišit polohové i optické izomery deklarovaných látek, kvantifikovat jejich obsah a stanovit i izomerovou čistotu vstupní suroviny.

Základním nedostatkem pro kontrolu a hodnocení výrobku je však absence definice kritérií, která by měla náplň odparníků splňovat. Feromonové odparníky jsou zařazeny jako pomocné přípravky ochrany rostlin, pro které nejsou požadavky na údaje uvedené na etiketě a v technické dokumentaci tak striktní, jako v případě přípravků na ochranu rostlin. Pokud u výrobku není přesně uvedena koncentrace jednotlivých složek a minimální čistota použitých chemikálií, nejsou známy nepřípustné příměsi, je obtížné výrobek hodnotit. Některé odparníky dokonce neobsahovaly ani údaj o minimální hmotnosti náplně.

5 Závěr

Kvantitativní analýza jednotlivých složek náplně je možná. NRL-ÚKZÚZ má k dispozici vhodné přístrojové vybavení, zpracován metodický postup analýz i analytické standardy potřebné pro kvantifikaci, chybí ale přesná definice požadovaných ukazatelů a povolených limitů pro jejich kontrolu. Základním a jednoduše kontrolovatelným parametrem pro hodnocení je hmotnost náplně odparníku, proto by měla být na každém výrobku zřetelně vyznačena, ideálně s uvedením povolené tolerance hmotnosti náplně.

Feromonové odparníky se používají k signalizaci výskytu škůdců, především k záchytu brouků lýkožroutů. Vlastní ochrana lesa proti kůrovci se provádí asanací pokáceného dřeva insekticidy. Proto MZe vypsalo v roce 2016 nový projekt (ČJ 35797/2016-MZe-16212) na kontrolu ošetření vytěžených smrkových kmenů insekticidy. Tímto úkolem byl opět pověřen ÚKZÚZ. V laboratoři NRL-Oddělení reziduálních analýz byla optimalizována a validována GC-MS/MS metoda stanovení reziduí účinných látek přípravků používaných v lesnické praxi k ošetření dřeva, tj. pyrethroidových insekticidů v kůře stromů. Postup je vhodný pro identifikaci

a kvantifikaci i optických izomerů účinných látek a je tedy možné prokázat ošetření dřeva a ověřit použití deklarovaného přípravku.

6 Literatura

1. Tieffová, P., Kosubová, P., Fiala, P., Ověřování kvality ošetření vytěžených smrkových kmenů insekticidem, Závěrečná zpráva pro MZe, 2016.
2. Tieffová, P., Fiala, P., Hodnocení účinnosti feromonových odparníků, Souhrnná zpráva za rok 2015 pro MZe, 2016.
3. Tieffová, P., Fiala, P., Hodnocení účinnosti feromonových odparníků, Průběžná zpráva za rok 2015, 1. a 2. část, 2015.
4. Fiala, P., Tieffová, P., Dobiáš, J. Hodnocení účinnosti feromonových odparníků, Souhrnná zpráva za rok 2014 pro MZe, 2014.
5. Fiala, P., Tieffová, P., Hodnocení účinnosti feromonových odparníků, Buletin NRL 2007, číslo 1/2007, ročník XI, str.55-62, ISSN 1801-9196.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXI 2017/2

Ročník: XXI, č. 2

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2017

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 41

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196