

Metodika pro všeobecnou charakterizaci genetické diversity odrůd konopí pomocí mikrosatelitních markérů

Jaroslava Ovesná, Ladislav Kučera, Jozef Pavel, Marie Bjelková



METODIKA PRO PRAXI

T A
Č R

Metodika byla vypracována pracovníky týmu Molekulární genetiky VÚRV, v.v.i. Praha (90%) a Agritec Plant Research, s.r.o. Šumperk (10%). Vznikla za finanční podpory MZe ČR a TAČR a je výstupem řešení projektu: TA04010331 a výzkumného záměru MZE RO0417

Autoři: Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc. (30%)

Ing. Ladislav Kučera, CSc. (30%)

Ing. Jozef Pavel (30%)

Ing. Marie Bjelková, PhD (10%)

Kontakt na autory: ovesna@vurv.cz

kuceral@vurv.cz

pavel@vurv.cz

marie.bjelkova@agritec.cz

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

Náklad: 20 ks

Vyšlo v roce: 2017

Vydáno bez jazykové úpravy

Autor fotografií: Ing. Ladislav Kučera, CSc.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2017

ISBN 978-80-7427-246-2

METODIKA PRO CHARAKTERIZACI GENETICKÉ DIVERSITY ODRŮD TECHNICKÉHO KONOPÍ V ČR POMOCÍ MIKROSATELITNÍCH MARKÉRŮ

Předmětem metodiky je postup charakterizace odrůd konopí pro posouzení genetické diverzity a posouzení odrůdové deklarace na základě analýzy délkové variability mikrosatelitů (SSR- Single Sequence Repeats) laboratořemi v praxi. Tato metoda umožňuje jednoznačnou identifikaci a odlišení jednotlivých odrůd technického konopí (konopí setého, *Cannabis sativa* L.). Využívá sady vybraných primerů pro amplifikaci cílových SSR lokusů v genomu *C. sativa* L. pomocí *Taq* polymerázy. Metoda je použitelná pro vzorky DNA izolované z jakékoliv části rostliny i semen v čerstvém i suchém stavu. Popisuje postup a potřebné vybavení pro provedení analýzy. Doporučuje způsob hodnocení výsledků.

METHOD FOR THE GENERAL CHARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY OF HEMP VARIETIES USING MICROSOFT MARKERS

The objective of the method is the process of characterization of *Cannabis* varieties for the assessment of genetic diversity and the confirmation of the variety authenticity on analysis of SSR (Single Sequence Repeats) by laboratories in practice. This method enables the unique varieties of technical hemp (*Cannabis sativa* L.) to be uniquely identified and distinguished. The protocol exploit newly established sets of selected primers for amplification of target SSR loci in *C. sativa* L. genome using *Taq* polymerase. The method is applicable to DNA samples isolated from any part of the plant and seeds in both fresh and dry conditions. Describes the procedure and necessary equipment to perform the analysis. Recommends how to evaluate the results.

Oponenti: prof. Ing. Katerina Demnerová, CSc, VŠCHT Praha

Mgr. Jitka Klempová, ÚKZÚZ Brno

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský vydal 11.12.2017 Osvědčení č.122798/2017 a metodika byla schválena odborem vědy, výzkumu a vzdělávání MZe pod č.j. 627/2018-MZE-14152 dne 11.1.2018. Ministerstvo zemědělství doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

Obsah

I. CÍL METODIKY	5
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	5
II.1 Úvod	5
II.2 Délkový polymorfismus mikrosatelitů	6
II.3 Příprava analytického vzorku	7
II.4 Izolace DNA.....	8
II.5 Analýza kvality a kvantity DNA	8
II.6 Kontrola kvality DNA	10
II.7 Amplifikace cílové sekvence mikrosatelitu.....	11
II.9 Vyhodnocení elektroforetogramů.....	14
II.10 Potřebné technické vybavení a činidla.....	14
III. ZHODNOCENÍ FINANČNÍ, ČASOVÉ A KAPACITNÍ NÁROČNOSTI	16
IV. PŘEDNOSTI METODY A MOŽNOSTI RUTINNÍHO VYUŽITÍ.....	17
V. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY.....	17
VI. EKONOMICKÉ PŘÍNOSY	18
VII. POUŽITÁ A DALŠÍ DOPORUČENÁ LITERATURA	18
VIII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE, NEBO JSOU PUBLIKOVÁNY.....	20

I. CÍL METODIKY

Cílem předložené metodiky je představit pro uživatele postup, kterým lze jednoznačně odlišit jednotlivé odrůdy konopí setého (*C. sativum* L.), které mohou být pěstovány na území ČR a to s využitím znalostí o polymorfismu DNA. Postup lze použít pro posouzení variability nebo kontrolu šlechtitelského procesu. Uživatel je seznámen s principy metody, laboratorním postupem i hodnocením výsledků.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

II.1 Úvod

Konopí seté (*Cannabis sativum* L.) se tradičně využívá jako olejnína a rostlina přadná, zařazuje se i mezi energetické plodiny. Konopí seté se na území České republiky pěstuje jako technická plodina po staletí. Vzhledem k tomu, že konopí může obsahovat vyšší hodnoty psychoaktivní látky ze skupiny tetrahydrokanabinolů (THC), platí pro pěstování konopí přesná pravidla. Pěstování technického konopí podléhá oznamovací povinnosti ze zákona č.167/1998 Sb., O návykových látkách. Ta je zakotvena v § 29 zákona a nařizuje ohlásit pěstování konopí příslušnému celnímu úřadu. Pěstitelé smí osít pole výhradně schválenou odrůdou konopí setého, která má kontrolovaný obsah THC v sušině podle norem EU. Pravidla pro přímé platby zemědělcům v režimech podpory v rámci společné zemědělské politiky stanoví, že plochy využívané k produkci konopí je možné považovat za způsobilé hektary pouze tehdy, pokud obsah tetrahydrokanabinolu v použitých odrůdách nepřesahuje 0,2 % (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1307/2013). Pro účely čl. 32 odst. 6 nařízení (EU) č. 1307/2013 je způsobilost plochy využívané pro produkci konopí vázána na použití osiva odrůd uvedených ve „Společném katalogu odrůd druhů zemědělských rostlin“ dne 15. března roku, pro který je poskytnuta podpora, a zveřejněných podle článku 17 směrnice Rady 2002/53/ES. Do Unie se mohou dovážet semena odrůd konopí určená k výsevu, u kterých je prokázáno, že obsah tetrahydrokanabinolu v dané odrůdě nepřesahuje hodnotu stanovenou podle čl. 32 odst. 6 a čl. 35 odst. 3) nařízení (EU) č. 1307/2013.

Pro jednoznačné ověření odrůdové deklarace byl vyvinut postup založený na analýze polymorfismu DNA s využitím délkového polymorfismu krátkých opakujících se sekvencí, které jsou součástí každého genomu. Ten odráží genetickou diverzitu v rámci skupiny technického konopí pěstovaného na území ČR.

Analýza genetické diverzity rostlin obecně vyžaduje metody, které jsou spolehlivé a reprodukovatelné. Tyto vlastnosti splňují DNA markery (Nybom, 2004)). Existuje více typů DNA markerů většinou založených na amplifikaci vybraných úseků DNA (RAPD, SSR, AFLP, EST_SSR), hybridizaci DNA sekvencí (Southernova hybridizace), sekvenování (podle

Sangera, NGS). Markerovací systémy se odlišují v obsahu množství informací, počtu výsledných polymorfismů, stupni automatizace, pracnosti, opakovatelnosti a výši finančních nákladů (Čurn a Žaludová 2007). Jednotlivé aspekty byly zváženy a po jejich vyhodnocení byla zvolena s přihlédnutím k vlastním experimentálním výsledkům metoda využívající délkového polymorfismu krátkých opakujících se sekvencí tzv. mikrosatelitů (SSR z angl. single sequence repeats).

Metodika je výsledkem výzkumu, nově umožňuje odlišit jednotlivé odrůdy konopí povolené pro pěstování v ČR, a to u vzorků odebraných z jakýchkoliv částí rostlin bez ohledu na vegetační období a to i ze suchých materiálů. Nově byl sestaven soubor SSR primerů, který takové rozlišení nově umožňuje.

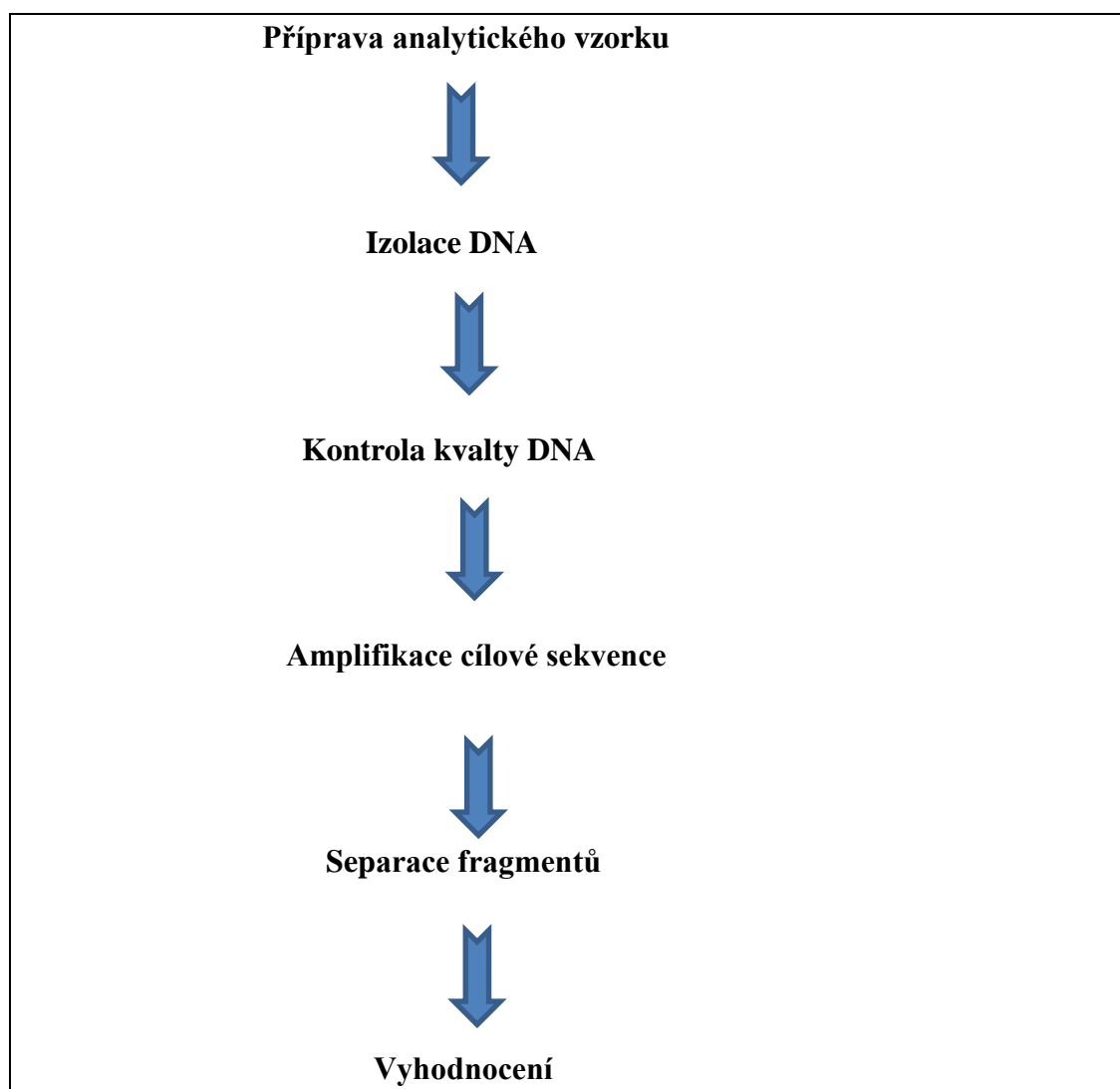
II.2 Délkový polymorfismus mikrosatelitů

Mikrosatelit je úsek opakující DNA, ve kterém se některé DNA motivy (v délce od 2 do 13 párů bází) opakují, typicky 5-50 krát. Genomy eukaryontů, včetně rostlin, obsahují velké množství takových repetitivních DNA sekvencí (Morgante, 1993; Kejnovsky 2009; Li, 2015). Mikrosatelity se vyskytují v tisících míst v genomu a dobře odrážejí genetickou odlišnost (Brinkmann et al. 1998). Tyto sekvence mají nejvýznamnější dopad na velikost genomu (Cermak, 2008). Jejich využití pro analýzu diverzity a jednoznačné určení druhové příslušnosti a odrůdové deklarace je široce využíváné.

Pro charakterizaci délkového polymorfismu mikrosatelitů DNA se obvykle využívá jejich amplifikace (namnožení úseků DNA) během PCR reakce s využitím unikátních sekvencí oligonukleotidů (primerů). Sekvence primerů odpovídá sekvencím DNA, které ohraničují mikrosatelitní oblast. Dostatečně purifikovaná DNA z analyzovaného organismu, souboru linií, odrůd je opakovaně denaturována aby došlo k separaci obou řetězců DNA, pak se ochladí a dojde k připojení primerů a s využitím *Taq* polymerázy se kopíruje úsek analyzované DNA ve fázi označované jako prodloužení řetězce. Takto je možné získat dostatečné množství amplikonů (kopií sekvence nukleotidů) pro jednotlivé SSR lokusy, které jsou následně separovány podle své délky a vizualizovány. Vizualizace se provádí více způsoby, v současné době je nejvýznamnější a nejrozšířenější vizualizace po separaci fragmentů opatřených fluorescenční značkou v kapilární elektroforéze Základní schéma analýzy Obr. 1).

Využití postupu bylo popsáno u řady rostlinných druhů (Varschney et al. 2005). Validace pak spočívá v opakovaných analýzách identických materiálů k ověření robustnosti a opakovatelnosti metody.

Obr. 1 Základní schéma analýzy odrůdové pravosti konopí a hodnocení variability



II.3 Příprava analytického vzorku

Pro analýzu lze použít rostlinný materiál z jednotlivých rostlin nebo směsný vzorek, tj. souhrnný vzorek připravený z dílčích vzorků. Není předmětem této metodiky uvádět způsob vzorkování a přípravu směsného vzorku.

Laboratorní vzorek je vzorek určený k laboratorním zkouškám, určený k zaslání do smluvní laboratoře. Není předmětem této metodiky uvádět způsob vzorkování a přípravy laboratorního vzorku. Laboratorní vzorek, musí být pro zkoušky do laboratoře předán tak, aby nedošlo k případnému ovlivnění výsledků zkoušek nevhodným zacházením se vzorkem při skladování a dopravě.

Z laboratorního vzorku je v laboratoři po homogenizaci a dělení připraven analytický vzorek, jehož hmotnost je minimálně 100 – 200 mg.

II.4 Izolace DNA

Pro izolaci kvalitní DNA je možné použít jak listy, květenství, semena, tak i suché části rostliny. U listů je vhodné použít mladé listy. Materiál je uchováván v PE zipových sáčkách nebo jsou listy zabaleny do alobalu a uchovávány při teplotě -20°C nebo je lze ihned zpracovat. Vzorky jsou doplněny popisem odrůdy a datem, příp. popisem lokality/místa odběru. (složení roztoků, reagentie a činidla, přístrojové vybavení je uvedeno v části II-10)

Pro izolaci nukleových kyselin všeobecně je k dispozici škála metod, kde je prvním krokem narušení buněk rostlinného pletiva. Pro desintegraci rostlinných buněk konopí musí být použita nějaká forma mechanické síly, např. drcení tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce.

Pro uvolnění DNA z buněk se obecně používají detergenty (SDS – dodecylsulfát sodný, CTAB cetyltrimethylamonium bromidem). K lyzátu je přidána směs chloroformu a izoamylalkoholu. Chloroform je organické rozpouštědlo a nemísí se s vodným roztokem buněčného lyzátu, takže se směs rozdělí na dvě fáze – horní vodnou a dolní chloroformovou. Roztok je odstředěn a na rozhraní mezi fázemi se vytváří bílý prstenec precipitovaných proteinů. Horní vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny.

Z vodného roztoku je DNA precipitována přidáním koncentrovaného vymraženého etanolu. S nukleovými kyselinami se srážejí i soli, které je potřeba odmyt 75% etanolem. Purifikovaná DNA je po vysušení rozpuštěna ve vodě nebo v TA pufru.

II.5 Analýza kvality a kvantity DNA

Pracovní postup analýzy DNA (složení roztoků, reagentie a činidla, přístrojové vybavení je uvedeno v části II.10)

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• navážit 100 – 200 mg homogenizovaného vzorku do 2 ml mikrozkušky |
| <ul style="list-style-type: none">• přidat 400 µl sterilované deionizované vody, ihned po přidání jednotlivé vzorky jemně promíchat sterilní kličkou a ponechat 5 min. rehydratovat |
| <ul style="list-style-type: none">• přidat 1,3 ml přehřátého na 65°C CTAB extrakčního pufru a vortexovat |
| <ul style="list-style-type: none">• přidat 10 µl RNázy A a opatrně promíchat. Inkubovat 30 min. při teplotě 65°C v blokové lázni za stálého opatrného míchání (nebo každých 10 min. promíchat převrácením mikrozkušky) |

<ul style="list-style-type: none"> • přidat 10 µl roztoku proteinázy K, jemně promíchat a nechat inkubovat 30 min. při teplotě 65°C za stálého opatrného míchání (nebo každých 10 min. promíchat převrácením mikroskopické kumavky)
<ul style="list-style-type: none"> • centrifugace v odstředivce 10 min. při 12000 ot./min.
<ul style="list-style-type: none"> • přenést po cca 600 µl supernatantu do 2 nových 2 ml mikroskopických kumavek, přidat totožný objem směsi chloroform : isoamylalkohol = 24 : 1 a cca. 1 minutu silně třepat
<ul style="list-style-type: none"> • centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min. Přenést horní (vodnou) fázi do nové 2ml mikroskopické kumavky
<ul style="list-style-type: none"> • přidat 2 objemy CTAB precipitačního pufru
<ul style="list-style-type: none"> • inkubace 60 min. při laboratorní teplotě bez jakéhokoli míchání
<ul style="list-style-type: none"> • centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min.
<ul style="list-style-type: none"> • pipetou odstranit supernatant (popř. opatrně vylít) – pelet nemusí být viditelný
<ul style="list-style-type: none"> • rozpustit precipitovanou DNA přidáním 450 µl roztoku NaCl a opatrně pipetou promíchat (nebo převrácením mikroskopické kumavky)
<ul style="list-style-type: none"> • přidat 450 µl směsi chloroform : isoamylalkohol = 24 : 1 a cca. 1 min. důkladně míchat (třepat rukou)
<ul style="list-style-type: none"> • centrifugace v odstředivce 20 min. při 12000 ot./min.
<ul style="list-style-type: none"> • přenést horní vodní fázi do nové 1,5 ml mikroskopické kumavky
<ul style="list-style-type: none"> • přidat 0,6 objemu isopropan-2-olu, jemně promíchat převrácením mikroskopické kumavky a nechat inkubovat 20 min. při laboratorní teplotě
<ul style="list-style-type: none"> • centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min.
<ul style="list-style-type: none"> • odstranit supernatant
<ul style="list-style-type: none"> • přidat 500 µl roztoku ethanolu a několikrát převrácením mikroskopické kumavky promíchat (toto je nejdůležitější krok dokončující kompletní odstranění CTAB)
<ul style="list-style-type: none"> • centrifugace v odstředivce 10 min. při 12000 ot./min.
<ul style="list-style-type: none"> • odstranit supernatant opatrnou dekantací roztoku
<ul style="list-style-type: none"> • vysušit pelet DNA při laboratorní teplotě (cca.30min.) a znovu rozpouštět ve 100 µl TE pro PCR při teplotě 4°C min. 24hodin.

II.6 Kontrola kvality DNA

Kvalita izolované DNA, která je pro další analýzy klíčová, se stanovuje separací na **agarózovém gelu** (fragmentace a hrubý odhad kvantity) a **spektrofotometricky** (kvantita, kvalita, zastoupení interferujících látek).

Pracovní postup kontroly kvality DNA (složení roztoků, reagentie a činidla, přístrojové vybavení je uvedeno v části II.10).

Spektrofotometrické stanovení

Podle počtu vzorků se připraví navážka agarózy. Pro objem 70ml 1xTAE je navážka agarózy 0,56 g a objem přidaného ethidium bromidu 0,7 μ l.

<ul style="list-style-type: none">• na analytických vahách se naváží na váženice potřebné množství agarózy
<ul style="list-style-type: none">• navážená agaróza se převede do Erlenmayerovy baňky a zalije se potřebným objemem 1 x TAE pufru a v mikrovlnné troubě se roztok přivede k varu
<ul style="list-style-type: none">• baňka se postaví na elektromagnetickou míchačku a vloží se do ní míchadélko. Když teplota roztoku v baňce klesne na cca 60°C, přidá se k roztoku agarózy požadovaný objem ethidium bromidu a roztok se nechá ještě cca 1 minutu míchat
<ul style="list-style-type: none">• tekutý roztok agarózy se nalije do formy na gel ve které je hřebínek a nechá se vychladnout
<ul style="list-style-type: none">• po vychladnutí a ztuhnutí gelu se opatrně vyjme hřebínek, v gelu zůstanou jamky pro nanášení vzorků

Vzorky se na připravený gel nanesou podle následujícího pracovního postupu:

<ul style="list-style-type: none">• z roztoku izolované DNA se odebere 1 μl, k ní se přidá 7 μl sterilní deionizované vody a 3 μl 6 x Loading Dye Solution
<ul style="list-style-type: none">• připravený elektroforetický gel se vloží do elektroforetické vany a převrství se (cca 5 mm) 1 x TAE puftrem
<ul style="list-style-type: none">• do první a poslední dráhy se nanese 6 μl délkového standardu DNA Ladder HIND III a do dalších drah se nanáší vždy 11 μl každého vzorku
<ul style="list-style-type: none">• elektroforéza probíhá cca 60 – 90 minut při 30 V

Spektrofotometrické měření koncentrace extrahované DNA

<ul style="list-style-type: none">• po ukončení elektroforézy se gel vizualizuje pomocí UV záření ve fotodokumentačním zařízení. Srovnáním pozice DNA s pozicí délkového standardu je pak určena délka produktu a stupeň jeho degradace.
--

- Koncentrace DNA vzorku je měřena spektrofotometrem. Optimální koncentrace pro další analýzy je 50 ng/μl. Vyšší koncentrace DNA se ředí TE pufrem. Čistota izolované DNA z hlediska kontaminace bílkovinami se získá změřením poměru absorbcí při vlnových délkách 260 a 280 nm (A_{260}/A_{280}), při které mají absorpční maximum bílkoviny. Hodnota tohoto poměru je optimální, pokud se pohybuje v rozmezí 1,7-1,9.

Vzorky DNA jsou naředěny H₂O na pracovní koncentraci 50 ng/μl a použity pro další analýzy.

II.7 Amplifikace cílové sekvence mikrosatelitu

Cílová sekvence (SSR) se amplifikuje ze specifického lokusu genomu analyzovaného materiálu pomocí fluorescenčně značených primerů (viz. Tab. 3) a *Taq* polymerázy v cyklické reakci. Obvykle se připraví reakční směs sestávající z tzv. mastermixu a cílové DNA.

Mastermix pro SSR reakci je připraven z chemikálií, které jsou uvedeny níže. Celkově je připraveno množství, které odpovídá předpokládanému počtu analyzovaných vzorků. Při výpočtu příslušných objemů je potřeba počítat také s malou rezervou na ztráty při pipetování. Po smíchání všech složek je mastermix rozpipetován v objemu 14 μl do tenkostěnných mikrozkušavek a do každé z nich je posléze přidán 1 μl roztoku genomické DNA analyzované odrůdy (koncentrace 50 ng /μl). Složení reakční směsi, viz. Tab. 1

Tabulka 1 Složení reakční směsi pro amplifikaci specifických SSR ampliconů

Komponenta	Objem (μl)
Pár SSR primerů (5μM)	1,0
puf (BioTools)	1,5
MgCl ₂ (15mM)	0,6
dNTP(2,5uM)	1,0
Tth polymeráza (BioTools) (5U/μl)	0,2
DNA (templát) – 50 ng/μl	1
H ₂ O	9,7
Celkový objem	15

Mikrozkušavky jsou po naplnění reakční směsí protřepány a centrifugovány. Pak jsou umístěny například do termocykleru Veriti™ Thermal Cycler nebo jakéhokoliv ekvivalentního. PCR reakce sestává z následujících kroků (Tabulka 2):

Tabulka 2: Teplotní profil a trvání jednotlivých kroků amplifikační reakce

Krok:	Teplota (°C)	Čas (s)
1. Aktivace polymerázy	95	300
2. Amplifikace		

-denaturace	95	5
- nasedání	Uvedeno v tab. 3 pro jednotlivé SSR primery	30
- prodlužování		
Opakuje se 35x	72	40
Dokončení amplifikace	72	600
Uskladnění	4/-20	přes noc/do zpracování

Tabulka 3: Přehled analyzovaných SSR lokusů, sekvence primerů specifických pro jednotlivé lokusy, teplota nasedání primerů (T), délka klonovaného mikrosatelitu (D), literární odkaz

Název SSR markeru	Sekvence primerů (5'-3') a použitý fluorofor		Annealingová teplota T (°C)	Velikost klonované alely D (bp)	Autoři
ANUCS206	F	FAM* - TCCAATAAGATTTACAGTCG	54	167	Gilmore and Peakall (2003)
	R	TAACGGGTTCTTTGGGTATT			
ANUCS501	F	NED- AGCAATAATGGAGTGAGTGAAC	54	90	Gilmore and Peakall (2003)
	R	AGAGATCAAGAAATTGAGATTCC			
ANUCS306	F	NED- ACTATTACTAAGCCTCCTCATCA	54	95	Gilmore and Peakall (2003)
	R	GTGGTAGTCTCATTGTTGGTG			
ANUCS303	F	FAM-TAATCAACAATGACAATGGC	52	147	Gilmore and Peakall (2003)
	R	GATTAAGGTCCTCGACGATA			
ANUCS308	F	VIC-AGATGGTGTGGGTATCTTT	54	186	Gilmore and Peakall (2003)
	R	TGGTGCAGGTTTATACAATTT			
1528	F	FAM- TTGTCTAGTGCCTTTGTCATGC	58	285	F primer: Valverde et al. 2014; R primer: Kučera L.
	R	TCATGAGTACTTGGCTGATGATGG			
3735	F	VIC- TGTCCTTAGCTAGTTGATTCTGTG	60	75	Kučera L.
	R	ATCGCACCCACAGGTTAGTA			
5159	F	NED-CCAGAGCTTGTGGATCTCCT	58	325	Valverde et al. 2014; F primer upraven
	R	AGTACGAAAGGGCACTGAGG			
9043	F	NED- AAGCTCGATGTCATCTCTACAC	60	175	Valverde et al. 2014
	R	TGCTCAATGCCTTATTCATGCT			
9269	F	VIC-CCCAAACACTGTTTGTGCC	60	121	Valverde et al. 2014; R primer upraven
	R	TTGCACGTGATGTTAGATCC			

CAN0051	F	FAM-AGGAACCCAAAAGAGCTGAGAG	60	293	Gao et al. 2014, F primer upraven, R pimer upraven
	R	TCAGCAAGGTGAGTACACGG			
CAN0026	F	FAM-AGGAGCAGAACAAAATGGAG	60	225	Gao et al. 2014
	R	TAAACCGGGTCAACCATACT			
CAN0009	F	VIC-TCCAAACCCAACAACAAC	60	120	Gao et al. 2014, F upraven, R upraven
	R	TCGATCAAGCCATGAGAGTT			
CAN0033	F	FAM-CTCACTGAACGAACGATTTG	60	290	Gao et al. 2014, R primer upraven
	R	CAGTTGGACTACTCTCGCT			

* - použitý fluorofor (FAM: 6-karboxyfluorescein; VICTM; NEDTM)

II.8 Separace fragmentů

Analýza PCR produktů kapilární elektroforézou

Při studiu mikrosatelitních oblastí genomu konopí je analyzováno celkem 14 lokusů. Produkty amplifikace jsou separovány elektroforeticky metodou kapilární elektroforézy například na přístroji ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) pro stanovení jejich délky.

Příprava vzorků pro fragmentační analýzu:

Před separací v kapilární elektroforéze je třeba vzorky denaturovat. Do mikrodestičky se do každé jamky napipetují níže uvedené komponenty (Tabulky 4)

Tabulka 4: Složení denaturační směsi pro analýzu vzorků v kapilární elektroforéze

Komponenty reakční směsi	Objem (μl)
Formamid	10
LIZ500 Size Standard	0,5
3 PCR produkty, každý o objemu	0,5

Tři produkty PCR označené odlišnou fluorescenční značkou mohou být pipetovány do shodné zkumavky, podle tab. 3. Vzorky se před analýzou denaturují inkubací 7 minut při teplotě 94 °C a následně rychlým zchlazením na teplotu 4°C.

Analýza PCR produktů v přístroji ABI PRISM 3130

Jako interní velikostní standard se používá LIZ 500 pro kombinaci primerů fluorescenčně značených (6-FAM, VIC, NED). Vzorky pro analýzu jsou připravovány do jamek destiček (určených pro použití v přístroji ABI PRISM 3130).

Přístroj je pro fragmentační analýzu připraven podle návodu výrobce, jeho popis není předmětem této metodiky. Kapilára naplněna odpovídajícím polymerem dle návodu výrobce a přístroj je nastaven na analýzu fragmentů. Záznamy se zapisují v paměti řídicího počítače.

II.9 Vyhodnocení elektroforetogramů

Profily SSR markerů, resp. délky amplifikovaných úseků v počtu bází, se zaznamenávají během analýzy v PC. Po analýze se zkontroluje kvalita signálů (min. výška stanovena pro individuální lokusy podle popisu výrobce). Po kontrole se vyhodnocují profily pomocí specializovaného programu GeneMapper v 3.7. nebo ekvivalentním programem. Výsledkem analýzy jsou údaje o velikosti jednotlivých fragmentů udávané v párech bází. Primární data se dále převádějí do binární matice a statisticky se zpracovávají pro odhad diverzity vhodným programem (DARwin, PCA). Pro hodnocení odrůdové deklarace se ztotožňují profily vzorku s profily známých standardů (referenčních odrůd).

II.10 Potřebné technické vybavení a činidla

Analytická váha
Fotodokumentační zařízení
Elektromagnetické míchadlo
Eppendorf Thermomixer
Erlenmayerova baňka, 500 ml
Ethidium bromid
Hřebínek do elektroforetické vany a forma na gel pro elfo
Centrifuga s otáčkami min. 11000 otáček/min
Chladnička
Laboratorní parní sterilizátor
Magnetická míchačka
Mikropipety
Mikrovlnná trouba
Mrazicí box (-20°C, -80°C)
Odměrný válec, 500 ml
Ochranné gumové rukavice bez pudru
PCR destičky vč. víček či folie
pH-metr
Skleněné háčky na zachycení DNA
Stolní minicentrifuga
Spektrofotometr
Špičky na automatické pipety
Termocykler pro PCR Veriti™ Thermal Cycler
Třecí misky a tloučky
Váženky
Vortex
Zařízení na horizontální elektroforézu
Zdroj k elektroforézám

0,2 ml sterilní zkumavky

1,5 a 2 ml sterilní zkumavky
6 x Loading Dye Solution

Přístroj na kapilární elektroforézu ABI3130 (Applied Biosystems) a program na vyhodnocení dat GeneMapper

Pro izolaci a amplifikaci DNA jsou potřebné následující roztoky a chemikálie:

- Agaróza
- tekutý dusík
- ❖ **CTAB EXTRAKČNÍ PUFŘ:**

10 g CTAB
41g NaCl
7,875 g Tris- HCl
3,75 g Na ₂ EDTA
vše se doplní do objemu 500 ml H ₂ O, pH roztoku se upraví na 8

- ❖ **CTAB PRECIPITAČNÍ PUFŘ:**

2,5 g CTAB
1,25 g NaCl
vše se doplní do objemu 500 ml H ₂ O, pH roztoku se upraví na 8

- 1,2 M NaCl:

7 g NaCl se rozpustí v 100 ml deionizované vody

- 20 mg/ml Proteinase K:

20 mg Proteinase K se rozpustí v 1 ml sterilní deionizované vody.

- 10 mg/ml RNase A:

10 mg RNase A se rozpustí v 1 ml sterilní deionizované vody

- ❖ **TE PUFŘ:**

10 mM Tris 2,5 ml	1 M roztoku o pH 8,0
1 mM EDTA 0,5 ml	0,5 M roztok o pH 8,0
H ₂ O	do 250 ml

- směs chloroform: isoamylalkohol (24:1)

- 99 % roztok isopropanolu - vymražený
- 70 % roztok etanolu

❖ **1 x TAE PUFŘ**

TRIS báze (s) 4,8 g	0,48% roztoku
ledová CH ₃ COOH 1,5 ml	0,5M
EDTA (pH = 8,0) 2,0 ml	1mM roztok
H ₂ O	do1000ml

- Velikostní standard λ HindIII (Fermentas), vč. nanášecího pufru
- RNáza A
- Syntetické oligonukleotidy - primery specifické pro daný druh rostliny (viz Tabulka č.3)
- dNTP
- Tth polymeráza vč. pufru a MgCl₂ (Biotools)
- Ultra Pure H₂O pro PCR
- Formamid
- LIZ500 délkový standard

III. ZHODNOCENÍ FINANČNÍ, ČASOVÉ A KAPACITNÍ NÁROČNOSTI

Pracovní postup zahrnuje extrakci DNA, PCR reakce a následnou detekci velikosti produktů pomocí fragmentační analýzy. Časově a pracovně náročná je extrakce DNA použitím CTAB metody, ale je levnější než extrakce použitím kitu. Fragmentační analýza 14 mikrosatelitních lokusů u 20 vzorků konopí (dvě paralelní izolace DNA ze vzorku; negativní kontroly; referenční vzorky; počet pozic v PCR destičce: 96), trvá cca 7-14 dnů. Výsledky fragmentačních analýz jedné destičky jsou k dispozici za 24 hod. Odborně náročnější část analýz představuje vyhodnocení výsledků, které zahrnuje identifikaci a vyhodnocení přítomnosti amplikonů (alel SSR lokusů) programem GeneMapper 3.7 a následné porovnání se vzorníkem alel referenčních odrůd zkušeným pracovníkem. Cena analýzy jednoho vzorku konopí všemi markery, včetně izolace DNA a analýzy v přístroji ABI PRISM 3130, činí přibližně 10.000,-Kč (zahrnuje DPH). Ceny analýz ovlivňuje kurz US dolaru, aktuální ceny chemikálií a spotřebního materiálu a počtu analýz v jedné sérii.

Pro zavedení metodiky do praxe je třeba počítat s náklady na verifikaci metody na daném pracovišti. Náklady na izolaci DNA 50 vzorků 5000 Kč, standard pro analýzu 20 000 Kč, náklady na pořízení SSR primerů 42 000 Kč, náklady na analýzu vzorku ve stroji 23 000 Kč a na ostatní materiál. Primery, analýza ve stroji jsou materiály, které se na verifikaci nezužijí všechny a mohou být použity v následných analýzách. Jejich množství závisí na nutnosti opakování některých analýz při zavádění metody. Náklady na zavedení metody bez započtení osobních nákladů, které se mohou lišit a lze je odhadnout na 100 000 Kč.

IV. PŘEDNOSTI METODY A MOŽNOSTI RUTINNÍHO VYUŽITÍ

Předností metody analýzy mikrosatelitů je, že je dobře aplikovatelná pro rutinní využití a má vysokou mírou reproducibility. SSR markery se ukázaly být přesné a vykazující stejné výsledky při jednotlivých opakováních experimentu, což potvrzují i někteří autoři (Jones et al., 1997), kteří sledovali reprodukovatelnost metod založených na DNA markerech, i naše výsledky (Mitrová et al. 2017, *v tisku*).

Analýza mikrosatelitů se používá rutinně ve forenzní diagnostice (Gilmore et al. 2003; Štambuk et al. 2007), ověřování původu zvířat (Marikar et al. 2014; Saberivand et al. 2011; Tupac-Yupanqui et al. 2010) a je doporučena i pro hodnocení odrůdové pravosti rostlin (Iqbal et al. 2010; Iquebal et al. 2013; McGregor et al. 2000).

Zatím nebylo možné validovanou metodou hodnotit příslušnost k jednotlivým odrůdám technického konopí pěstovaných v ČR a to nejen v polních hodnocení, ale z jakékoliv části rostlinného materiálu, osiva.

Předložená metodika přináší validovaný postup upravený pro posouzení genetické příbuznosti povolených odrůd, hodnocení genetických zdrojů a šlechtitelských materiálů konopí.

V. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Technologický pokrok v oblasti molekulární genetiky umožnil výzkumnému týmu navrhnout DNA markery (SSR markery) vhodné pro charakterizaci vnitrodruhové genetické diverzity.

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy SSR markerů u odrůd konopí. Výstupem analýzy jsou pak amplifikované fragmenty DNA (délkové alely SSR markerů), které se použijí pro charakterizaci jednotlivých vzorků, stanovení genetické diverzity, anebo určení odrůdové pravosti u konopí setého.

Uživateli této metodiky mohou být orgány státní správy (ÚKZÚZ, SZPI), kontrolní a soukromé laboratoře v ČR, stejně jako pěstitelé konopí. Je možné ji využívat v běžných molekulárně-genetických laboratořích a to jak v akreditovaném systému, tak pro výzkumné a vývojové účely.

VI. EKONOMICKÉ PŘÍNOSY

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice v zařízené laboratoři jsou akceptovatelné. Jedná se o náklady na reagenty, enzymy, plasty nebo fluorescenčně značené (300 Kč na reakci a jeden SSR marker). Náročnější mohou být nároky na verifikaci metody, celkový odhad 1000 Kč na primerový pár a dále náklady na akreditaci metody ve zkušebních laboratořích (poplatky akreditačnímu orgánu).

Uživatel získá ekonomický přínos (1) za komerční provádění analýz laboratořemi (5000 Kč/vzorek), (2) dovozci, prodejci osiv, farmáři i výkup za confirmaci odrůdové deklarace u partií osiva a produktu. V tomto případě jde především o snížení rizika ztrát v důsledku postihů ze strany státních orgánů při použití neschválených odrůd. V tomto případě jde především o snížení rizika ztrát v důsledku postihů ze strany státních orgánů při použití neschválených odrůd (pokuty 100 000 Kč dle §37 pís.a) až 1 000 000 Kč dle §37 pís.b) zákona č.167/1998 Sb.) i snížení ztráty z vypěstované, ale neuplatněné produkce (23 000 Kč/ha).

Je zřejmé, že zavedení postupu pro kontrolu produkce konopí je vysoce významné.

VII. POUŽITÁ A DALŠÍ DOPORUČENÁ LITERATURA

Brinkmann B, Junge A, Meyer E, Wiegand P.(1998) Population genetic diversity in relation to microsatellite heterogeneity. *Hum Mutat.* 11:135–144.

Cermak T., Kubat Z., Hobza R., Koblizkova A., Widmer A., Macas J. (2008): Survey of repetitive sequences in *Silene latifolia* with respect to their distribution on sex chromosomes. *Chromosome Res.*, 16:961–976.

Čurn V. Žaludová (2007). Fingerprinting of Oilseed Rape Cultivars. In: Gupta S. (ed.): *Rapeseed Breeding. (Advances in Botanical Research, Volume 45)*. Elsevier Publ., pp. 155-179.

Gilmore S., Peakall R., Robertson J. (2003): Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations. *Forensic Science International*, 131: 65-74.

Hájková P., Hrubý J., Pernová E., Čurn V., Žaludová J. (2005). Monitoring pěstebních ploch, přenos a detekce transgenů geneticky modifikované řepky olejky (*Brassica napus* L. var. *napus*). *Sborník vědeckých prací VÚP Troubsko* 15: 93-100.

Iqbal A., Sadaqat H.A., Khan A.S., Amjad M. (2010): Identification of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae) hybrids using simple-sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*, 10 (1): 102-106.

Iquebal A., Sarika , Arora V., Verma N., Rai A., Kumar D. (2013): First whole genome based microsatellite DNA marker database of tomato for mapping and variety identification. *BMC Plant Biology*, 13:197.

Jones C. J., Edwards K. J., Castaglione S., Winfield M. O., Sala F., van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevski

Kejnovsky E, Hobza R, Kubat Z, Cermak T, Vyskot B (2009) : The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity*, 102:533–541.

Marmiroli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A and Karp A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3:381–390

Marshall P.J., Marchand M.C., Lisieczko Z., Landry B.S. (1994). A simple method to estimate the percentage of hybridity in canola (*Brassica napus*) F1 hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 89: 853-858.

McGregor C.E., Greyling M.M., Warnich L. (2000): The use of Simple Sequence Repeats (SSRs) to identify commercially important potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars in South Africa. *South African Journal of Plant and Soil*, 17, 4.

Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993): PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175-182.

Nybom H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants, *Molecular Ecology*, 13, 1145 - 1157

Shah, V. P., Midha, K. K., Findlay, J. W., Hill, H. M., Hulse, J. D., McGilveray, I. J., ... & Tonelli, A. (2000). Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical research*, 17(12), 1551-1557.

Staub J. E., Serquen F. C., Gupta M. (1996): Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. In: *HortScience*, vol. 31, p. 729-741.

Tupac-Yupanqui I., Martínez A., Méndez S., Delgado J.V., Gómez M., Dunner S., Cañón J. Schulz U., (2010): The Canarian Camel: A Traditional Dromedary Population. *Diversity*, 2: 561-571.

Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Elsevier - *TRENDS in Biotechnology*.

VIII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE, NEBO JSOU PUBLIKOVÁNY

Pavel J., Kučera L., Ovesná J. (2017) : Využití SSR markerů pro hodnocení odrůdové pravosti konopí setého. Úroda 12/2017 věd. příloha, *in press*