

Metodika pro rozlišení rýže (*Oryza sativa* L.) typu Basmati pomocí délkového polymorfismu mikrosatelitů

Jaroslava Ovesná, Lenka Drábková, Ladislav Kučera



METODIKA PRO PRAXI



Metodika byla vypracována pracovníky týmu Molekulární genetiky VÚRV, v.v.i. Vznikla za finanční podpory Mze ČR a je výstupem řešení projektu: MZE/ QJ1530272 – Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba-spotřebitel a výzkumného záměru MZE RO0416

Autoři: Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.

Ing. Lenka Drábková

Ing. Ladislav Kučera, CSc.

Kontakt na autory:

ovesna@vurv.cz, drabkova@vurv.cz, kuceral@vurv.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., 2017

ISBN 978-80-7427-239-4

Metodika pro rozlišení rýže (*Oryza sativa* L.) typu basmati pomocí délkového polymorfismu mikrosatelitů

Předmětem metodiky je postup identifikace tradičních odrůd rýže typu Basmati (TB) uvedených v prováděcím nařízení komise EU č. 706/2014 ze dne 25. června 2014. pomocí analýzy délkového polymorfismu mikrosatelitů (SSR- Single Sequence Repeats) laboratořemi v praxi. Tato metoda umožní identifikovat vybrané odrůdy rýže typu Basmati i odrůdy odlišných typů rýže. Podstatou zkoušky je amplifikace úseků genomu obsahující daný mikrosatelitní lokus pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se specifickými primery a následná analýza délky produktů.

Method for authentication Basmati type rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite length polymorphism

(Assay for distinguishing basmati from non-basmati rice varieties)

The objective of the method is the procedure how to identify traditional varieties of Basmati rice (TB) specified in the Implementing Regulation EU no. 706/2014 devoted to control laboratories in practice. This method enables to identify varieties exempt from duty in the EU. The test consists of microsatellite loci amplification by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers, and subsequent analysis of the length of the products.

Oponenti: Doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, PhD.

Ing. Romana Hamrlová, SZPI Brno

Metodika byla schválena odborem výzkumu MZe pod č.j. xxxxxxx ze dne xxxxxx

Ministerstvo zemědělství doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

Obsah:

	strana
I. Úvod a cíl metodiky	5
II. Vlastní popis metodiky	6
2.1 Podstata metody	6
2.2 Potřebné technické vybavení	7
2.3 Pracovní postup a vyhodnocení experimentálních dat	9
III. Srovnání „novosti postupů“	13
IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky	14
V. Ekonomické aspekty	14
VI. Seznam použité související literatury	15
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice	18
Přílohy 1, 2	19

I. Úvod a cíl metodiky

Rýže je celosvětově významná plodina z rodu lipnicovitých (*Poaceae*) rostlin. Rod rýže (*Oryza*) zavedl v roce 1753 Carl Liné poté, co popsal druh rýže seté (*Oryza sativa* L.). Později bylo popsáno více než 100 druhů rýže. Hospodářský význam má rýže setá (*Oryza sativa* L.) a rýže africká (*Oryza glaberrima* Staud.), též nazývaná rýže červená.

Existují stovky odrůd rýží. Mezi elitní rýže patří aromatická rýže typu Basmati, která se pěstuje na úpatí Himalájí v Indii a Pakistánu. Basmati rýže má typické aroma, které připomíná vůni listů pandanu (*Pandanus amaryllifolius*). Základem je sloučenina 2-acetyl-1-pyrrolinu (1-(3,4-dihydro-2H-pyrrol-5-yl)ethan-1-one). Jeho zvýšený obsah je u rýže dán především přítomností mutací v genu *BDH2*, kódujícím betaine aldehydu dehydrogenázu.

V Indii bylo v roce 2012 registrováno 16 odrůd rýže Basmati. Basmati rýže je dražší než jiné typy či odrůdy rýží a v rámci EU jsou vybrané tradiční odrůdy rýže Basmati (TB) osvobozeny od cla (prováděcí nařízení komise EU č. 706/2014 ze dne 25. června 2014). Proto často dochází k falšování této komodity.

Z výše uvedených důvodů je třeba disponovat metodami, které umožní stanovit odrůdovou pravost rýže typu Basmati, a tím je i odlišit od jiných, rovněž dlouhozrnných, aromatických odrůd rýže. K ověřování pravosti Basmati rýže lze obecně využívat morfologické markery, které jsou však při kontrolách komodity nepraktické (délka a šířka obilky, délkové změny a struktura po uvaření, aroma) nebo molekulární proteinové markery, které zatím nebyly v Evropě zavedeny. Všeobecně se uvádí, že nejpřesnější a spolehlivé pro ověření pravosti odrůd jsou postupy, které využívají polymorfismus DNA (DNA fingerprinting), jako například analýza délkového polymorfismu krátkých opakujících se sekvencí tzv. mirosatelitů (SSR) (Agarwal *et al.* 2008; Tomar *et al.* 2013; Hoshino *et al.* 2012).

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující úseky DNA nejčastěji o délce 2-6 párů bazí. Vyznačují se následujícími vlastnostmi (Vejl *et al.* 2002): vykazují vysoký stupeň polymorfismu, jsou relativně rovnoměrně zastoupené po celém genomu, jsou kodominantní. Běžně jsou pro mikrosatelity používány zkratky STRs (short tandem repeats; Edwards *et al.* 1991), SSR (simple sequence repeats; Tautz 1989; Morgante a Olivieri 1993). Členění a kategorie repetitivní DNA (Chambers *et al.* 2000): satelity (Satellites), minisatelity (Minisatellites), mikrosatelity (Microsatellites). Mikrosatelity se nacházejí v celém genomu eukaryotických i prokaryotických organismů (Field a Wills 1998; Tóth *et al.* 2000), nejvíce

pak v jeho nekódujících oblastech (telomery, subtelomery, heterochromatin, centromer) (Metzgar *et al.* 2000). Využití mikrosatelitů je velmi široké. Mikrosatelity se jeví jako hypervariabilní a kodominantní markery (Sunnuck 2000). Jako kodominantní markery relativně malé velikosti jsou jednoduše amplifikovány během PCR reakce. Výhodou diagnostiky polymorfismu SSR lokusů pomocí PCR je, že vyžaduje minimální množství DNA a analýzy lze provádět v multiplexu, takže je i finančně únosná (de Vienne *et al.* 1998).

Cílem metodiky bylo pro potřeby kontroly ověřit a sestavit soubor mikrosatelitních markerů použitelných pro jednoznačnou identifikaci vybraných typů rýže, především dlouhozrnných aromatických rýží typu Basmati. Metodika vychází také ze znalosti, které již byly publikovány (Ovesná *et al.* 2001, Ovesná *et al.* 2014, Aidarova, 2016).

II. Vlastní popis metodiky

2.1 Podstata metody

Izolace DNA rýže

Pro izolaci nukleových kyselin všeobecně je k dispozici škála metod, kde je prvním krokem lýze buněk. Pro lýzi rostlinných buněk s buněčnou stěnou musí být použita nějaká forma mechanické síly, např. drcení tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce.

U této izolace je nutné odstranit i polysacharidy extrakcí s cetyl trimetyl amonium bromidem (CTAB). 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 objeví bílý prstenec precipitovaných proteinů. Horní vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny.

Z vodného roztoku je DNA vysrážena přidáním koncentrovaného vymraženého etanolu. S nukleovými kyselinami se srážejí i soli, které je potřeba odmyt 75% etanolem. Čistá DNA je po vysušení rozpuštěná ve vodě nebo v TE pufru. Pokud potřebujeme pracovat s čistou DNA, musí být RNA odstraněna působením RNázy.

Analýza mikrosatelitů

Délka alel se zjistí PCR amplifikací specifického lokusu pomocí primerů přiléhajících k mikrosatelitní sekvenci. Jeden primer z páru a to forward je fluorescenčně značen (VIC, PET, NED, 6-FAM) specificky rozlišující odrůdy. PCR fragmenty se pak rozdělí podle délky v sekvenátoru na principu kapilární elektroforézy v přístrojích ABI PRISM 3130 (Applied

Biosystems). Pro každou kombinaci mikrosatelitů a odrůdy je charakterizován specifický signál. Tak je možné jednoznačně odrůdu identifikovat. Ke každému vzorku se přidá fluorescenčně značený standard (500LIZ).

2.2 Potřebné technické vybavení

0,2 ml sterilní zkumavky

1,5 a 2 ml sterilní zkumavky

6 x Loading Dye Solution

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

Špičky na automatické pipety

Termocykler pro PCR _Eppendorf _Mastercycler® nexusVortex

Zařízení na horizontální elektroforézu

Zdroj k elektroforézám

Spektrofotometr

Váženky

Vortex

Třecí misky a tloučky

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
- merkaptoethanol
- 2 X CTAB PUFR:

2 M NaCl	40 ml	5 M roztoku
0,2 M Tris	20 ml	1 M roztok o pH 8,0
50 mM EDTA	10 ml	0,5 M roztok o pH 8,0
2 % CTAB	2 g	
H ₂ O	do 100 ml	

- TE PUFR:

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 etanolu - vymražený
- 75 % roztok etanolu
- 1 x TAE PUFR

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
- PVP (Polyvinylpyrrolidon)
- RNáza A
- Syntetické oligonukleotidy - primery specifické pro daný druh rostliny (viz Tabulka 1)
- dNTP

- *Tth* polymeráza vč. pufru a $MgCl_2$ (Biotools)
- Ultra Pure H_2O pro PCR
- Formamid
- LIZ500 délkový standard

2.3 Pracovní postup a vyhodnocení experimentálních dat

Izolace DNA

- Pro izolaci kvalitní DNA je možné použít jak listy, tak i zrno. U listů je vhodné použít mladé listy. Materiál je uchováván v PE zipových sáčkách nebo jsou listy zabaleny do alobalu a uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo je lze ihned zpracovat. Zrno lze uchovat na suchém chladném místě. Vzorky jsou doplněny popisem odrůdy a datem, příp. popisem lokality/místa odběru.
- Asi 0,5 mg rostlinného materiálu je rozetřeno tekutým dusíkem ve třecí misce, prášek je ihned přemístěn do 2 ml mikrozkušavky se 700 μl pufru 2x CTAB a 3 μl merkptoethanolu a promíchán pomocí vortexu. Poté jsou vzorky 30 minut inkubovány ve vodní lázni při teplotě $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nebo v termomixéru). Pak je směs ochlazená 5 minut v ledu.
- Ke směsi je přidán 1x objem směsi chloroformu a izoamylalkoholu (24:1). Po 5 minutách třepání jsou vzorky centrifugovány při maximálních otáčkách po dobu 10 minut a je odebrána vodná fáze. Tento krok je ještě jednou zopakován.
- K roztoku vzorku je přidán 1x objem vymraženého 99 % etanolu. Vzorky jsou jemně promíchány několikanásobným převrácením zkumavky. Precipitovaná DNA je odebrána pomocí skleněných háčků. Vzorky na háčcích jsou umístěny do nových mikrozkušavek s 500 μl 75 % roztoku etanolu a inkubovány cca. 1 hodinu při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po hodině jsou vzorky na háčcích znovu umístěny do nových 1,5 ml mikrozkušavek s 500 μl 75 % roztoku etanolu a inkubovány přes noc při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Druhý den je etanol odstraněn a vysušená DNA je rozpuštěna podle velikosti peletky ve 100 – 200 μl TE pufru.
- K DNA je přidáno 20 μl roztoku RNázy (20mg/ml) a vzorky jsou inkubovány 10 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Příprava 0,8 % agaróзовého gelu a nanášení vzorků na gel

Podle počtu vzorků se připraví navážka agarózy. Pro objem 70 ml 1x TAE je navážka agarózy 0,56 g a objem přidaného ethidium bromidu 0,7 µl.

- na analytických vahách se naváží na váženec potřebné množství agarózy
- 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
- 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
- tekutý roztok agarózy se nalije do formy na gel ve které je hřebínek a nechá se vychladnout
- 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:

- 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
- připravený elektroforetický gel se vloží do elektroforetické vany a převrství se (cca 5 mm) 1 x TAE puftrem
- 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
- elektroforéza probíhá cca 60 – 90 minut při 30 V

Spektrofotometrické měření koncentrace extrahované DNA

- 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 100 ng/µl. Vyšší koncentrace DNA se ředí TE puftrem. Čistota izolované DNA z hlediska kontaminace bílkovinami se získá změřením poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀), 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 100 ng/μl.

SSR reakce:

Mastermix pro SSR reakci je namíchán 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 mastermixu je tento rozpipetován v objemu 14 μl do tenkostěnných mikrozkušavek a do každé z nich je posléze přidán 1 μl genomické DNA analyzované odrůdy (koncentrace 100 ng /μl).

Reakční směs:

směs primerů* F+R (5 mM)	1,0 μl
dNTP (2,5 mM)	1,0 μl
pufr (BioTools) (10x)	1,5 μl
MgCl ₂ (15 mM)	0,6 μl
<i>Tth</i> polymeráza (BioTools) (5 U/μl)	0,2 μl
templátová DNA (100 ng/μl)	1,0 μl
H ₂ O	8,7 μl
reakční objem	15,0 μl

*F forward primer, R reverse primer

Mikrozkušavky jsou centrifugovány a umístěny do termocyklu Eppendorf_Mastercycler® nexus. PCR reakce sestává z následujících kroků:

1 cyklus:	95 °C	5 min.
35 cyklů:	95 °C	30 sec.
	T _A *	30 sec.
	72 °C	40 sec.
1 cyklus	72 °C	5 min.
	10 °C	∞

Hodnoty *T_A(annealing temperature) jsou pro jednotlivé mikrosatelitní markery uvedeny v Tabulce č.1.

Analýza PCR produktů kapilární elektroforézou

Při studiu mikrosatelitní oblastí genomu rýže je analyzováno více lokusů (viz Tabulka č. 1). Produkty amplifikace jsou separovány elektroforeticky metodou kapilární elektroforézy na přístroji ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

Příprava vzorků pro fragmentační analýzu:

Formamid.....10,0 µl

LIZ500 Size Standard 1 µl

PCR vzorky: 6-FAM 0,4 µl, VIC 0,4 µl, NED 0,4 µl, PET 0,4 µl -vzorky inkubujeme 7 minut při teplotě 94 °C a následně rychle zchladíme na teplotu 4 °C.

Analýza PCR produktů v přístroji ABI PRISM 3130

Jako interní velikostní standard se používá LIZ500 pro kombinaci primerů (fluorescenčně značených VIC, PET, NED, 6-FAM). Vzorky pro analýzu jsou připravovány do zkumavek, uzavřeny víčkem a centrifugovány.

Profily SSR markerů se vyhodnocují pomocí specializovaného programu GeneMapper v 3.7. Výsledkem analýzy jsou velikosti jednotlivých fragmentů v bp a jejich zařazení do kategorií. Primární data se dále převádějí do binární matice a statisticky se zpracovávají (DARwin, PCA).

Přílohou 1 : Příklad elektroforetogramu amplifikačních produktů s vyžitím primerové kombinace (marker SSR RM201, Tab. 1) v programu GeneMapper. Odlišuje rýže typu Basmati a běžných rýží.

Přílohou 2 : Profily 9 mikrosatelitních lokusů u vybraných odrůd rýže typu Basmati uvedených v prováděcím nařízení komise EU č. 706/2014 ze dne 25. června 2014 (osvobozených od dovozního cla; EU), jiných odrůd rýže typu Basmati (B), odrůd aromatických rýží s identifikovanými alternativními mutacemi v genu *BDH2* a nearomatickými standardními odrůdami rýže (NB)

Tabulka č.1: Analyzované SSR lokusy a sekvence primerů pro jejich specifickou amplifikaci

Přadové číslo	Označení markeru	Primerový pár	Velikost produktu	Fluorofor
1	vf100	vf100-F VIC-CCATGGCTTCCGGTTGGG vf100-R CTCATCAATCGGTGAGAGAGAGTGC	126 bp	VIC
2	ch8p6	ch8p6 -F VIC-CTGTTAGGTTGCATTTACTGGG ch8p6 –R AACCTTAACCATAGGAGCAGC	76 bp	VIC
3	ch8p22	ch8p22-F PET-TGTTAGGTTGCATTTACTGGG ch8p29-R AAACAAACCTTAACCATAGGAGC	80 bp	PET
4	vf336	vf336 -F NED-GTACTGATGGTTACGCGACA vf336-R TTCGCAGAACAGATGACCTGCA	138 bp	NED
5	vf179	Vf179-F PET-AAAGCCAAGGTGCTACCAT vf179-R ATAGAAACCTTCTCCAGATGC	146 bp	PET
6	RM339	RM339-F NED-GTAATCGATGCTGTGGGAAG RM339-R GAGTCATGTGATAGCCGATATG	186 bp	NED
7	RM201	RM201-F 6-FAM-CTCgTTTATTACCTACAgTACC RM201-R CTACCTCCTTTCTAgACCgATA	142 bp	6-FAM
8	RM212	RM212-F VIC-CCACTTTCagCTACTACCAg RM212-R CACCCATTtGCTCTCATTATg	116 bp	VIC
9	RM463	RM463-F TTCCCCTCCTTTATGGTGC RM463-R TGTTCCTCCTCAGTCACTGCG	193 bp	VIC

III. Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice, případně jejich zdůvodnění, pokud se bude jednat o novou neznámou metodiku (§ 2, odst. 1, písm. b) a písm. c) zákona č. 130/2002 Sb.),

Původní metodika nebyla žádná. Jedná se o novou metodiku, která zavádí zcela nové postupy. Podstatou zkoušky je amplifikace úseků genomu obsahující daný mikrosatelitní lokus pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se specifickými primery a následná analýza délky produktů. V laboratoři byl na několika rostlinných druzích ověřen postup analýzy délkového polymorfismu mikrosatelitů (Ovesná et al. 2011, Ovesná et al. 2014) a zavedena aplikace na rýži (Aidarová et al., 2016)

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 některé publikace Jones *et al.* (1997), které sledovaly reprodukovatelnost metod založených na DNA markerech.

Díky zařazení standardů lze jednoznačně identifikovat jednotlivé alely daných lokusů. 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).

IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky, informace pro koho je určena a jakým způsobem bude uplatněna,

Předložená metodika přináší validovaný postup upravený pro hodnocení odrůdové pravosti rýže a hodnocení genetických zdrojů a šlechtitelských materiálů se zaměřením na dlouhozrnnou aromatickou rýži typu Basmati a vyjmenovaných odrůd v prováděcím nařízení komise EU č. 706/2014 ze dne 25. června 2014, osvobozených od dovozního cla.

Metodiku je možné využívat v běžných laboratořích a to jak v akreditovaném systému tak pro výzkumné a vývojové účely.

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy DNA SSR markerů u tradiční rýže Basmati a odlišit je od dalších dlouhozrnných odrůd. Výstupem analýzy je profil DNA, který se použije pro charakterizaci jednotlivých vzorků.

Uživatelé metodiky mohou být orgány státní správy (SZPI), kontrolní a soukromé laboratoře v ČR.

V. Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení metodiky závisí na vybavení laboratoře. Pro laboratoř vybavenou pro analýzy DNA a fragmentační analýzu budou náklady představovat zakoupení primerů a zejména náklady na validaci metody (cca 100 tis. Kč). Uživatel pak je schopen nabídnout validovaný postup jako službu s ekonomickým dopadem. Hlavním přínosem je možnost ochrany spotřebitele a trhu falšování potravin.

Zhodnocení finanční, časové a kapacitní náročnosti

Analýza zahrnuje extrakci DNA, PCR reakce a následnou detekci velikosti produktů. Časově a pracovně náročná je extrakce DNA použitím CTAB metody, ale je levnější než extrakce použitím kitu. Zpracování 96 vzorků (počet pozic v PCR destičce) jednoho mikrosatelitního lokusu odpovídá 96 vzorkům rýže (včetně kontrol a referenčních vzorků) a

trvá cca 2 a půl hodiny. Výsledky elektroforetických analýz jedné destičky jsou k dispozici za 24 hod. Odborně náročnější část analýz představuje vyhodnocení výsledků, které zahrnuje identifikaci a vyhodnocení alel programem GeneMapper 3.7 a následné porovnání velikostí. To si vyžaduje zkušeného pracovníka. Cena analýzy jednoho vzorku všemi markery činí přibližně 10.000,-Kč včetně izolace DNA a analýzy v přístroji ABI PRISM 3130. Ceny analýz závisejí na kurzu US dolaru a aktuálních cenách chemikálií a počtu analýz v jedné sérii.

Pro zavedení metodiky do praxe je třeba počítat s náklady na verifikaci metody na daném pracovišti. Je třeba analyzovat alespoň 5 standardních vzorků (referenčních standardů alel SSR lokusů) a to v deseti nezávislých opakováních. 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. Standardy, primery, analýza ve stroji jsou materiály, které se na verifikaci nezužítují všechny a mohou být použity v následných analýzách. Jejich množství závisí na nutnosti opakování některých analýz při zavádění metody. Náklady na zavedení metody jsou bez započtení osobních nákladů, které se mohou lišit a lze je odhadnout na 100 000 Kč.

VI. Seznam použité související literatury

Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in plant science. *Plant Cell Reports*, 27:617–631.

Aidarova A. (2016): Vývoj metod pro kontrolu pravosti potravin a detekci GMO na bázi DNA technik, *Bakalářská práce, VŠCHT Praha*, 32s.

Cunha, C.P., Hoogerheide, E.S.S., Zucchi, M.M. and Pinheiro, J.B. (2012): New microsatellite markers for garlic, *Allium sativum* L. (Alliaceae). *American Journal of Botany*, 99: 17-19.

De Vienne D., Santoni S. (1998): Les principales sources de marqueur moléculaires. in: de Vienne et al.: Les marqueur moléculaire en génétique et biotechnologies végétales. INRA, Paris, 1998: 15-47.

- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A. and Caskey, C. T. (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49: 746-56.
- Field, D. and Wills, C. (1998): Long polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 263:209-215.
- 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.
- Hoshino A.A., Bravo J.P., Nobile P.M., Morelli K.A. (2012): Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis, *Genetic Diversity in Microorganisms*. InTech, book edited by Mahmut Caliskan, ISBN 978-953-51-0064-5.
- Chambers, G. K., Macavoy E. S. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative biochemistry and physiology. Part B. Biochemistry & Molecular Biology*. 2000, 126 (4): 455-476. [cit. 2012-09-15]. ISSN 1608-3202. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305049100002339>
- 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 A., Marmioli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3: 381–390.

- Ma K.H., Kwag J.G., Zhao W., Dixit A., Lee G.A., Kim H.H., Chung I.M., Kim N.S., Lee J.S., Ji J.J., Kim T.S., Park Y.J. (2009): Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci from the genome of garlic (*Allium sativum* L.). *Scientia Horticulturae*, 122: 355–361.
- Marikar F.M.M.T, Musthafa M.M. (2014): Usefulness of short sequence repeat markers in goat genetic diversity studies on the Asian and African continents. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38: 606-611.
- 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.
- Ovesná J., Leišová-Svobodová L., Kučera L. (2014): Microsatellite analysis indicates the specific genetic basis of Czech bolting garlic. *Czech Journal of Genetics and plant Breeding*, 50(3): 226-234.
- Ovesna, J; Leisova, L; Kucera, L. (2001): Characterisation of barley (*Hordem vulgare* L.) varieties and breeding lines using RAPD and QTL associated PCR markers *ROSTLINNA VYROBA* 47: 141-148
- Saberivand A., Javanmard A., Safdari M., (2011): Parentage verification and identity test of Ghezel sheep using microsatillate markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(31): 5815-5819.
- Sunnuck P. (2000): Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 199-203.
- Tautz D. (1989): Hypervariability of simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Developement*, 4: 1193-1199.

Tomar J.S., Soni K., Agrawal R., Saxena S., Saxena A.K. (2013): Microsatellite markers: A Breakthrough in evolutionary biology. *International Journal Of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, 2(4): 385-409.

Tóth, G., Gáspari, Z. Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.

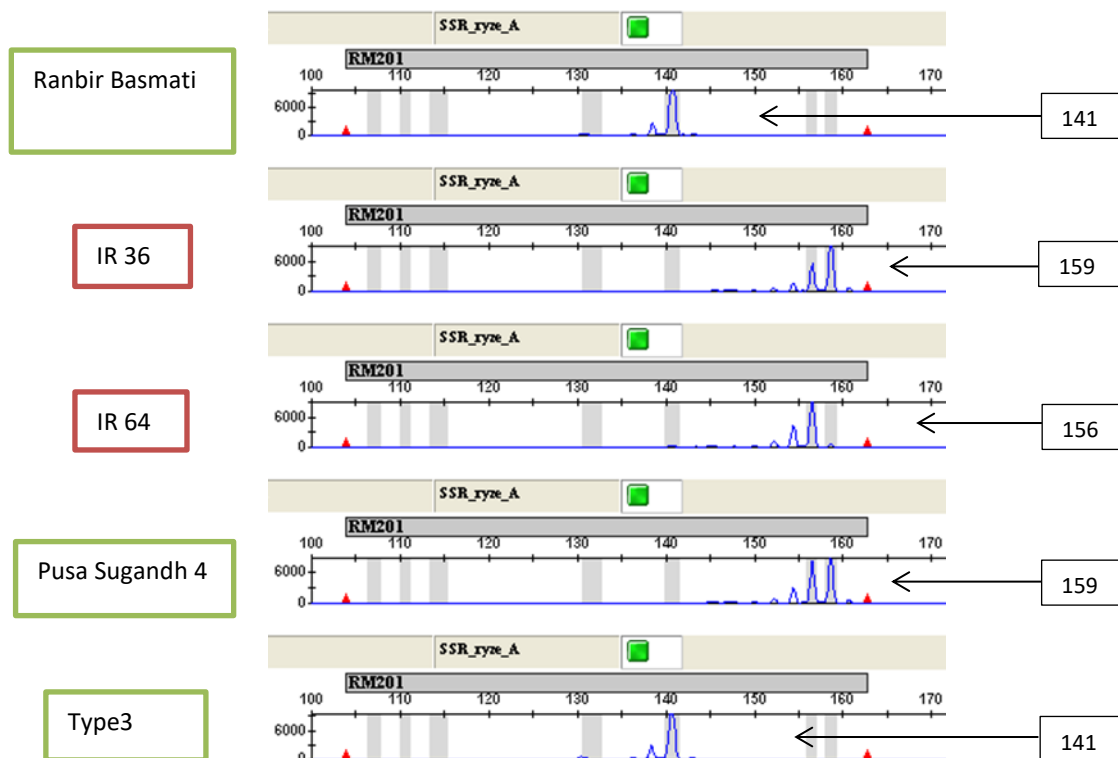
Tupac-Yupanqui I., Martínez A., Méndez S., Delgado J.V., Gómez M., Dunner S., Cañón J. Schulz U., (2010): The Canarian Camel: A Traditional Dromedary Population. *Diversity*, 2: 561-571.

Štambuk S., Sutlovič D., Bakarič P., Petričević S., Anđelinović Š. (2007): Forensic Botany: Potential Usefulness of Microsatellite-based Genotyping of Croatian Olive (*Olea europaea* L.) in Forensic Casework. *Croatian Medical Journal*, 48(4):556–562.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány (pokud existují), případně výstupy z určité znalosti, jestliže se jedná o originální práci. U jednotlivých publikací je třeba uvést dedikaci, která je v jednotlivých publikacích uvedena.

Metodice nepředcházely publikace, jedná se o originální práci.

Příloha 1: Příklad elektroforetogramu amplifikačních produktů s vyžitím primerové kombinace (marker SSR RM201, Tab. 1) v programu GeneMapper. Odlišuje rýže typu Basmati a běžných rýží.



Příloha 2: Profily 9 mikrosatelitních lokusů u vybraných odrůd rýže typu Basmati uvedených v prováděcím nařízení komise EU č. 706/2014 ze dne 25. června 2014 (osvobozených od dovozního cla; EU), jiných odrůd rýže typu Basmati (B), odrůd aromatických rýží s identifikovanými alternativními mutacemi v genu *BDH2* a nearomatickými standardními odrůdami rýže (NB)

Označení markeru	Délka fragmentu v bázích	genBDH2	badh2.1					badh2.1						badh2.6	badh2.9	badh2.10	badh2.5	badh2.4	badh2.3	badh2.8					
			B	B	B	B	B	B	B	B	NB	NB	NB	AROMATIC											
			EU	EU	EU	EU	EU																		
	Název odrůdy	BASMATI 217	RANBIR BASMATI			TYPE 3		BASMATI 370	BASMATI 370 B		BASMATI 385	BASMATI 372 A		PUSA SUGANDH 4		IR 72	IR 64	IR 36	PADI WANGI	PANDAN WANGI	TAI NUNG 72	VISHUNPARAG	PARE BAINE PULUT	RASOMOTRAFOTSY	BALYGYUN
vf100-125	125		125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
vf100-131	131																			131					
ch8p6-69	69		69	69	69	69	69	69	69	69	69													69	
ch8p6-75	75										75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
ch8p22-68	68						68																		
ch8p22-74	74		74	74	74	74	74	74	74	74	74	74							74			74	74		
ch8p22-82	82									82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82
vf336-92	92		92						92	92	92	92	92	92				92							
vf336-124	124						124									124									
vf336-135	135		135	135	135	135	135	135	135	135						135	135	135				135	135	135	135
vf179-150	150		150	150	150	150	150	150	150	150	150	150				150	150	150				150	150		
vf179-154	154												154						154						
vf179-138	138																				138				
RM339-140	140																	140							
RM339-144	144															144		144				144			
RM339-147	147								147	147	147	147	147												
RM339-150	150																								
RM339-156	156															156									
RM339-160	160																								
RM339-182	182		182	182		182	182	182	182	182															182
RM201-141	141		141	141	141	141	141	141	141								141	141				141	141		
RM201-150	150								150																
RM201-156	156											156			156										
RM201-159	159									159	159		159												
RM212-110	110											110													
RM212-112	112														112				112						
RM212-114	114		114	114	114	114		114								114	114				114	114		114	114

RM212-128	128																	
RM212-132	132					132		132	132		132							
RM212-143	143						143											
RM463-194	194											194		194				
RM463-196	196							196		196					196			
RM463-198	198	198	198		198	198			198		198		198			198		198