

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2021

Ročník XXV, číslo 3/2021

Brno 2021

Obsah

- 1 **Spektrofotometrické stanovení obsahu fosforitanů v biostimulantech**
Václav Poštulka
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Opava
Jaselská 552/16, 74623 Opava 1
- 2 **Ověření nové normy pro půdy a kaly – rozklad lučavkou královskou a zavedení nového mineralizačního bloku Hotblock do rutinní práce v laboratoři**
Eva Špačková, Eva Urbánková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 20
- 3 **Zavedení metody pro identifikaci odrůd ječmene pomocí SSR markerů**
Jitka Klemková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie
Hroznová 2, 656 06 Brno 38

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Spektrofotometrické stanovení obsahu fosforitanů v biostimulantech

Václav Poštulka

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
Odbor NRL Opava Jaselská 552/16, 74623 Opava

vaclav.postulka@ukzuz.cz

1 Úvod

Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/1009 ze dne 5. června 2019, kterým se stanoví pravidla pro dodávání hnojivých výrobků, dochází k zavedení legislativních limitů na obsah fosforitanů v biostimulantech (limitní hodnota pro fosforitany je 0,5 % (m/m)). Důvody jsou tedy legislativní, tj. za účelem kontroly obsahu fosforitanů a jejich hodnocení podle příslušných legislativních limitů. V laboratořích NRL metoda dosud není zavedena. Cílem této práce je ověření vhodnosti spektrofotometrického stanovení obsahu fosforitanů za pomoci oxidace na fosforečnany a následného stanovení jako molybdenová modř.

Do popředí zájmu se v současnosti dostávají látky, které u rostlin stimulují přirozené procesy, vedoucí k většímu příjmu, lepšímu využití živin a k větší rezistenci vůči stresu. Nedávné výzkumy naznačují, že jedním z takových biostimulantů mohou být právě fosforitany. Možným mechanismem účinku fosforitanů na rostlinu by mohla být stimulace produkce polyfenolů. Tyto sekundární metabolity hrají v rostlinách několik rolí, mj. chrání rostlinu před mikrobiálními patogeny a herbivorním hmyzem. Mimo to vykazují rozmanité pozitivní účinky na lidské zdraví, a zvyšování jejich příjmu v potravě je tudíž žádoucí (1).

Z chemického hlediska se pod pojmem fosforitan rozumí aniont odvozený od kyseliny fosforité; H_3PO_3 se přesněji popisuje vzorcem $\text{HPO}(\text{OH})_2$. Tato molekula existuje v rovnováze s menšinovým tautomerem $\text{P}(\text{OH})_3$. Podle doporučení IUPAC z roku 2005 se tato první forma označuje kyselina fosfonová, kdežto forma druhá jako kyselina fosforitá. Fosforitany se vyskytují ve formě solí, nejčastěji s kationtem alkalického kovu.

Fosforitany mohou být dobrým biostimulantem v zemědělství. Několik studií prokázalo, že po aplikaci fosforitanů se zvýšila výtěžnost určitých plodin, jakými jsou např. brambory, rajčata anebo citrusy. Po aplikaci fosforitanů do půdy dochází k jejich oxidaci. Půdní mikroorganismy jsou schopné asimilovat fosforitany a následně uvolňovat fosforečnany,

příčemž z této konverze mohou získat energii. Dosud není zcela jasné, zda fosforitany hrají roli okamžitého zdroje fosforu pro rostlinu, nebo až po konverzi na fosforečnan.

Oproti tomu existuje hned několik studií, které ukázaly, že fosforitany se mohou podílet na odpovědi rostliny na biotický či abiotický stress. Jedním z možných mechanismů působení je inhibice růstu fungálních mikroorganismů, díky zvýšení koncentrace anorganického pyrofosfátu, který interferuje s klíčovými fosforylačními procesy u hub. B. Speiser a kol. prokázali ve své studii, že aplikace fosfonátu draselného byla účinná proti plísni révové (*Plasmopara viticola*), která je jednou z nejrozšířenějších onemocnění u révy.

Fosforitany také mohou u rostlin ovlivňovat metabolismus sacharidů, tvorbu rostlinných hormonů a také mohou stimulovat šikimátovou dráhu, což má za následek zvýšení tvorby polyfenolyckých látek (1).

2 Materiál a metody

Samotný vývoj nové metody byl rozdělen na tři podčásti (Tier), v textu je každá část vyhodnocena a diskutována samostatně:

- 1) Ověření kvantitativní oxidace fosforitanů manganistanem draselným a zhodnocení vlivu manganistanu na spektrofotometrické stanovení.
- 2) Souběžné stanovení fosforečnanů a fosforitanů. Ověření na několika koncentračních hladinách.
- 3) Ověření postupu na reálných vzorcích několika biostimulantů.

Principem použité metody je spektrofotometrické stanovení fosforu jako fosfomolybdenová modř při vlnové délce 750 nm. Redukce kyselinou askorbovou probíhá v prostředí kyseliny sírové v přítomnosti antimonu. Intenzita modrého zabarvení se měří na spektrofotometru při vlnové délce procházejícího světla 750 nm (2).

3 Chemikálie

Veškeré použité chemikálie jsou analytické čistoty, není-li uvedeno jinak.

- KMnO_4 , (Lach-Ner).
- $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, > 98%).
- Kyselina citrónová (Lach-Ner).
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner).
- H_3PO_3 (Sigma-Aldrich, > 99%)

- Voda (demineralizovaná).
- Základní standardní roztok pro fosfor o koncentraci $c(P) = 1000 \text{ mg/L}$ (dodává ověřený dodavatel, Analytika, s.r.o., Praha).

Vzorky reálných biostimulantů:

- ALGAN Energen (EGT system spol. s r.o., r.v. 2019, ČR, extrakt z řas).
- TS LICIT (Beidea s.r.o., r.v. 2019, ČR, extrakt z řas).
- ULYSSE (pozn. přivezeno z Plzně jako hnojivo, ne jako biostimulant).
- FLORONE (Alántica Agricola, r.v. 2017, ES, extrakt z řas).
- RED BLOC SW (ICAS s.r.l., r.v. 2018, extrakt z řas).

Tabulka 1. Charakteristiky reálných vzorků.

Název	skupenství	druh	Fosfor* (mg/kg)	Deklarovaná sušina	Deklarované spalitelné látky v sušině	pH
ALGAN	l	biostimulant	63,5	-	45 %	8,0 - 10
TS LICIT	l	biostimulant	2568	24 %	50 %	7,5 - 9,5
ULYSSE	s	hnojivo	47270	-	-	-
FLORONE	l	biostimulant	43850	-	8 % ¹⁾	7,5 – 8,0
RED BLOC	l	biostimulant	2607	-	10 % ¹⁾	2,0 – 4,0

Název	Deklarované volné aminokyseliny	Hustota (g/mL)	Deklarovaný vodou rozpustný fosfor (jako P ₂ O ₅)	Deklarované humínové látky
ALGAN	-	-	-	-
TS LICIT	-	-	-	10 %
ULYSSE	-	-	0,1 % ³⁾	-
FLORONE	4 %	1,26	10 %	-
RED BLOC	30 % ²⁾	1,20	-	-

Vysvětlivky: ¹⁾ - uvedeno jako organická hmota

²⁾ - uvedeno jako organický podíl s molekulovou hmotností < 50 kDa

³⁾ - celkový deklarovaný fosfor jako P_2O_5 je 11,1 %, vodou rozpustný pouze jako 0,1 %

* - změřeno metodou ICP OES v ONRL Opava

Výše uvedené charakteristiky vycházejí z deklaráce výrobce.

3.1 Použité pomůcky a přístroje

3.2 Přístroje

- Analytické váhy Sartorius A200S.
- Digitální předvážky Sartorius L610D.
- Spektrofotometr Varian Carry 50 UV/VIS.

3.3 Pomůcky

- Varná deska.
- Kalibrovaný teploměr.
- SPE kolonka.
- Sorbent pro SPE (Spe-ed, SPE matrix hydroscopic).
- Filtrační papír.
- Laboratorní teploměr.
- Laboratorní sklo (kádinky, odměrné baňky, hodinová sklíčka apod.).

4 Pracovní postup

4.1 Ověření kvantitativní oxidace fosforitanů manganistanem draselným a vyhodnocení vlivu manganistanu na spektrofotometrické stanovení (Tier 1)

Základní standardní roztok fosforu pro tvorbu kalibrační řady byl připraven ředěním komerčního certifikovaného standardního roztoku. Postup pro přípravu redukčního a vybarvovacího roztoku byl totožný s postupem uvedeným v JPP 30072.1 Stanovení fosforu v extraktu podle Mehlicha 3 spektrofotometricky (2). Vybarvené roztoky se vždy měří po 2 h od promíchání na spektrofotometru při vlnové délce procházejícího světla o vlnové délce 750 nm. Obsah fosforu v mg/kg vzorku se zjistí z kalibračního grafu, který je v celém rozsahu měřených koncentrací lineární. Výsledky jsou uváděny v mg P/kg vzorku.

Nejprve byl navážen $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pro přípravu základního roztoku fosforitanů (Phi) P1 a následně byl z tohoto roztoku připravena pracovní řada fosforitanů. Navážky a jednotlivé pipetované objemy pro tvorbu řady jsou uvedeny v tabulkách níže.

Tabulka 2. Příprava základního roztoku P1 Phi pro řadu fosforitanů, pipetované objemy pro koncentrační řadu.

Základní roztok P1 Phi (250 mg/L jako P)		
m	0,4359	g
V	250	mL
c	250	mg/L P

č	Koncentrace P [mg/L]	Pipetovaný objem P1 [mL]	V KMnO_4 [mL]
1	3	0,6	10
2	5	1	10
3	10	2	10
4	20	4	10
5	30	6	10
6	50	10	10

Jako výchozí oxidační činidlo byla zvolena směs KMnO_4 (0,01 mol/L) a H_2SO_4 (1 mol/L).

Kalibrační řada byla připravena vždy přesným pipetováním do 50mL kalibrovaných odměrných baněk. Po napipetování základního roztoku a oxidačního činidla (vždy pipetováno 10 mL KMnO_4) byl roztok v baňce doplněn po značku a důkladně promíchán.

Po promíchání byly modelové roztoky převedeny do 100mL kádinek a zahřívány na vařiči. Následným ověřením bylo zjištěno, že vyhovující podmínky jsou minimálně desetiminutový var (viz kapitola níže – Vliv teploty).

Zároveň bylo zjištěno, že je vhodné zajistit vždy dostatečný nadbytek manganistanu, (asi 30 % a více proti stechiometrii), protože nemusí být zajištěna kvantitativní oxidace, ale také se zamezí vzniku redukované formy manganistanu, jakým je MnO_2 , který může ovlivnit spektrofotometrické stanovení (jednak jako sraženina, ale také je schopný ještě oxidovat molybdenové činidlo a tím dochází ke zkreslení výsledku stanovení). Manganistan v nadbytku reaguje s vybarvovacím činidlem podobně jako burel (MnO_2), nicméně poměrně dobře se osvědčil postup, kdy po proběhlém varu ještě za horka se nadbytek manganistanu redukuje několika kapkami roztoku kyseliny citrónové (0,25 mol/L). Výhodou je, že tato reakce probíhá velice rychle a konec je indikován úplným odbarvením roztoku. Pro další práci byly vzorky vždy ponechány samovolné teplotě na laboratorní teplotu. Následně byly vzorky pipetovány za pomoci dilutoru spolu s molybdenovým činidlem v poměru 1 : 25, protřepány, a ponechány přibližně 2 h do stabilního vybarvení na molybdenovou modř. Poté vždy probíhalo samostatné měření na spektrofotometru.



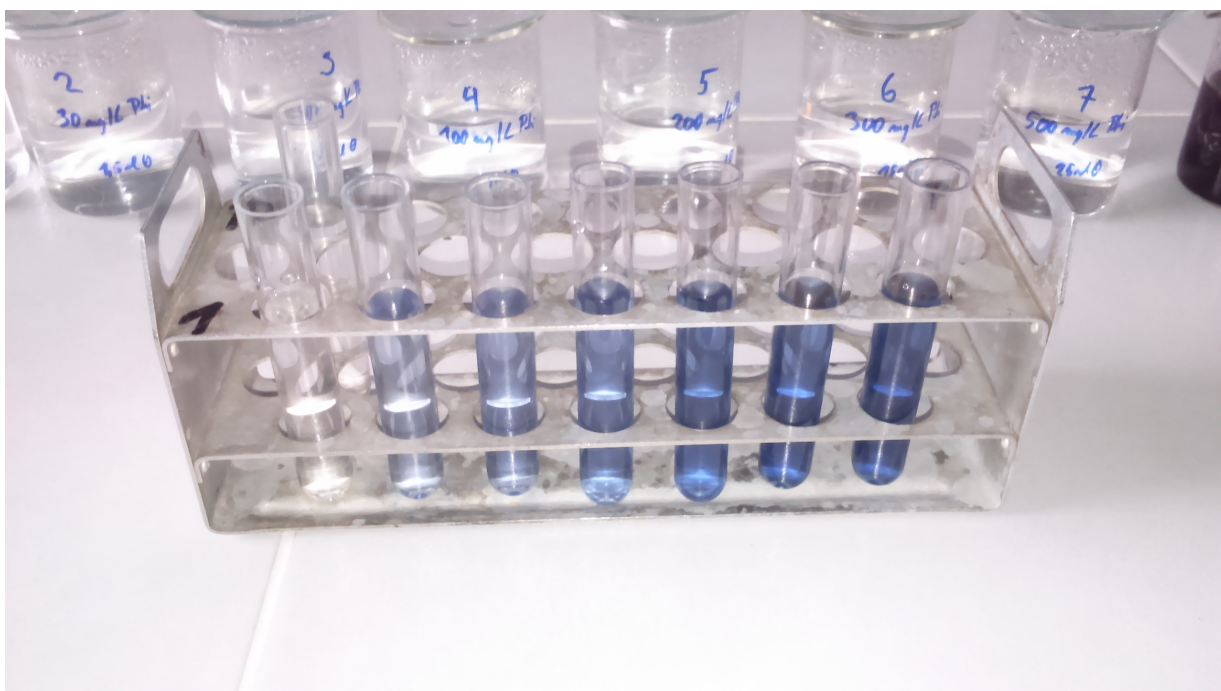
Obrázek 1. Modelová řada fosforitanů (3 – 50) mg P/L.



Obrázek 2. Modelová řada fosforitanů (další varianta postupu práce se vzorky) – bez nadbytku a redukováno kyselinou citrónovou (vliv na burel).



Obrázek 3. Srovnání postupů s nadbytkem KMnO_4 a následnou redukcí (vlevo) a vznik burelu (vpravo).



Obrázek 4. Modelová řada fosforitanů po vybarvení na molybdenovou modř.

4.1.1 Vliv teploty

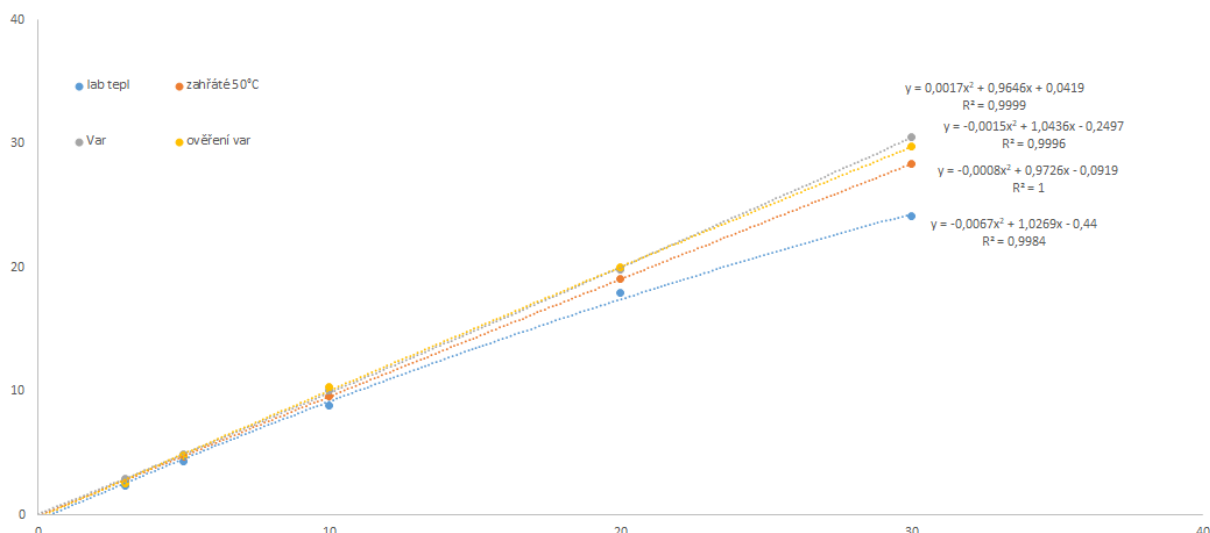
Původní nastavení reakčních podmínek vycházelo částečně z návrhových podmínek zmíněných v článku *Spectrophotometric determination of phosphite in fertilizers* (3), kdy byla

pro průtočnou celu autorem článku volena reakční teplota cely 50 °C, jako oxidační činidlo byl i zde používán manganistan (0,01 mol/L). Vzhledem k signifikantnímu rozptylu výsledků mezi paralelními stanoveními bylo nutné ověřit vhodnost reakčních podmínek. Násobným ověřováním vhodnosti reakčních podmínek bylo zjištěno, že navrhovaná teplota a doba ohřevu je nevyhovující. Při navrhované teplotě 50 °C byly výsledky lineární, nicméně výtěžnost i se změnou doby ohřevu nikdy nepřesáhla 95 %.

Nakonec byl nejefektivnější zvolen postup s desetiminutovým varem v nadbytku manganistanu, přitom doba varu 5 min byla rovněž dostačující.

Tabulka 3. Vliv teploty.

Podmínky	koncentrace standardu (c(P) mg/L)	změřeno koncentrace (c(P) mg/L)	výtěžnost (% rel.)	průměr
laboratorní teplota	3	2,32	77 %	84 %
	5	4,32	86 %	
	10	8,85	89 %	
	20	17,95	90 %	
	30	24,12	80 %	
zahřáté max 50 °C	3	2,73	91 %	94 %
	5	4,73	95 %	
	10	9,55	96 %	
	20	19,09	95 %	
	30	28,34	94 %	
5 min mírný var	3	2,94	98 %	99 %
	5	4,92	98 %	
	10	10,01	100 %	
	20	19,84	99 %	
	30	30,53	102 %	
ověření delšího varu (>15 min)	3	2,56	85 %	97 %
	5	4,77	95 %	
	10	10,33	103 %	
	20	19,97	100 %	
	30	29,74	99 %	



Obrázek 5. Sledování vlivu teploty a času ohřevu na linearitu a výtěžnost.

Pozn.: Rovnice kalibrační přímky je vyjádřena jako polynom druhého stupně. Výpočetní software využívaný na přístroji Cary počítá s tímto vyjádřením implicitně, tudíž pro lepší srovnávání bylo toto vyjádření využíváno vždy.

4.2 Souběžné stanovení fosforečnanů a fosforitanů. Ověření na několika koncentračních hladinách (Tier 2)

Bylo provedeno několik testů s řadami fosforečnanů (Pi), fosforitanů (Phi) a se standardními přísadky k řadám. Cílem tohoto testu bylo vyzkoušet kvantitativní stanovení fosforitanu vedle fosforečnanu u uměle připravených roztoků (jednoduchá matrice – vodný roztok) a ověřit, zda nedochází k vzájemnému ovlivňování.



Obrázek 6. Řada fosforitanů s přidavkem fosforečnanů.

Jako výchozí postup pro přípravu vzorků byl zvolen závěrečný postup z Tier 1.

4.3 Ověření postupu na reálných vzorcích několika biostimulantů (Tier 3)

Pro ověření reálných vzorků byl zvolen postup níže:

Příprava základního roztoku (A):

- Protřepat vzorek biostimulantu
- Odpipetovat 10 mL do 250mL odměrné baňky (ředění 25 ×)
- Doplnit vodou po značku (tzn. vodný výluh)
- Důkladně promíchat, protřepat (minimálně 10 min).

Příprava pracovního roztoku (B):

- Pipetovat vždy 5 mL základního roztoku (A) do 50mL odměrné baňky (u vzorku hnojiv je nutná filtrace – vzniká koloidní roztok) (ředění 10 ×)
- Doplnit baňku vodou pro NEOXI vzorky (tj. bez přítomnosti oxidačního činidla - KMnO_4)
- Doplnit baňku oxidačním činidlem (okyselené KMnO_4 0,03 mol/L) pro OXI vzorky (tj. s přidavkem oxidačního činidla – KMnO_4)
- Přelít do 100mL kádínek, uvést k varu a vařit minimálně 15 min

- Pokud je hodně organiky ve vzorku, mohou se OXI vzorky odbarvit (tj. vypořádávalo se oxidační činidlo), pak je nutné k těmto vzorkům přidat opatrně další oxidační činidlo (nebo použít koncentrovanější oxidační činidlo)
- Nechat vzorky volně vychladnout a přidat k OXI vzorkům po kapkách kyselinu citrónovou na redukci zbytku oxidačního činidla až do odbarvení. OXI vzorky přelit do 100mL odměrné baňky a doplnit po rysku vodou (OXI: ředění 2 ×)

Vybarvovací činidlo

- Z pracovních roztoků (B) se ředí vybarvovacím činidlem (molybdenová modř, vanadičnanová žluť) v poměru 200 μl : 4800 μl (resp. 500 μl : 4500 μl).
- U zpracování na vanadičnanovou žluť je nutné ještě vzorky okyselit před přidávkem vybarvovacího činidla
- Nechá se dvě hodiny vybarvit
- Měří se P v mg/L.



Obrázek 7. Příprava základních roztoků (A) vzorků.

5 Diskuse a výsledky

5.1 Ověření kvantitativní oxidace fosforitanů manganistanem draselným a vyhodnocení vlivu manganistanu na spektrofotometrické stanovení

Tabulka 4. Výtěžnosti fosforitanů pro konečný postup (nadbytek KMnO_4 , kyselina citrónová, var).

No.	Koncentrační řady (c(P) mg/L)	ABS	Koncentrace měřená (c(P) mg/kg)	výtěžnost (%)	Pozn.
0	blank	0,0003	-0,03		
0	slepý vzorek	-0,0008	-0,08		
0	slepý vzorek (Mn)	-0,0004	-0,06		
1	3	0,0627	2,74	91 %	
2	5	0,1154	5,09	102 %	
3	10	0,2307	10,21	102 %	
4	20	0,4561	20,20	101 %	
5	30	0,6575	29,12	97 %	
6	50	1,0196	45,10	90 %	ředěný vzorek

Pro každou modifikaci postupu byly počítány výtěžnosti a výše uvedené v kapitole 4.1. (nadbytek manganistanu, redukce kyselinou citrónovou, úprava teploty a doby varu) se jeví jako velmi vhodný (průměrná výtěžnost 97 %, bez ředění pak 99 %). Tento postup byl proto zvolen jako výchozí pro Tier 2 návrhu metody.

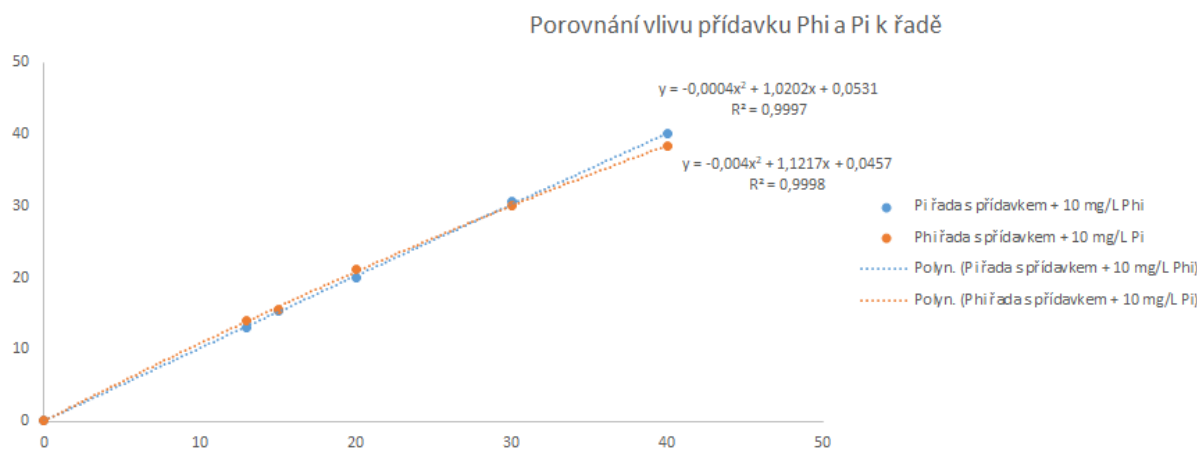
Lze konstatovat, že oxidační činidlo bylo zvoleno vhodně a oxidace fosforitanů probíhá za vhodných podmínek vždy kvantitativně. Nicméně bylo ověřeno, že je nutné přebytek oxidačního činidla zredukovat před vlastním spektrofotometrickým stanovením, aby nedocházelo k umělému snížení koncentrace fosforu vlivem reakce manganistanu s vybarvovacím činidlem.

5.2 Souběžné stanovení fosforečnanů a fosforitanů, ověření na několika koncentračních hladinách

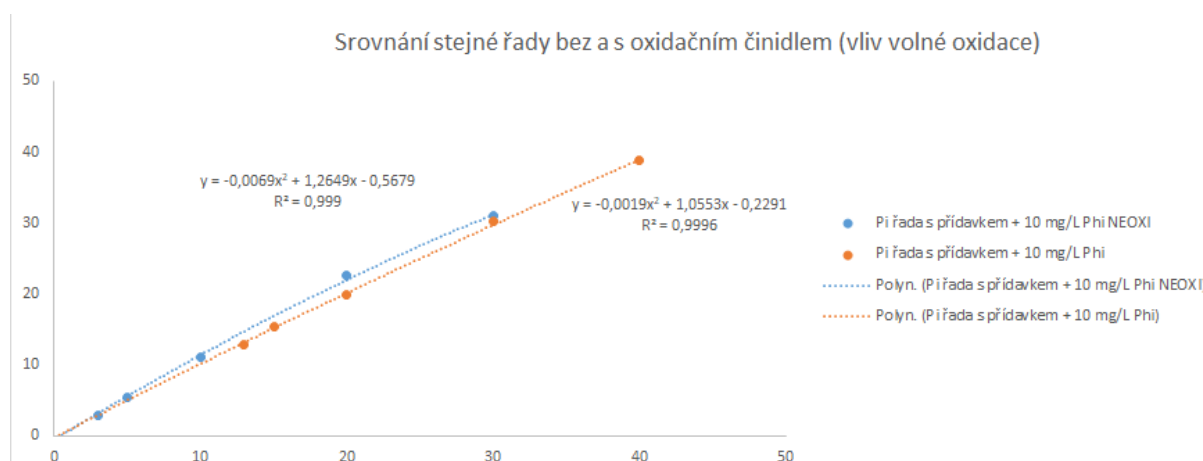
Tabulka 5. Stanovení fosforitanů jako P (mg/L) pro různé koncentrační hladiny.

	forma	Koncentrační hladina P (mg/L)	Předpokládaná koncentrace P po spiku (mg/L)	Naměřená koncentrace P (mg/L)	Pozn.
Pi řada s přídavkem + 10 mg/L Phi	OXI	3	13	13,12	
	OXI	5	15	15,44	
	OXI	10	20	19,95	
	OXI	20	30	30,64	
	OXI	30	40	40,04	> 35 mg/L
Phi řada s přídavkem + 10 mg/L Pi	OXI	3	13	13,95	
	OXI	5	15	15,64	
	OXI	10	20	21,16	
	OXI	20	30	30,11	
	OXI	30	40	38,45	> 35 mg/L
	blank	0	0	0,1	

Pi řada s přídavkem + 10 mg/L Phi NEOXI	NEOXI	3	13	2,93	volná oxidace
	NEOXI	5	15	5,35	volná oxidace
	NEOXI	10	20	11,09	volná oxidace
	NEOXI	20	30	22,53	volná oxidace
	NEOXI	30	40	31	volná oxidace
Pi řada s přídavkem + 10 mg/L Phi	OXI	3	13	12,9	
	OXI	5	15	15,36	
	OXI	10	20	19,85	
	OXI	20	30	30,16	
	OXI	30	40	38,77	> 35 mg/L
	blank	0	0	-0,14	



Obrázek 8. Porovnání vlivu přídatků fosforitanů a fosforečnanů k standardní řadě.



Obrázek 9. Sledování vlivu volné oxidace na řadu fosforitanů.

Při správném dodržení postupu z Tier 1 probíhala oxidace fosforitanů vždy kvantitativně. Bylo ověřeno, že na různých koncentračních hladinách nedochází k vzájemnému ovlivňování fosforečnanů a fosforitanů. Koncentraci fosforitanů tak lze jednoduše spočítat z rozdílu obsahu fosforu pro oxidovanou a neoxidovanou formu vzorku.

U sledování vlivu volné oxidace vzorku byl záměr kvantifikovat míru oxidace fosforitanů při stejném postupu úpravy vzorku, nicméně bez přítomnosti oxidačního činidla. Průměrná míra oxidace fosforitanů bez KMnO_4 byla 6 %, maximální u jednoho vzorku pak 13 %.

5.3 Ověření postupu na reálných vzorcích několika biostimulantů

Při ověření postupů u reálných vzorků se kvůli charakteru vzorků vyskytly problémy při stanovení obsahu fosforu. Nebylo možné považovat výsledky za věrohodné z důvodu vysokého rozptylu hodnot mezi opakováními (např. u neoxidované varianty při zachování stejného postupu byl rel. rozdíl až 1000 %). Pravděpodobným zdrojem problémů byl vysoký

obsah organických látek ve vzorcích, především pak huminových látek. Pokusy odstranit tyto látky ze vzorku a následně stanovit obsah fosforu ve vzorku jsou uvedeny níže v textu.

Rovněž byla vyzkoušena pro fosforitany metoda standardního přídatku.

Vzhledem k charakteru vzorků (vysoký organický podíl – výluhy z řas) bylo rovněž nutné upravit koncentraci oxidačního činidla. Jako výchozí oxidační činidlo byla zvolena směs KMnO_4 (0,01 mol/L) a H_2SO_4 (1 mol/L), upravené pak jako KMnO_4 (0,03 mol/L) a H_2SO_4 (1 mol/L).

5.3.1 Čiření vzorků

Původní hypotéza využití čiření vzorku vyházel z potřeby zjednodušit matici, resp. snížit spotřebu oxidačního činidla. Mezi opakovanými měřeními byl až příliš velký rozptyl, pravděpodobně docházelo ke koagulaci huminových látek v přítomnosti molybdenového oxidačního činidla při vybarvování (přítomnost sraženiny ve vzorku po vybarvení). Rovněž byl záměr snížit možné maticové efekty, způsobené vnášením vysokých koncentrací Mn ke vzorkům.



Obrázek 10. Čiření vzorku zinkovým koagulantem – detail.



Obrázek 11. Úroveň vyčerení pro jednotlivé vzorky.

Pro následné měření a úpravu byl vždy požit supernatant z vyčerených vzorků. Stanovené koncentrace fosforu byly ale významně nižší (někde i kolem LOQ). Pravděpodobný důvod je spoluúčast fosforečnanových a fosforitanových iontů ve vločkovatelném procesu (vznik elektrické dvojvrstvy koloidní částice).

Pro další práce již nebylo čerení, jakožto proces úpravy vzorku, uvažováno.

5.3.2 Separace huminových látek

Rovněž bylo ozkoušeno rozdělování organických látek ze vzorku pomocí náplňových kolonek. Bylo ozkoušeno několik stacionárních fází (hydrofobický Spe-ed, aktivní uhlí, křemelina). Jednotlivé složky se nepodařilo ani v jednom případně adekvátně separovat. V případě sorpce huminových látek na aktivním uhlí došlo k částečnému odbarvení vzorků, nicméně při následné analýze obsahu fosforu v takto upravených vzorcích, se ukázalo, že dochází k signifikantnímu snížení obsahu u stanovovaného fosforu.

Pro další práce již nebyla separace organického podílu z roztoku, jakožto proces úpravy vzorků, uvažována.



Obrázek 12. Použití separačních technik pro odstranění huminových látek ze vzorku.

5.3.3 Použití vanadičnanové žlutí

Vybarvování vzorků za pomoci vanadičnanové žlutí bylo provedeno podle metody uvedené v JPP analýza rostlin, nicméně na úvod je nutné zmínit, že tento postup se příliš neosvědčil. Poměrně rychle docházelo k vyvločkování vybarvovaných vzorků (pravděpodobně opět srážení huminových látek za přítomnosti iontů kovu) viz obrázek 13. Výsledky tak nebyly brány pro následné hodnocení obsahu P jako relevantní.



Obrázek 13. Vzorky vybarvené vanadičnanovou žlutí.

6 Závěr

Pro Tier 1 bylo ověřeno, že použití okyseleného KMnO_4 jako oxidačního činidla je vhodné pro vlastní oxidaci fosforitanů. Oxidace probíhá kvantitativně a při správně zvoleném postupu úpravy vzorku nedochází k ovlivnění spektrofotometrického stanovení.

Pro Tier 2 bylo na několika koncentračních hladinách ověřeno, že nedochází k vzájemnému ovlivnění fosforečanů a fosforitanů při stanovení vedle sebe. Byl sledován vliv samovolné oxidace vzorku s obsahem fosforitanů. Obsah fosforitanů tak lze vypočítat z rozdílu stanovení fosforu mezi oxidovanou a neoxidovanou formou stejného vzorku.

U Tier 3 se díky charakteru vzorků vyskytly problémy při stanovení obsahu fosforu. Výsledky nebylo možné považovat za věrohodné z důvodu vysokého rozptylu hodnot mezi opakováními. Pravděpodobným zdrojem problémů byl vysoký obsah organických látek ve vzorcích, především pak huminových látek. Pokusy odstranit tyto látky ze vzorku a následně stanovit obsah fosforu ve vzorku nebyly úspěšné.

Pro komplikovanost matrice u vzorků reálných biostimulantů se nejeví spektrofotometrické stanovení fosforitanů v těchto vzorcích jako příliš vhodný postup, a je proto nutné hledat jinou alternativní analýzu.

7 Literatura

1. MITAŠOVÁ, Katarína. Vliv fosforitanů na obsah polyfenolů u zemědělských plodin [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-11-20]. Dostupné z: <<https://is.muni.cz/th/kfkg4/>>. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Tomáš Kašparovský.
2. ÚKZÚZ. Jednotné pracovní postupy – Analýza půd I: 30072.1 Stanovení fosforu v extraktu podle Mehlicha 3 spektrofotometricky. BRNO. 2019. ISBN 978-80-7401-123-8.
3. Neto, J.A.G. & Ito, H.A. & Fernandes, K. & Moraes, M. & Cardoso, A.A.. (2000). Spectrophotometric determination of phosphite in fertilizers in a flow injection system with online sample preparation. Laboratory Robotics and Automation. 12. 286-290. 10.1002/1098-2728(2000)12:6<286::AID-LRA3>3.0.CO;2-D.

Ověření nové normy pro půdy a kaly – rozklad lučavkou královskou a zavedení nového mineralizačního bloku

Hotblock do rutinní práce v laboratoři

Eva Špačková, Eva Urbánková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

eva.spackova@ukzuz.cz

1 Úvod

Rozklad lučavkou královskou v laboratořích ÚKZÚZ je běžně používanou technikou pro rozklad/extrakci půd, kalů a sedimentů. Rozklad vzorků lučavkou královskou probíhá na pracovišti v mineralizačních blocích, které mají malou kapacitu (16 pozic). Vzorky jsou připravovány v mineralizačních trubicích, kde je třeba velké množství chemikálií. Vzorky se po rozkladu musejí filtrovat do odměrných baněk, kde jsou doplněny na definovaný objem a následně se přelévají do PE nádobek. Norma EN ISO 54321:2019 (1) popisuje rozklad vzorků v lučavce královské v zařízení HotBlock, které obsahuje více pozic (např. 54) a rozklad probíhá efektivněji. Jedná se tedy o rychlejší rozklad většího množství vzorků za použití menšího množství chemikálií ve srovnání se stávající metodou. Cílem práce bylo ověření této normy a zjistit možnost použití tohoto postupu v běžné laboratorní práci. Byl sledován vliv různé navážky vzorku, rozdíl výsledků mezi filtrovanými a nefiltrovanými vzorky a vliv teploty na rozklad vzorků. Vzhledem k tomu, že byly měřeny vzorky nefiltrované, bylo také potřeba zjistit, zda nedochází k následnému loužení analytů z pevného podílu zbytku vzorku po extrakci.

2 Experimentální část

2. 1. Chemikálie

2.1.1 Demineralizovaná voda, ultračistá.

2.1.2 Kyselina dusičná, HNO₃, koncentrovaná, 65% (m/m), c = 14,4 mol/l, p. a., (LachNer, Česká republika).

2.1.3 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná, 36% (m/m), $c = 11,7 \text{ mol/l}$, p. a., (LachNer, Česká republika).

2.1.4 Základní standardní směsný roztok As, Cr, Cd, Pb, Ni, V, Zn, Mn, Cu, Co, Be, Mo, $c = 100 \text{ mg/l}$ (Analytika, Česká republika).

2.1.5 Základní standardní jednoprvkový roztok S $c = 1000 \text{ mg/l}$ (Analytika, Česká republika).

2.1.6 Základní jednoprvkové standardní roztoky Ca, Mg, K, Na, Al, Fe, P, $c = 1000 \text{ mg/l}$ (Analytika, Česká republika).

2.2 Zařízení

2.2.1 Analytické váhy.

2.2.2 Rozkladné zařízení HOTBLOCK (Environmental Express, USA).

2.2.3 Plastové uzavíratelné nádoby (objem 50 ml).

2.2.4 ICP-OES spektrometr SPECTROBLUE (SPECTRO, Německo).

2.2.5 Zařízení na přípravu ultračisté vody MilliQ Advantage A10 (Millipore, Francie).

2.2.6 Skleněné odměrné baňky.

2.3 Příprava vzorků

2.3.1 Extrakce půd lučavkou královskou

Vzorek byl navážen do 50 ml PE nádoby, byly přidány 2 ml HNO_3 (resp. 3 ml HNO_3), po uklidnění reakce bylo přidáno 6 ml HCl (resp. 9 ml HCl). Nádoba byla uzavřena víčkem, které nebylo pevně dotaženo. Takto připravené vzorky byly umístěny do mineralizačního zařízení HotBlock a byly rozkládány 2 h. Po vytemperování na laboratorní teplotu byly nádoby doplněny demineralizovanou vodou po značku.

A – navážka 1 g vzorku, 2 ml HNO_3 , 6 ml HCl, nefiltrované extrakty

B – navážka 1 g vzorku, 2 ml HNO_3 , 6 ml HCl, filtrované extrakty

C – navážka 2 g vzorku, 3 ml HNO_3 , 9 ml HCl, nefiltrované extrakty

2.3.2 Extrakce kalů lučavkou královskou

Vzorek (0,5 g) byl navážen do 50 ml PE nádoby, byly přidány 2 ml HNO_3 , po uklidnění reakce bylo přidáno 6 ml HCl. Nádoba byla uzavřena víčkem, které nebylo pevně dotaženo. Takto připravené vzorky byly umístěny do mineralizačního zařízení HotBlock a byly rozkládány 2 h. Po vytemperování na laboratorní teplotu byly nádoby doplněny demineralizovanou vodou po značku.

2.4 Měření

Analýza extraktů/mineralizátů byla prováděna metodou ICP-OES, v neředěných a ředěných (5 ×) mineralizátech podle obsahů analytů. V tabulce 1 jsou uvedeny pracovní podmínky pro ICP-OES techniku.

Tabulka 1. Pracovní podmínky ICP-OES spektrometru.

Parametr	Mikroelementy a rizikové prvky	Makroprvky
Výkon (W)	1650	1400
Plazmový plyn (l/min)	14,5	
Auxiliary plyn (l/min)	1,0	
Zmlžovač (l/min)	1,0	
Proplach (s)	40	
Měřicí mód	Standardní	Rychlý
Doba měření (s)	36	5

Směsné kalibrační roztoky byly připravovány podle Jednotných pracovních postupů (2). V tabulce 2 jsou uvedeny použité vlnové délky měřených analytů.

Tabulka 2. Spektrální čáry měřených prvků.

Prvek	Spektrální čáry	Další sp. čáry
	λ (nm)	λ (nm)
As	189,042 I	197,0262 I
Mo	202,095 II	
Zn	213,856 I	
Pb	220,353 II	168,215 II
Co	228,616 II	
Cd	228,802 I	
Ni	231,604 II	
Cr	267,716 II	357,869 I
V	292,464 II	

Be	313,042 II	
Cu	327,396 I	324,754 I
S	182,034 I	
Mn	257,611 II	
Fe	259,941 II	
Mg	285,213 I	
Ca	317,933 II	422,673 I
Al	394,401 I	
Na	598,592 I	
K	769,896 I	766,491 I
P	177,495 I	213,618 I

3. Výsledky a diskuse

Pro sledování výtěžnosti jednotlivých rozkladů/extrakcí bylo vybráno 12 vzorků půd z MPZ WEPAL a 12 vzorků kalů z MPZ WEPAL. Získané výsledky byly srovnány s hodnotami MPZ WEPAL v rámci nejistoty stanovení.

V tabulkách 3-22 jsou uvedeny výsledky obsahů jednotlivých prvků v půdách. Kromě výše uvedených různých podmínek extrakce (vliv navážky, vliv filtrace extraktu), byl sledován vliv vyšší teploty (115 °C a 125 °C) na výtěžnost extrakce.

Tabulka 3. Arsen (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	16,76 ± 1,68	16,21 ± 1,62	16,12 ± 1,61	16,53 ± 1,65	17,59 ± 1,76	17,01 ± 1,70	15,80 ± 1,27
879	13,00 ± 3,90	12,53 ± 3,76	12,83 ± 3,85	13,01 ± 3,90	13,73 ± 4,11	13,92 ± 4,18	13,00 ± 1,08
919	4,61 ± 2,31	4,75 ± 2,38	4,10 ± 2,05	4,85 ± 2,42	4,77 ± 2,39	4,96 ± 2,48	4,43 ± 0,28
883	0,47 ± 0,24	0,47 ± 0,24	0,47 ± 0,23	0,52 ± 0,26	0,52 ± 0,26	0,51 ± 0,26	0,55 ± 0,21
993	3,20 ± 1,60	2,99 ± 1,49	2,68 ± 1,34	2,91 ± 1,45	3,32 ± 1,66	3,34 ± 1,67	2,67 ± 0,27
853	3,12 ± 1,56	2,90 ± 1,45	2,71 ± 1,36	2,75 ± 1,38	2,98 ± 1,49	3,04 ± 1,52	2,70 ± 0,23
854	49,31 ± 4,93	45,48 ± 4,55	44,04 ± 4,40	46,70 ± 4,67	49,85 ± 4,99	47,98 ± 4,80	43,70 ± 2,59
884	16,03 ± 1,60	15,08 ± 1,51	14,39 ± 4,32	15,19 ± 1,52	15,89 ± 1,89	15,36 ± 1,54	14,60 ± 0,79
873	17,65 ± 1,77	16,18 ± 1,62	15,69 ± 1,57	16,81 ± 1,68	17,57 ± 1,76	17,16 ± 1,72	17,00 ± 2,01
870	15,77 ± 1,58	13,94 ± 1,39	13,10 ± 3,93	14,44 ± 4,42	15,36 ± 1,54	15,57 ± 1,56	14,70 ± 1,00
989	46,96 ± 4,77	43,48 ± 4,35	39,73 ± 3,77	43,54 ± 4,35	48,40 ± 4,84	44,63 ± 4,46	42,30 ± 3,40
862	4,76 ± 2,38	4,60 ± 2,30	4,30 ± 2,15	4,50 ± 2,24	4,48 ± 1,34	4,80 ± 1,44	4,30 ± 0,26

Tabulka 4. Berylium (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	0,60 ± 0,12	0,59 ± 0,12	0,59 ± 0,12	0,59 ± 0,12	0,65 ± 0,13	0,62 ± 0,12	0,61
879	1,07 ± 0,21	1,07 ± 0,21	1,12 ± 0,22	1,12 ± 0,22	1,24 ± 0,25	1,15 ± 0,23	1,21
919	0,11 ± 0,06	0,12 ± 0,06	0,10 ± 0,05	0,11 ± 0,06	0,11 ± 0,06	0,12 ± 0,06	0,09
883	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,06 ± 0,01
993	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,15 ± 0,07	0,17 ± 0,08	0,19 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,16 ± 0,03
853	0,09 ± 0,04	0,08 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,08 ± 0,04	0,08 ± 0,04	0,08 ± 0,02
854	1,72 ± 0,34	1,60 ± 0,32	1,51 ± 0,30	1,58 ± 0,32	1,73 ± 0,34	1,67 ± 0,33	1,57 ± 0,14
884	0,98 ± 0,20	0,94 ± 0,19	0,86 ± 0,17	0,94 ± 0,19	1,02 ± 0,20	0,96 ± 0,19	0,92
873	1,99 ± 0,40	1,85 ± 0,37	1,74 ± 0,35	1,85 ± 0,37	2,02 ± 0,40	1,89 ± 0,38	1,94
870	1,69 ± 0,33	1,48 ± 0,30	1,36 ± 0,27	1,52 ± 0,30	1,72 ± 0,34	1,64 ± 0,33	1,59
989	1,64 ± 0,33	1,56 ± 0,31	1,36 ± 0,27	1,49 ± 0,30	1,67 ± 0,33	1,52 ± 0,30	1,55 ± 0,12
862	0,11 ± 0,06	0,11 ± 0,05	0,10 ± 0,05	0,11 ± 0,05	0,12 ± 0,06	0,12 ± 0,06	0,09

Tabulka 5. Kadmium (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	1,93 ± 0,48	1,75 ± 0,44	1,53 ± 0,38	1,53 ± 0,38	1,78 ± 0,45	1,60 ± 0,40	1,27 ± 0,16
879	0,37 ± 0,19	0,41 ± 0,20	0,36 ± 0,18	0,38 ± 0,19	0,43 ± 0,22	0,38 ± 0,19	0,28 ± 0,05
919	0,31 ± 0,16	0,32 ± 0,16	0,28 ± 0,14	0,31 ± 0,16	0,32 ± 0,16	0,33 ± 0,16	0,26 ± 0,03
883	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01
993	13,30 ± 2,00	12,65 ± 1,90	11,66 ± 1,75	11,75 ± 1,76	13,38 ± 2,01	13,65 ± 2,05	11,80 ± 0,70
853	0,12 ± 0,06	0,12 ± 0,06	0,13 ± 0,06	0,12 ± 0,06	0,13 ± 0,07	0,14 ± 0,07	0,11 ± 0,02
854	8,22 ± 1,23	7,71 ± 1,16	7,31 ± 1,10	7,56 ± 1,13	8,48 ± 1,27	8,17 ± 1,23	6,79 ± 0,67
884	0,42 ± 0,21	0,39 ± 0,20	0,37 ± 0,18	0,39 ± 0,20	0,41 ± 0,20	0,37 ± 0,19	0,28 ± 0,03
873	0,30 ± 0,15	0,28 ± 0,14	0,25 ± 0,12	0,27 ± 0,13	0,27 ± 0,13	0,24 ± 0,12	0,17 ± 0,04
870	0,71 ± 0,18	0,63 ± 0,16	0,58 ± 0,15	0,62 ± 0,15	0,75 ± 0,19	0,68 ± 0,17	0,54 ± 0,07
989	10,16 ± 1,52	9,63 ± 1,44	8,63 ± 1,29	9,24 ± 1,39	10,43 ± 1,56	9,82 ± 1,47	8,28 ± 0,72
862	0,32 ± 0,16	0,31 ± 0,15	0,29 ± 0,15	0,32 ± 0,16	0,35 ± 0,17	0,33 ± 0,16	0,27 ± 0,02

Tabulka 6. Kobalt (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	6,31 ± 0,95	6,38 ± 0,96	6,60 ± 0,99	6,72 ± 1,00	7,04 ± 1,06	6,62 ± 0,99	6,03 ± 0,38
879	9,62 ± 1,64	9,66 ± 1,46	9,85 ± 1,48	10,02 ± 1,50	10,68 ± 1,60	10,21 ± 1,53	8,98 ± 0,63
919	0,80 ± 0,40	0,50 ± 0,45	0,78 ± 0,39	0,85 ± 0,43	0,84 ± 0,42	0,86 ± 0,43	0,79 ± 0,15
883	1,07 ± 0,53	1,13 ± 0,57	1,10 ± 0,55	1,18 ± 0,59	1,08 ± 0,54	1,19 ± 0,60	1,10 ± 0,22
993	3,83 ± 0,57	3,58 ± 0,54	3,46 ± 0,52	3,47 ± 0,52	3,81 ± 0,57	3,59 ± 0,54	3,09 ± 0,26
853	1,44 ± 0,72	1,44 ± 0,72	1,32 ± 0,66	1,35 ± 0,68	1,40 ± 0,70	1,40 ± 0,70	1,29 ± 0,20
854	21,89 ± 3,28	21,35 ± 3,20	20,02 ± 3,00	20,90 ± 3,14	22,04 ± 3,31	20,88 ± 3,13	18,50 ± 1,33
884	9,10 ± 1,36	8,80 ± 1,32	8,42 ± 1,26	9,14 ± 1,37	9,35 ± 1,40	8,78 ± 1,32	8,00 ± 0,96
873	13,18 ± 1,98	12,94 ± 1,94	12,04 ± 1,81	12,89 ± 1,93	13,59 ± 2,04	12,90 ± 1,93	11,40 ± 1,43
870	15,17 ± 2,27	14,54 ± 2,18	13,23 ± 1,98	14,43 ± 2,16	15,37 ± 2,31	14,88 ± 2,23	13,20 ± 1,28
989	21,44 ± 3,22	20,99 ± 3,15	18,65 ± 2,80	20,43 ± 3,06	22,14 ± 3,32	20,01 ± 3,00	18,80 ± 0,92
862	0,82 ± 0,41	0,85 ± 0,43	0,78 ± 0,39	0,84 ± 0,42	0,89 ± 0,45	0,82 ± 0,41	0,74 ± 0,09

Tabulka 7. Chrom (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	34,32 ± 5,15	33,64 ± 5,05	33,48 ± 5,02	41,41 ± 6,21	39,24 ± 5,89	35,36 ± 5,30	34,00 ± 4,17
879	39,93 ± 5,99	39,54 ± 5,93	39,26 ± 5,89	40,16 ± 6,02	45,33 ± 6,80	42,75 ± 6,41	42,90 ± 5,06
919	25,33 ± 3,80	26,61 ± 3,99	23,34 ± 3,50	24,51 ± 3,68	27,15 ± 6,07	27,60 ± 4,14	26,00 ± 2,27
883	71,72±10,76	70,47 ±10,57	64,83 ± 9,72	69,49±10,42	70,08 ±10,51	76,21 ±11,43	68,70 ± 6,86
993	127,9 ± 19,2	120,14 ±18,0	108,9 ± 16,3	111,3 ± 16,7	128,8 ± 19,3	125,3 ± 18,8	115,0 ± 9,2
853	77,14±11,57	72,43 ±10,86	66,52 ± 9,98	67,99±10,20	74,35 ±11,15	77,25 ±11,59	73,80±11,43
854	171,6 ± 25,7	168,1 ±25,2	149,9 ± 22,5	154,9 ± 23,2	127,3 ±25,8	167,7 ± 25,2	159,0 ±16,0
884	68,08±10,21	64,42 ±9,66	60,99 ± 9,15	65,23 ± 9,78	69,97 ±10,50	66,67 ±10,00	64,70 ± 4,30
873	54,77 ± 8,22	51,42 ± 7,71	47,56 ± 7,13	50,24 ± 7,54	55,06 ± 8,26	53,78 ± 8,09	51,10 ± 4,49
870	55,62 ± 8,34	51,15 ± 7,67	46,02 ± 6,90	51,23 ± 7,68	55,98 ± 8,40	55,58 ± 8,34	54,00 ± 4,99
989	193,0 ± 30,0	183,5 ±27,5	160,3 ± 24,0	174,7 ± 26,2	199,2 ± 29,9	184,6 ± 27,7	184,0 ±14,3
862	22,89 ± 3,43	21,89 ± 3,28	20,87 ± 3,13	22,16 ± 3,32	24,90 ± 3,73	22,94 ± 3,44	23,10 ± 3,24

Tabulka 8. Měď (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	53,98 ± 8,10	53,10 ± 7,97	51,58 ± 7,77	62,20 ± 9,33	67,21 ± 10,08	54,08 ± 8,11	48,00 ± 4,98
879	18,74 ± 2,81	18,89 ± 2,83	18,21 ± 2,73	18,35 ± 2,75	20,69 ± 3,10	20,78 ± 3,12	17,40 ± 2,00
919	13,02 ± 1,95	13,41 ± 2,01	12,89 ± 1,93	12,06 ± 1,81	13,26 ± 1,99	12,94 ± 1,94	12,00 ± 0,77
883	4,75 ± 2,37	5,01 ± 2,50	4,74 ± 2,37	4,92 ± 2,46	5,18 ± 0,78	5,32 ± 0,80	5,00 ± 0,51
993	61,95 ± 9,29	62,61 ± 9,40	45,19 ± 6,78	58,86 ± 8,83	64,80 ± 9,72	66,98 ± 10,04	60,80 ± 4,57
853	6,59 ± 0,99	6,78 ± 1,02	6,36 ± 0,95	6,53 ± 0,98	6,84 ± 1,03	6,86 ± 1,03	6,88 ± 1,16
854	148,8 ± 22,3	150,5 ± 22,6	141,4 ± 21,2	143,4 ± 21,5	158,9 ± 23,8	164,3 ± 24,1	136,5 ± 12,1
884	13,88 ± 2,08	14,18 ± 2,13	13,54 ± 2,03	13,16 ± 1,97	15,30 ± 2,30	14,72 ± 2,21	12,70 ± 1,61
873	17,70 ± 2,66	18,10 ± 2,71	16,93 ± 2,54	16,55 ± 2,48	19,60 ± 2,94	19,16 ± 2,87	15,60 ± 2,02
870	24,67 ± 3,70	23,83 ± 3,57	22,59 ± 3,39	22,75 ± 3,41	25,48 ± 3,92	24,96 ± 3,24	22,00 ± 1,70
989	170,4 ± 25,6	167,1 ± 25,1	161,3 ± 24,2	159,1 ± 23,9	179,7 ± 27,0	174,1 ± 26,1	152,0 ± 8,20
862	13,20 ± 1,98	13,24 ± 1,99	14,21 ± 2,13	12,85 ± 1,93	15,09 ± 2,26	14,35 ± 2,15	12,20 ± 0,65

Tabulka 9. Molybden (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	1,27 ± 0,63	1,22 ± 0,61	1,29 ± 0,64	1,36 ± 0,68	1,54 ± 0,31	1,50 ± 0,30	1,25 ± 0,19
879	0,36 ± 0,18	0,45 ± 0,22	0,67 ± 0,33	0,66 ± 0,33	0,57 ± 0,28	0,47 ± 0,24	0,47 ± 0,17
919	0,43 ± 0,21	0,45 ± 0,23	0,40 ± 0,20	0,43 ± 0,21	0,46 ± 0,23	0,46 ± 0,23	0,39 ± 0,09
883	2,47 ± 0,49	2,34 ± 0,47	2,38 ± 0,48	2,47 ± 0,49	2,86 ± 0,57	2,85 ± 0,57	2,63 ± 0,19
993	2,52 ± 0,50	2,38 ± 0,48	2,19 ± 0,44	2,24 ± 0,45	2,48 ± 0,50	2,59 ± 0,52	2,34 ± 0,20
853	3,97 ± 0,79	3,75 ± 0,75	3,46 ± 0,69	3,56 ± 0,71	3,89 ± 0,79	3,92 ± 0,78	3,64 ± 0,39
854	1,68 ± 0,33	1,37 ± 0,27	1,66 ± 0,33	1,71 ± 0,34	1,87 ± 0,37	1,28 ± 0,64	1,28 ± 0,22
884	1,13 ± 0,57	1,23 ± 0,61	0,96 ± 0,48	1,29 ± 0,65	1,21 ± 0,60	1,28 ± 0,64	1,18 ± 0,17
873	2,32 ± 0,46	1,81 ± 0,36	2,19 ± 0,44	2,01 ± 0,40	2,56 ± 0,51	1,86 ± 0,37	1,97 ± 0,24
870	1,12 ± 0,56	0,51 ± 0,25	0,87 ± 0,43	1,14 ± 0,57	1,17 ± 0,58	0,85 ± 0,42	0,78 ± 0,19
989	1,95 ± 0,39	1,38 ± 0,28	1,69 ± 0,34	1,77 ± 0,35	2,09 ± 0,42	1,41 ± 0,28	1,51 ± 0,13
862	1,00 ± 0,50	0,94 ± 0,47	0,93 ± 0,46	0,98 ± 0,49	1,15 ± 0,57	1,05 ± 0,52	0,94 ± 0,07

Tabulka 10. Nikl (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	17,68 ± 2,65	18,23 ± 2,73	17,31 ± 2,60	21,30 ± 3,19	19,56 ± 2,93	17,28 ± 2,59	16,90 ± 1,52
879	28,04 ± 4,21	29,51 ± 4,43	28,35 ± 4,25	28,70 ± 4,31	31,66 ± 4,75	29,68 ± 4,45	27,2 ± 2,96
919	6,79 ± 1,02	7,63 ± 1,14	6,71 ± 1,01	7,10 ± 1,06	7,51 ± 1,13	7,71 ± 1,16	7,46 ± 0,69
883	19,08 ± 2,86	19,91 ± 2,99	18,65 ± 2,80	19,84 ± 2,98	18,98 ± 2,85	21,09 ± 3,16	18,80 ± 1,72
993	36,79 ± 5,52	36,50 ± 5,47	32,40 ± 4,86	33,17 ± 4,98	37,07 ± 5,56	37,83 ± 5,67	34,70 ± 3,18
853	21,31 ± 3,20	21,28 ± 3,19	18,80 ± 2,82	19,70 ± 2,95	21,17 ± 3,18	21,11 ± 3,17	20,60 ± 1,83
854	59,44 ± 8,92	58,64 ± 8,80	52,75 ± 7,94	55,58 ± 8,34	60,31 ± 9,05	56,25 ± 8,44	53,00 ± 3,87
884	43,06 ± 6,46	43,30 ± 6,50	39,23 ± 5,88	41,80 ± 6,27	44,40 ± 6,66	41,12 ± 6,17	40,00 ± 2,67
873	33,21 ± 4,98	32,86 ± 4,93	29,51 ± 4,43	31,57 ± 4,74	33,55 ± 5,03	32,16 ± 4,82	29,90 ± 3,53
870	42,64 ± 6,40	41,21 ± 6,18	36,33 ± 5,45	40,67 ± 6,10	43,23 ± 6,48	42,06 ± 6,31	39,20 ± 2,59
989	60,50 ± 9,08	59,88 ± 8,98	51,40 ± 7,71	56,26 ± 8,44	62,94 ± 9,44	56,03 ± 8,40	55,00 ± 4,47
862	6,03 ± 0,90	6,15 ± 0,92	5,58 ± 0,84	6,56 ± 0,98	6,19 ± 0,93	6,11 ± 0,92	6,38 ± 0,65

Tabulka 11. Olovo (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	289,3 ± 43,4	279,2 ± 41,9	251,7 ± 37,8	245,4 ± 36,8	297,8 ± 44,7	279,2 ± 41,9	231,0 ± 26,3
879	25,37 ± 3,81	24,38 ± 3,66	31,56 ± 4,73	21,30 ± 3,20	26,45 ± 3,97	25,91 ± 3,89	29,90 ± 4,39
919	13,97 ± 2,10	14,95 ± 2,24	11,13 ± 1,67	12,67 ± 1,90	13,18 ± 2,07	13,72 ± 2,06	14,50 ± 1,02
883	2,64 ± 1,32	2,80 ± 1,40	2,67 ± 1,34	2,65 ± 1,33	2,74 ± 1,37	2,97 ± 1,49	3,13 ± 0,59
993	67,95 ± 10,19	63,79 ± 9,57	58,31 ± 8,75	57,42 ± 8,61	68,51 ± 10,28	76,56 ± 11,48	61,70 ± 4,81
853	13,37 ± 2,01	13,52 ± 2,03	11,08 ± 1,66	11,76 ± 1,75	12,87 ± 1,93	13,94 ± 2,09	14,30 ± 1,47
854	342,8 ± 51,4	313,8 ± 47,1	286,2 ± 48,9	290,8 ± 44,7	348,8 ± 52,3	342,6 ± 51,4	296,0 ± 30,6
884	17,64 ± 2,65	16,41 ± 2,46	9,28 ± 1,39	11,61 ± 1,74	11,62 ± 1,74	11,31 ± 1,70	18,40 ± 2,57
873	18,41 ± 2,76	21,58 ± 3,24	18,99 ± 2,85	24,46 ± 3,67	18,77 ± 2,82	22,35 ± 3,35	20,50 ± 4,54
870	33,69 ± 5,05	31,26 ± 4,69	28,00 ± 4,20	29,87 ± 4,48	34,95 ± 5,24	33,65 ± 5,05	33,00 ± 4,23
989	328,4 ± 49,3	301,9 ± 45,3	258,3 ± 38,7	282,4 ± 42,4	335,2 ± 55,3	328,2 ± 49,2	282,0 ± 18,4
862	14,02 ± 2,10	13,95 ± 2,09	11,99 ± 1,80	12,75 ± 1,91	15,47 ± 7,73	14,53 ± 7,27	14,70 ± 1,02

Tabulka 12. Vanad (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	27,37 ± 4,10	29,58 ± 4,43	28,73 ± 4,31	28,97 ± 4,35	29,86 ± 4,48	28,62 ± 4,29	31,10 ± 2,26
879	38,13 ± 5,72	41,56 ± 6,23	41,83 ± 6,27	41,76 ± 6,26	43,17 ± 6,47	41,63 ± 6,24	48,30 ± 4,87
919	20,60 ± 3,08	22,62 ± 3,93	19,35 ± 2,90	20,65 ± 3,10	20,61 ± 3,09	20,95 ± 3,14	19,80 ± 1,30
883	18,77 ± 2,81	19,93 ± 2,99	16,45 ± 2,47	17,69 ± 2,65	16,65 ± 2,50	18,05 ± 2,71	16,00 ± 0,76
993	40,21 ± 6,03	41,23 ± 6,18	32,82 ± 4,92	36,58 ± 5,49	39,82 ± 5,97	40,59 ± 6,09	37,00 ± 2,47
853	8,83 ± 1,32	9,37 ± 1,41	8,44 ± 1,27	8,58 ± 1,29	8,43 ± 1,26	8,97 ± 1,35	8,17 ± 0,81
854	54,23 ± 8,13	55,21 ± 8,28	51,81 ± 7,71	54,08 ± 8,11	54,62 ± 8,19	55,13 ± 8,27	54,10 ± 5,73
884	53,69 ± 8,05	55,88 ± 8,38	51,77 ± 7,77	54,36 ± 8,15	55,46 ± 8,32	53,80 ± 8,07	55,00 ± 3,14
873	63,43 ± 9,51	64,77 ± 9,72	60,87 ± 9,13	62,60 ± 9,39	63,85 ± 9,58	62,52 ± 9,38	68,50 ± 6,58
870	54,10 ± 8,11	52,93 ± 7,94	48,85 ± 7,33	52,83 ± 7,92	54,35 ± 8,15	53,91 ± 8,09	56,30 ± 3,87
989	53,27 ± 7,99	54,74 ± 8,21	48,67 ± 7,30	51,69 ± 7,75	54,25 ± 8,14	51,11 ± 7,67	56,90 ± 5,68
862	19,63 ± 2,94	20,18 ± 3,03	19,15 ± 2,87	19,51 ± 2,93	21,30 ± 3,19	20,14 ± 3,02	19,10 ± 1,03

Tabulka 13. Zinek (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	416,9 ± 62,5	409,7 ± 61,5	396,3 ± 59,4	394,0 ± 59,1	447,5 ± 67,1	402,3 ± 62,3	366,0 ± 22,8
879	90,06 ± 13,51	89,04 ± 13,36	87,85 ± 13,18	89,98 ± 13,50	99,54 ± 14,93	96,81 ± 14,52	85,30 ± 4,87
919	27,27 ± 4,09	28,51 ± 4,28	23,49 ± 3,52	25,56 ± 3,83	26,17 ± 3,93	28,33 ± 4,25	26,10 ± 1,50
883	4,39 ± 2,19	4,38 ± 2,19	4,62 ± 0,69	4,74 ± 0,71	3,94 ± 1,97	6,02 ± 3,01	5,79 ± 0,86
993	185,3 ± 27,8	176,4 ± 26,5	162,2 ± 24,3	163,9 ± 24,6	187,8 ± 28,2	189,7 ± 28,4	172,0 ± 10,8
853	10,63 ± 5,32	10,25 ± 5,13	10,57 ± 1,59	9,85 ± 1,48	10,75 ± 1,61	11,60 ± 1,74	11,10 ± 1,71
854	1104 ± 166	1049 ± 157	998,0 ± 150	1045 ± 157	1135 ± 170	1068 ± 160	1011 ± 75
884	54,49 ± 8,17	52,63 ± 7,89	49,18 ± 7,38	51,90 ± 7,78	56,69 ± 8,50	53,25 ± 7,99	50,10 ± 2,74
873	53,02 ± 7,95	49,74 ± 7,46	47,02 ± 7,05	48,17 ± 7,22	54,52 ± 8,18	52,53 ± 7,88	47,90 ± 4,27
870	105,0 ± 15,7	96,89 ± 14,83	88,60 ± 13,29	96,95 ± 14,54	105,6 ± 15,8	104,0 ± 15,6	93,40 ± 4,29
989	1108 ± 166	1059 ± 159	957,0 ± 143,6	1028 ± 154	1141 ± 171	1024 ± 154	994,0 ± 46,6
862	27,06 ± 4,06	26,16 ± 3,92	25,38 ± 3,81	25,78 ± 3,87	27,74 ± 4,16	27,13 ± 4,07	25,40 ± 2,30

Tabulka 14. Síra (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	4000 ± 600	3923 ± 588	3999 ± 600	4089 ± 613	4364 ± 654	4131 ± 620	3729 ± 255
879	2416 ± 362	2416 ± 362	2489 ± 373	2530 ± 380	2677 ± 402	2590 ± 388	2304 ± 251
919	233,2 ± 35,0	242,6 ± 36,4	216,7 ± 32,5	235,1 ± 35,3	243,4 ± 36,5	241,4 ± 36,2	215,0 ± 14,8
883	87,22±13,08	86,42 ±12,96	92,31±13,85	90,86 ±13,63	101,3 ±15,20	93,26±13,99	85,00 ± 6,83
993	1525 ± 228	1488 ± 223	1343 ± 201	1293 ± 194	1559 ± 234	1565 ± 234	1358 ± 96
853	163,0 ± 24,5	160,2 ± 24,0	157,4 ± 23,6	162,1 ± 24,3	161,1 ± 24,2	165,7 ± 24,9	156,0 ± 5,3
854	1026 ± 154	988,5 ±148,3	982,3±147,3	1022 ± 153	1064 ± 160	1013 ± 152	937,0 ± 95,4
884	431,7 ± 64,8	425,1 ± 63,8	408,6 ± 61,3	432,9 ± 64,9	454,6 ± 68,2	419,8 ± 63,0	400,0 ± 11,8
873	159,0 ± 23,8	152,2 ± 22,8	151,9 ± 22,8	157,2 ± 23,6	167,1 ± 25,1	157,4 ± 23,6	133,0 ± 31,7
870	263,3 ± 39,5	245,5 ± 36,8	238,6 ± 35,8	255,2 ±38,3	268,1 ± 40,2	257,5 ± 38,6	241,0 ± 30,8
989	1324 ± 199	1269 ± 190	1214 ± 182	1294 ± 194	1360 ± 204	1237 ± 186	1224 ± 117
862	228,9 ± 34,3	226,1 ± 33,9	221,3 ± 33,2	229,1 ± 34,4	253,8 ± 38,1	233,0 ± 34,9	215,0 ± 12,0

Tabulka 15. Mangan (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	260,3 ± 39,0	255,4 ± 38,3	242,7 ± 36,4	245,3 ± 36,8	285,7 ± 42,9	269,4 ± 40,4	239,0 ± 13,9
879	849,2±127,4	832,5 ±124,9	807,0±121,1	809,3 ±121,4	924,1±138,6	888,0 ±133,2	779,0 ± 53,9
919	192,5 ± 28,9	198,8 ± 29,8	171,0 ± 25,6	186,3 ± 27,9	196,9 ± 29,5	203,9 ± 30,6	178,0 ± 12,2
883	39,76±19,88	39,07 ±19,54	39,41±19,70	39,78 ±19,89	40,74 ±20,37	44,08 ±22,04	39,50 ± 3,55
993	271,0 ± 40,6	256,4 ± 38,5	224,4 ± 33,7	219,2 ± 32,9	263,1 ± 39,5	276,8 ± 41,5	238,0 ± 15,3
853	50,08±25,04	47,04 ±23,52	42,25±21,12	43,27 ±21,64	49,19 ±19,68	50,47 ± 19	46,40 ± 4,78
854	1262 ± 189	1197 ± 180	1100 ± 165	1148 ± 172	1288 ± 193	1240 ± 186	1080 ± 83
884	919,2±137,9	874,9 ±131,2	789,7±118,4	842,4 ±126,4	934,4±140,2	854,1 ±128,1	795,0 ± 57,1
873	625,4 ± 93,8	583,2 ± 87,5	538,8 ± 80,8	564,3 ± 84,6	649,9 ± 97,5	612,9 ± 91,9	539,0 ± 60,0
870	1384 ± 208	1272 ± 190	1166 ± 175	1208 ± 181	1387 ± 208	1340 ± 201	1231 ± 95
989	1178 ± 177	1113 ± 167	989,1±148,4	1055 ± 158	1219 ± 183	1115 ± 167	1020 ± 52
862	187,3 ± 28,1	176,8 ± 26,5	163,1 ± 24,5	175,2 ± 26,3	208,0 ± 31,2	190,8 ± 28,6	177,0 ± 10,7

Tabulka 16. Hořčík (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	3853 ± 578	3803 ± 570	3789 ± 568	3802 ± 570	3983 ± 597	3890 ± 584	3700 ± 157
879	8581 ± 1287	8358 ± 1254	8307 ± 1246	8357 ± 1253	8992 ± 1349	8970 ± 1346	8356 ± 943
919	330,3 ± 49,5	304,9 ± 45,7	286,6 ± 43,0	286,0 ± 42,9	299,9 ± 45,0	305,8 ± 45,9	300,1 ± 38,1
883	114,9 ± 17,2	103,5 ± 51,8	109,3 ± 54,7	110,5 ± 55,2	108,0 ± 16,2	118,4 ± 17,6	118,0 ± 16,4
993	515,4 ± 77,3	485,6 ± 72,8	456,1 ± 68,4	454,3 ± 68,1	504,2 ± 75,6	528,1 ± 79,2	485,0 ± 62,5
853	247,7 ± 37,1	232,3 ± 34,8	223,8 ± 111,9	211,8 ± 31,8	225,1 ± 33,8	241,9 ± 36,3	259,0 ± 40,2
854	9657 ± 1448	9282 ± 1392	9135 ± 1370	9057 ± 1358	9572 ± 1436	9617 ± 1443	9385 ± 746
884	4444 ± 666	4247 ± 637	4164 ± 625	4295 ± 644	4492 ± 674	4300 ± 645	4190 ± 326
873	8981 ± 1347	8652 ± 1298	8673 ± 1301	8632 ± 1295	9082 ± 1362	9268 ± 1390	8273 ± 290
870	6034 ± 905	5824 ± 874	5745 ± 862	5704 ± 856	5980 ± 897	5608 ± 841	5685 ± 472
989	9470 ± 1421	9090 ± 1363	9079 ± 1362	8946 ± 1341	9486 ± 1423	9564 ± 1434	9443 ± 983
862	309,9 ± 46,5	278,3 ± 41,7	290,0 ± 43,5	289,0 ± 43,3	301,0 ± 45,1	318,2 ± 47,7	300,0 ± 42,4

Tabulka 17. Vápník (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	35159±5274	35044±5257	36019±5403	34388±5158	35654±5348	37133±5570	35700±2090
879	37126±5569	36904±5536	37165±5575	37187±5577	37924±5687	37366±5605	37100±3550
919	1622 ± 243	1560 ± 234	1382 ± 207	1448 ± 217	1409 ± 211	1401 ± 219	1430±169
883	277 ± 42	265 ± 66	288 ± 72	280 ± 70	286 ± 43	284 ± 43	270 ± 22
993	3498 ± 525	3461 ± 519	3178 ± 477	3061 ± 459	3359 ± 504	3376 ± 506	3310 ± 286
853	161 ± 24	150 ± 38	186 ± 46	157 ± 39	135 ± 20	155 ± 23	200 ± 40
854	35931±5390	36017±5403	35100±5265	34410±5161	35233±5285	34317±5148	35650±1360
884	6088 ± 913	600 5± 901	5778 ± 867	6016 ± 902	5956 ± 893	5636 ± 845	5550 ± 272
873	32803±4920	33163±4974	33125±4969	32489±4873	33538±5031	28867±4330	32700±3250
870	6956 ± 1044	6985±1048	6875 ± 1031	6998 ± 1050	6866 ± 1030	6592 ± 989	6540 ± 267
989	35925±5389	35653±5348	35934±5390	35915±5387	35496±5324	35370±5306	36100±2460
862	1463 ± 219	1401±210	1477 ± 222	1467 ± 220	1495 ± 224	1478 ± 222	1410 ± 117

Tabulka 18. Draslík (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	2428 ± 242	2334 ± 233	2242 ± 234	2317 ± 232	2472 ± 247	2543 ± 254	2890 ± 510
879	4570 ± 457	4530 ± 453	4230 ± 423	4420 ± 442	4925 ± 493	4454 ± 445	5661 ± 1066
919	269 ± 135	234 ± 117	209 ± 104	209 ± 104	233 ± 116	256 ± 128	320 ± 56
883	102 ± 51	98 ± 49	88 ± 44	89 ± 44	124 ± 62	116 ± 58	143 ± 26
993	219 ± 110	204 ± 102	174 ± 87	186 ± 93	220 ± 110	240 ± 120	291 ± 57
853	246 ± 123	235 ± 117	208 ± 104	212 ± 106	232 ± 116	267 ± 133	320 ± 55
854	4508 ± 451	4565 ± 456	4176 ± 418	4197 ± 420	4488 ± 449	4469 ± 447	5492 ± 1154
884	2101 ± 210	2042 ± 204	2105 ± 211	2014 ± 201	2182 ± 218	2202 ± 220	2671 ± 365
873	8235 ± 823	8066 ± 807	8781 ± 878	8491 ± 849	8025 ± 802	8333 ± 833	9335 ± 867
870	4083 ± 408	4504 ± 450	4687 ± 469	4592 ± 459	4821 ± 482	4865 ± 487	4932 ± 535
989	4905 ± 490	4956 ± 496	4677 ± 468	4500 ± 450	4832 ± 483	4907 ± 491	5490 ± 889
862	256 ± 128	212 ± 106	218 ± 109	218 ± 108	235 ± 118	275 ± 137	320 ± 60

Tabulka 19. Sodík (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	281 ± 42	269 ± 40	223 ± 33	233 ± 35	260 ± 39	257 ± 39	242 ± 38
879	212 ± 32	212 ± 32	186 ± 28	201 ± 30	248 ± 37	210 ± 31	222 ± 27
919	38 ± 19	36 ± 18	10 ± 5	23 ± 11	40 ± 20	26 ± 13	38 ± 9
883	29 ± 15	32 ± 16	61 ± 31	27 ± 14	136 ± 68	22 ± 11	29 ± 11
993	59 ± 29	64 ± 32	49 ± 63	59 ± 30	63 ± 31	59 ± 30	63 ± 13
853	30 ± 15	36 ± 18	32 ± 16	49 ± 24	36 ± 18	28 ± 14	45 ± 12
854	371 ± 56	378 ± 57	353 ± 53	343 ± 52	387 ± 57	362 ± 54	362 ± 55
884	95 ± 47	97 ± 49	44 ± 22	64 ± 32	105 ± 53	62 ± 31	106 ± 41
873	203 ± 30	199 ± 30	177 ± 27	179 ± 27	215 ± 32	195 ± 29	209 ± 29
870	130 ± 65	127 ± 63	105 ± 53	116 ± 58	124 ± 62	119 ± 59	150 ± 30
989	324 ± 48	311 ± 47	275 ± 41	286 ± 43	315 ± 47	316 ± 47	304 ± 39
862	25 ± 12	27 ± 14	12 ± 6	24 ± 12	59 ± 30	25 ± 12	29 ± 11

Tabulka 20. Fosfor (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	513 ± 77	540 ± 81	499 ± 75	499 ± 75	494 ± 74	529 ± 79	544 ± 29
879	642 ± 96	651 ± 98	660 ± 99	654 ± 98	672 ± 101	678 ± 102	693 ± 37
919	921 ± 138	988 ± 148	960 ± 144	929 ± 139	957 ± 144	952 ± 143	959 ± 86
883	61 ± 31	75 ± 38	77 ± 39	73 ± 37	86 ± 43	68 ± 34	87 ± 7
993	970 ± 146	930 ± 140	912 ± 137	996 ± 149	961 ± 144	995 ± 149	983 ± 68
853	109 ± 17	98 ± 49	123 ± 19	111 ± 17	98 ± 49	137 ± 21	131 ± 10
854	1952 ± 293	1906 ± 286	1928 ± 289	1874 ± 281	1955 ± 293	1927 ± 289	1900 ± 127
884	698 ± 105	671 ± 101	720 ± 108	698 ± 105	709 ± 106	720 ± 108	723 ± 71
873	201 ± 30	202 ± 30	198 ± 30	195 ± 29	212 ± 32	228 ± 34	242 ± 33
870	784 ± 118	785 ± 118	785 ± 118	810 ± 122	799 ± 120	817 ± 123	814 ± 89
989	2571 ± 386	2542 ± 381	2542 ± 381	2514 ± 377	2567 ± 385	2540 ± 381	2513 ± 172
862	949 ± 142	906 ± 136	931 ± 140	924 ± 139	916 ± 137	971 ± 146	979 ± 35

Tabulka 21. Železo (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	21702±3255	21677±3252	21929±3289	21739±3261	22309±3346	21523±3229	22300±1310
879	27218±4082	26795±4019	27100±4065	26979±4047	28090±4214	25857±3879	28000±2200
919	3082 ± 462	3005 ± 491	2696 ± 404	2863 ± 429	2842 ± 426	2892 ± 434	3000 ± 305
883	6042 ± 906	5906 ± 886	5622 ± 843	5819 ± 873	5698 ± 855	5882 ± 882	5790 ± 388
993	5826 ± 874	5608 ± 841	5240 ± 786	5228 ± 784	5599 ± 840	5731 ± 860	5630 ± 428
853	6578 ± 987	6339 ± 951	6121 ± 918	5551 ± 833	6169 ± 925	6286 ± 943	6510 ± 530
854	35793±5369	34123±5119	34471±5171	34048 ±5107	34918±5237	33583±5037	35400±3010
884	23095±3464	22182±3327	22470±3371	22565±3384	23020±3453	22261±3339	22600±1380
873	31842±4776	30814±4622	31420±4713	31508±4726	32315±4847	29273±4391	31400±2050
870	29828±4474	29213±4382	29426±4414	29582±4437	29985±4498	27893±4184	30000±1420
989	34994±5249	34129±5112	34362±5154	34274±5141	35078±5262	34433±5165	35000±1430
862	2810 ± 422	2607 ± 391	2805 ± 421	2773±416	2888 ± 433	2888 ± 433	2870 ± 268

Tabulka 22. Hliník (mg/kg).

Vzorek	HotBlock						MPZ WEPAL
	A 105 °C	A 105 °C po týdnu	A 115 °C	A 125 °C	B	C	
860	8146 ± 815	8013 ± 801	7895 ± 790	8097 ± 810	8400 ± 840	8497 ± 850	9050 ± 1014
879	19363±1936	19428±1943	18466±1847	19122±1912	20271±2027	18144±1814	22900±3670
919	5025 ± 502	4896 ± 490	4246 ± 425	4387 ± 439	4665 ± 467	4708 ± 471	4720 ± 475
883	5045 ± 505	4934 ± 493	5093 ± 509	5508 ± 551	5022 ± 502	5613 ± 561	7330 ± 2540
993	4200 ± 420	4050 ± 405	3677 ± 368	3701 ± 370	4233 ± 423	4364 ± 436	4300 ± 676
853	4100 ± 410	4006 ± 401	3743 ± 374	3718 ± 372	3836 ± 384	4085 ± 409	4230 ± 411
854	24212±2422	24059±2406	22867±2287	22776±2278	23692±2369	22473±2247	26500±3680
884	18024±1802	17663±1766	16618±1662	17392±1739	18417±1842	16889±1689	18000±2333
873	38451±3845	38037±3804	37632±3763	37297±3730	38097±3810	39400±3940	41500±5950
870	25323±2532	24770±2477	24064±2406	23693±2370	24543±2454	22938±2294	28000±5460
989	22875±2288	22533±2253	21838±2184	21489±21490	22727±2273	21452±2145	25900±3920
862	4617 ± 462	4407 ± 441	4479 ± 448	4393 ± 439	4788 ± 479	4885 ± 489	4570 ± 397

Pro všechny sledované analyty bylo zjištěno, že teplota 105 °C je pro extrakci dostačující. Stejně tak nebyl zjištěn zásadní vliv na obsah jednotlivých analytů ve filtrovaném a nefiltrovaném vzorku a dále nebyl pozorován nárůst obsahů zájmových prvků v nefiltrovaných extraktech měřených v odstavu 1 týdne.

Vliv vyšší navážky vzorku má pozitivní efekt na měření extraktů s ohledem na naměřené vyšší intenzity jednotlivých analytů, zvláště v nižších koncentračních úrovních a nižší RSD měření (vzhledem k velkému množství dat prezentovaných v tabulkách nebylo možné zařadit samostatně RSD měření). Nicméně v rámci nejistoty měření jsou navážky 1 g a 2 g srovnatelné, protože použitý ICP-OES spektrometr má dostačující meze detekce (meze stanovitelnosti) i pro měření nižších koncentračních úrovní mikroelementů a těžkých kovů v lučavkových extraktech při navážce 1 g vzorku.

Tabulka 23. Mikroelementy a těžké kovy v kalech (mg/kg).

Vzorek	HotBlock					
	262	263	273	238	265	268
As	6,89 ± 2,07	8,62 ± 2,59	11,35 ± 3,41	0,56 ± 0,28	5,25 ± 1,57	4,02 ± 2,01
MPZ WEPAL	7,09 ± 0,40	0,82 ± 0,19	12,80 ± 0,89	0,40	5,54 ± 0,58	4,59 ± 0,51
Be	0,45 ± 0,09	0,59 ± 0,12	2,47 ± 0,49	0,03 ± 0,02	0,36 ± 0,07	0,15 ± 0,08

MPZ WEPAL	0,48 ± 0,03	0,59 ± 0,12	2,43 ± 0,12	0,03 ± 0,01	0,39 ± 0,04	0,16 ± 0,09
Cd	0,38 ± 0,19	0,42 ± 0,21	1,56 ± 0,39	0,07 ± 0,03	0,45 ± 0,21	1,75 ± 0,44
MPZ WEPAL	0,37 ± 0,03	0,39 ± 0,03	1,19 ± 0,12	0,05 ± 0,01	0,45 ± 0,04	1,34 ± 0,09
Co	6,25 ± 0,94	7,62 ± 1,14	104,5 ± 15,7	0,45 ± 0,23	4,67 ± 0,70	6,02 ± 0,90
MPZ WEPAL	5,80 ± 0,44	7,20 ± 0,52	108,0 ± 7,6	0,44 ± 0,03	4,64 ± 0,21	6,25 ± 0,50
Cr	66,57 ± 9,99	61,96 ± 9,29	129,9 ± 19,5	4,31 ± 0,65	55,64 ± 8,35	73,35 ± 11,00
MPZ WEPAL	84,70 ± 17,45	72,80 ± 7,20	138,0 ± 12,3	4,52 ± 0,55	70,80 ± 17,2	78,00 ± 4,84
Cu	45,36 ± 6,80	45,51 ± 6,83	323,7 ± 48,6	15,61 ± 2,34	65,10 ± 9,76	265,5 ± 39,8
MPZ WEPAL	43,00 ± 2,14	44,70 ± 2,04	236,0 ± 22,9	15,66 ± 0,90	54,60 ± 3,06	269,0 ± 14,1
Mo	3,47 ± 0,69	2,87 ± 0,57	9,00 ± 1,80	0,40 ± 0,20	3,78 ± 0,76	5,55 ± 1,11
MPZ WEPAL	3,54 ± 0,40	2,88 ± 0,34	9,13 ± 0,38	0,53 ± 0,05	3,66 ± 0,36	6,06 ± 0,53
Ni	27,71 ± 4,16	32,24 ± 4,84	128,1 ± 19,2	2,70 ± 1,35	25,25 ± 3,79	42,70 ± 6,40
MPZ WEPAL	27,60 ± 1,64	32,30 ± 1,38	135,5 ± 6,4	2,62 ± 0,25	26,40 ± 1,76	44,0 ± 2,3
Pb	34,34 ± 5,15	28,54 ± 4,28	186,9 ± 28,0	2,94 ± 1,47	58,91 ± 8,84	48,27 ± 7,24
MPZ WEPAL	39,70 ± 3,66	34,55 ± 2,17	220,0 ± 12,0	1,90 ± 0,38	58,90 ± 3,17	60,00 ± 4,13
V	23,30 ± 3,49	31,37 ± 4,71	25,86 ± 3,88	1,37 ± 0,69	15,63 ± 2,34	8,42 ± 1,26
MPZ WEPAL	26,00	34,80	26,20 ± 4,60	1,70	19,50 ± 7,19	10,1 ± 2,76
Zn	131,2 ± 19,7	135,3 ± 20,3	662,0 ± 99,3	85,10 ± 12,77	182,9 ± 27,4	607,0 ± 91,0
MPZ WEPAL	135,0 ± 4,5	137,0 ± 4,8	710,0 ± 32,1	92,70 ± 4,42	187,0 ± 8,4	649,0 ± 30,9
S	1930 ± 289	1545 ± 232	10107 ± 1516	23519 ± 3528	2422 ± 363	7921 ± 1188
MPZ WEPAL	1942 ± 91	1503 ± 107	10000 ± 687	23128 ± 2881	2270 ± 427	7791 ± 953
Mn	614,4 ± 92,2	675,3 ± 101,3	528,0 ± 79,2	27,97 ± 13,98	395,2 ± 59,3	348,1 ± 52,2
MPZ WEPAL	620,0 ± 19,2	700,0 ± 23,5	564,0 ± 17,0	31,10 ± 2,85	410,0 ± 12,1	379,0 ± 9,0
Vzorek	HotBlock					
	283	250	279	222	273	237
As	4,09 ± 2,05	10,2 ± 3,06	5,86 ± 1,76	11,85 ± 3,56	0,73 ± 0,37	1,31 ± 0,66
MPZ	4,45 ± 0,55	11,00 ± 1,00	5,72 ± 0,70	13,10 ± 1,03	0,63	1,26

WEPAL						
Be	0,29 ± 0,06	0,19 ± 0,04	0,33 ± 0,07	0,21 ± 0,04	0,05 ± 0,03	0,08 ± 0,04
MPZ WEPAL	0,33 ± 0,04	0,20 ± 0,09	0,38 ± 0,02	0,24 ± 0,09	0,06 ± 0,04	0,08 ± 0,02
Cd	0,33 ± 0,17	1,96 ± 0,49	0,34 ± 0,17	2,74 ± 0,68	0,29 ± 0,15	0,09 ± 0,05
MPZ WEPAL	0,36 ± 0,04	1,95 ± 0,09	0,33 ± 0,02	2,66 ± 0,09	0,31 ± 0,04	0,10 ± 0,02
Co	3,60 ± 0,54	5,22 ± 0,78	4,95 ± 0,74	4,22 ± 0,63	2,82 ± 0,42	2,28 ± 0,34
MPZ WEPAL	3,80 ± 0,32	5,26 ± 0,21	5,18 ± 0,47	4,85 ± 0,27	2,90 ± 0,25	2,14 ± 0,23
Cr	35,26 ± 5,29	43,27 ± 6,49	59,92 ± 8,99	46,97 ± 7,05	5,80 ± 0,87	6,61 ± 0,99
MPZ WEPAL	43,80 ± 7,99	45,70 ± 1,94	72,50±10,07	51,30 ± 3,83	7,16 ± 0,57	6,84 ± 0,69
Cu	47,08 ± 7,06	381,6 ± 57,2	52,08 ± 7,81	410,0 ± 61,5	82,33±12,35	19,52 ± 2,93
MPZ WEPAL	48,50 ± 3,15	385,0 ± 14,1	54,10 ± 3,88	416,0 ± 22,0	85,60 ± 5,14	20,00 ± 1,24
Mo	3,01 ± 0,60	5,54 ± 1,11	4,82 ± 0,96	6,95 ± 1,39	4,21 ± 0,84	0,60 ± 0,30
MPZ WEPAL	3,15 ± 0,32	6,24 ± 0,19	5,15 ± 0,27	7,30 ± 0,37	4,82 ± 0,26	0,70 ± 0,05
Ni	20,03 ± 3,00	36,25 ± 5,44	28,63 ± 4,29	31,42 ± 4,71	4,97 ± 2,48	4,88 ± 2,44
MPZ WEPAL	22,50 ± 1,34	37,60 ± 1,44	31,80 ± 2,03	33,20 ± 1,75	5,88 ± 0,36	5,42 ± 0,42
Pb	32,46 ± 4,87	142,0 ± 21,3	28,38 ± 4,26	254,7 ± 38,2	3,26 ± 1,63	1,74 ± 0,87
MPZ WEPAL	36,70 ± 2,37	158,0 ± 6,7	32,80 ± 2,55	282,0 ± 9,3	2,31 ± 0,20	1,48 ± 0,29
V	11,64 ± 1,75	12,51 ± 1,88	16,34 ± 2,45	14,59 ± 2,19	2,68 ± 0,40	16,13 ± 2,42
MPZ WEPAL	14,10	14,00	19,30	16,70	3,21	18,30
Zn	131,8 ± 19,8	1064 ± 160	129,3 ± 19,4	1197 ± 180	366,5 ± 55,0	59,29 ± 8,89
MPZ WEPAL	143,0 ± 9,5	1154 ± 41	131,0 ± 6,7	1279 ± 65	293,0 ± 13,7	65,00 ± 2,41
S	2320 ± 348	13130±1969	1639 ± 246	13971±2096	5397 ± 810	52764±7915
MPZ WEPAL	2370 ± 250	12960±1491	1591 ± 152	13964±693	5635	53500
Mn	354,4 ± 53,2	458,4 ± 68,8	424,9 ± 63,7	647,0 ± 97,0	373,6 ± 56,0	131,9 ± 19,8
MPZ WEPAL	381,0 ± 13,1	486,0 ± 14,5	450,0 ± 12,9	700,0 ± 11,2	404,0 ± 10,0	142,0 ± 4,6

Tabulka 24. Makroelementy v kalech (mg/kg).

Vzorek	HotBlock					
	262	263	273	238	265	268
Mg	7586 ± 1138	8178 ± 1227	5367 ± 805	1813 ± 272	7928 ± 1189	6015 ± 902
MPZ WEPAL	7590 ± 375	8500 ± 542	5500 ± 426	1850 ± 106	8290 ± 361	6160 ± 379
Ca	46133±6920	47313±7097	30120±4518	39606±5941	54845±8227	53368±8005
MPZ WEPAL	47000±2010	49400±1890	31600±1510	41700±2080	58100±2180	58500±1850
K	10250±1025	6869 ± 687	2407 ± 243	28132±2813	12402±1240	2202 ± 220
MPZ WEPAL	11000±1530	8430 ± 1110	3390 ± 826	31300±1630	13800±1440	2640 ± 410
Na	450 ± 67	547 ± 82	1855 ± 278	9766 ± 1465	281 ± 42	1040 ± 156
MPZ WEPAL	491 ± 56	623 ± 89	1920 ± 107	10500 ± 680	320 ± 64	1100 ± 149
P	2865 ± 430	1929 ± 289	24527±3679	22535±3380	3003 ± 451	26796±4019
MPZ WEPAL	3230 ± 189	2380 ± 153	27650±1520	24100±1320	3300 ± 122	30400±1810
Fe	14807±2221	16843±2527	19996±2999	1011 ± 152	11158±1674	38050±5707
MPZ WEPAL	15000±1180	17500±1800	21800±650	1100 ± 121	11900 ± 770	42300±1640
Al	9003 ± 900	13159±1316	42935±4294	673 ± 67	6517 ± 652	14834 ± 1483
MPZ WEPAL	11650±2440	15800±3010	47600±3700	870 ± 192	9210 ± 3375	16200±1390
Vzorek	HotBlock					
	283	250	279	222	273	237
Mg	6235 ± 935	3394 ± 509	7941 ± 1191	3525 ± 529	9881 ± 1482	22905±3436
MPZ WEPAL	6680 ± 493	3440 ± 184	8410 ± 357	3560 ± 198	10200 ± 450	24400±1000
Ca	49725±7459	37103±5566	63177±9477	39100±5865	76669±11500	28444±4327
MPZ WEPAL	52700±3250	38600±1950	67500±4290	40700±1390	85900±3320	29000±1070
K	12069±1207	1694 ± 169	8263 ± 826	1633 ± 163	24427±2443	107097±10710
MPZ WEPAL	13800±1450	1810 ± 145	9490 ± 1176	1800 ± 188	28000±1320	100400±6900
Na	800 ± 120	1073 ± 161	248 ± 37	1044 ± 157	3653 ± 548	12918±1938
MPZ WEPAL	860 ± 76	1160 ± 48	330 ± 79	1120 ± 54	3420 ± 437	12600 ± 750
P	2951 ± 443	28494±4274	1939 ± 291	24522±3678	18271±2741	27939±4191

MPZ WEPAL	3400 ± 189	32400±1230	2270 ± 131	27210±1400	19500±560	30900±1500
Fe	11910±1786	47913±7187	11499±1725	36037±5406	905 ± 136	1979 ± 297
MPZ WEPAL	12600±630	51100±2010	12000±1100	39400±1730	930 ± 91	2020 ± 125
Al	5816 ± 592	21082±2108	6535 ± 653	19117±1912	363 ± 36	953 ± 95
MPZ WEPAL	6090 ± 480	21400±1670	7940 ± 1602	19400±1400	450	1040 ± 113

U vzorků kalů (tabulka 23 a 24), již nebyla prováděna všechna srovnání a byl proveden pouze jeden typ extrakce s nižší navázkou než u půd, tzn. 0,5 g vzorku (2 ml HNO₃ + 6 ml HCl), 105 °C, nefiltrované extrakty. Srovnáním naměřených hodnot s výsledky MPZ bylo zjištěno, že jsou obsahy analytů v rámci nejistoty shodné.

4 Závěr

V této práci bylo ověřeno, že nová norma s použitím zařízení HotBlock plně vyhovuje potřebám laboratoře, a to jak pro extrakci půd, tak pro extrakci kalů lučavkou královskou. Z hlediska průchodnosti vzorku laboratoří je zařízení HotBlock velmi efektivní vzhledem k tomu, že oproti 16 pozicím v původním rozkladném zařízení je HotBlock vybaven 54 pozicemi, takže laboratoř je schopna třikrát rychleji zpracovávat vzorky pro extrakci lučavkou královskou. Stejně tak z hlediska environmentálního zatížení je spotřeba chemikálií méně než třetinová.

5 Literatura

1. ČSN EN ISO 54321: Půdy upravený biodpad, kaly a odpady – Rozklad frakcí prvků rozpustných v lučavce královské.
2. Zbiral. J. a kol.: Jednotné pracovní postupy – Analýza půd II.

Zavedení metody pro identifikaci odrůd ječmene pomocí SSR markerů

Jitka Klemková

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

jitka.klempova@ukzuz.cz

1 Úvod

Práce vychází z požadavku Národního odrůdového úřadu na zavedení podpůrné metody pro určení odrůdové pravosti, kontroly osiva/sadby a tvorby databází genetických profilů (pre-screening odrůd pro DUS). Genotypizace založená na analýze mikrosatelitních (SSR) markerů je hojně využívaná technika, která je pro svoji vysokou rozlišovací schopnost vhodným nástrojem k rychlé a efektivní kontrole rostlinného materiálu, včetně identifikace odrůd.

Mikrosatelitní oblasti jsou přítomné u většiny rostlinných genomů a obsahují repetitivní motivy DNA sekvencí o délce 1 až 6 bp. Jejich celková délka obvykle nepřesahuje 100 bp a jsou součástí nekódujících sekvencí genomu, které se podílejí na regulaci genové exprese. Vzhledem k jejich struktuře často podléhají mutacím, kdy především kvůli replikačním chybám DNA polymerázy dochází k vynechání nebo přidání jednotky repetitivního motivu, a vykazují vysoký stupeň polymorfismu. Navíc se vyznačují kodominantním charakterem dědičnosti, širokým zastoupením v genomu a druhovou specifitou.

Při výběru markerů vhodných k charakterizaci odrůd ječmene se vycházelo z odborné literatury, sekvence příslušných primerů jsou dostupné ve veřejných databázích. Zavádění analytických postupů vycházelo ze stávajících JPP a z pravidel a doporučení Mezinárodní asociace pro zkoušení osiv (ISTA). Slabinou metody je absence referenčního materiálu, případně databáze umožňující porovnání výsledných alelických profilů testovaných vzorků.

2 Materiál a metody

2.1 Přístrojové a technické vybavení

2.1.2 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l.

- 2.1.3 Analytické váhy.
- 2.1.4 Centrifuga na destičky.
- 2.1.5 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.
- 2.1.6 Fotofokumentační zařízení.
- 2.1.7 Fragmentový analyzátor Fragment Analyzer (Advanced Analytical).
- 2.1.8 Horkovzdušná sušárna.
- 2.1.9 Chladnička.
- 2.1.10 Chlazená centrifuga (14000 ot/min).
- 2.1.11 Mikroobjemový UV-VIS spektrofotometr.
- 2.1.12 Minicentrifuga.
- 2.1.13 Mraznička.
- 2.1.14 PCR box.
- 2.1.15 PCR destičky, samolepicí folie.
- 2.1.16 Plastové zkumavky (0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml, 50 ml, 250 ml).
- 2.1.17 Rotorový rychlomlýnek Pulverisette 14 (Fritsch).
- 2.1.18 Sterilní špičky s filtrem, bez filtru.
- 2.1.19 Termocyklér C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad).
- 2.1.20 UV lampa.
- 2.1.21 Vodní lázeň.
- 2.1.21 Vortex.
- 2.1.22 Výrobník ledu.
- 2.1.23 Základní laboratorní sklo, plastik, ochranné rukavice.
- 2.1.24 Zařízení na horizontální elektroforézu, zdroj napětí.

2.2 Chemikálie

Reagencie pro izolaci DNA

- 2.2.1 DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen).
- 2.2.2 Ethanol pro spektroskopii (Uvasol).

Reagencie pro elektroforézu

- 2.2.3 Trizma base (Sigma).
- 2.2.4 Kyselina octová 99,8%, p. a. (Lach-Ner).
- 2.2.5 Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Na₂EDTA (Sigma).
- 2.2.6 Agaróza (Sigma).
- 2.2.7 Ethidium bromid (Merck).

2.2.8 6× DNA Loading Dye (Fermentas).

2.2.9 EZ Load™ Precision Molecular Mass Ruler (Biorad).

2.2.10 GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas).

Reagencie pro PCR

2.2.11 Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen).

Složení kitu: 2 × Type-it Multiplex PCR Master Mix, 5 × Q-Solution, RNase-Free voda.

2.2.12 Amplifikační primery 100µM (Generi Biotech).

2.2.13 PCR voda.

Reagencie pro fragmentační analýzu

2.2.14 DNF-900 dsDNA Reagent Kit, 35 bp – 500 bp (Advanced Analytical).

Složení kitu: FA dsDNA Gel, 35 bp – 500 bp, Interkalační barvivo, 5 × 930 dsDNA Inlet Buffer, 5× Capillary Conditioning Solution, ředící 1× TE pufr, 35 bp a 500 bp Markery, 75 – 400 bp Range DNA Ladder, Minerální olej.

2.2.15 Capillary Storage Buffer (Advanced Analytical).

2.3 Testovaný materiál

V rámci zavedení metodiky bylo testováno 21 vzorků ječmene, jejichž bližší specifikace jsou uvedeny v Tabulce 1. Jednalo se o 10 jarních a 11 ozimých v ČR registrovaných odrůd českého i světového sortimentu.

2.4 Pracovní postup

Analytické postupy zahrnující homogenizaci osiva, extrakci DNA, kontrolu kvantity a kvality DNA, amplifikaci SSR markerů a fragmentační analýzu PCR produktů, se provádí za podmínek uvedených v JPP č. 60075.1 Úprava a homogenizace vzorků osiv pro extrakci DNA, JPP č. 10700.1 Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini), JPP č. 10250.2 Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR a JPP č. 10258.1 Kapilární elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR.

21 SSR markerů (Tabulka 2) vhodných k identifikaci odrůd ječmene bylo převzato z odborné literatury (Perry et al. (2014); Korff et al. (2004), Leišová et al. (2007)). Nukleotidové sekvence primerů (Tabulka 3) pro testovanou sadu markerů byly ověřeny v databázi GenBank. Pro amplifikaci cílových sekvencí byl použit komerční kit Type-it Microsatellite PCR (Qiagen), který je přímo určen pro genotypové analýzy probíhající v multiplexu. V případě multiplex PCR se připraví 10× primer mixy obsahující 1 µM - 4 µM příslušných primerů (Tabulka 4). Veškerá ředění se provádí vodou pro PCR, není-li uvedeno jinak.

Reakční směs pro vlastní PCR obsahuje mastermix a templátovou DNA. Složení mastermixu je uvedeno v Tabulkách 5 (singleplex) a 6 (multiplex). Jednotlivé komponenty se pipetují v pořadí, ve kterém jsou uvedeny v tabulce, směs se promíchá jemným propipetováním, krátce stočí na minicentrifuze a rozaliquotuje po 7,5 μ l (8,25 μ l pro reakce v multiplexu) do označených PCR zkumavek. Následně se do reakce přidává 5 μ l templátové DNA, (v případě beztemplátové kontroly a kontroly prostředí 5 μ l vody), celkový reakční objem činí 12,5 μ l (13,25 μ l pro reakce v multiplexu). Reakční podmínky jsou optimalizovány na C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad). Teplotní profily a jednotlivé kroky PCR jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 1. Seznam vzorků testovaných v rámci metodiky.

Číslo	Plodina	Odrůda	Kód	Specifikace
1	Ječmen jarní	Chain	5093450	podobné
2	Ječmen jarní	STRG 774/11	5090811	
3	Ječmen jarní	SG-S 419	5090793	stejný původ
4	Ječmen jarní	SG-S 431	5090794	
5	Ječmen jarní	RP13031	5095128	stejný původ
6	Ječmen jarní	RP14033	5095129	
7	Ječmen jarní	Odyssey	5086483	příbuzné
8	Ječmen jarní	Octavia	5093104	
9	Ječmen jarní	AF Cesar	5082338	odlišné
10	Ječmen jarní	KWS Asta	5086619	
11	Ječmen ozimý	AC 08/290/26	5092695	podobné
12	Ječmen ozimý	KWS Salsa	5092567	
13	Ječmen ozimý	KW 2-430	5094745	stejný původ
14	Ječmen ozimý	KW 2-431	5094746	
15	Ječmen ozimý	Colonia	5085993	odlišné
16	Ječmen ozimý	Paso	5085979	
17	Ječmen ozimý	Wootan	5088337	hybrid
18	Ječmen ozimý	F1F069	5088502	linie
19	Ječmen ozimý	FM0471	5088503	linie
20	Ječmen ozimý	RE18	5086340	linie
21	Ječmen ozimý	Leibniz	5081734	linie

Tabulka 2. Seznam 21 mikrosatelitních markerů (chromozomální lokalizace, nukleotidový motiv, předpokládané délkové rozmezí alel, počet detekovaných alel).

Marker	Chromozom	Motiv repeticce	Délka produktu (bp)	Počet alel	Zdroj *
Bmag0005	5H	(AG) ₁₅	166-172	3	a
Bmag0120	7H	(AG) ₁₅	222-256	3	a
Bmag0223	5H	(AG) ₁₆	145-173	9	a
Bmag0225	3H	(AG) ₂₆	137-158	4	a
Bmag0382	1H	(AG) ₇ AA(AG) ₇	94-109	3	a
Bmag0692	2H	(CT) ₁₉	160-176	3	a
EBmac0415	2H	(AC) ₁₇	221-243	3	a
EBmac0501	1H	(AC) ₁₃	141-151	4	a
EBmac0635	4H	(AC) ₂₃	108-114	3	a
HvWaxy	7H	(GCAT) ₄	190-196	4	a
EBmac0624	6H	(GT) _{6/7}	104-121	3	b
MGB371	6H	(TG) ₆	128-136	4	b
MGB318	7(5H)	(CTG) ₆	148-164	2	b
MGB357	7(5H)	(CCG) ₈	236-248	2	b
HVM40	4H	(GA) ₆ (GT) ₄ (GA) ₇	135-149	3	c
HVM74	6H	(GA) ₁₃	178-221	4	c
Bmag0500	6H	(AG) _n CG(AG) _n (AGAGGG) _n (AG) _n	68-181	6	c
Bmag0496	6H	(CT) ₂₀	180-192	4	c
HVM36	2H	(GA) ₁₃	112-123	3	c
BMS90	1H	(AC) ₂₀	212-220	3	c
BMS32	1H	(AC) ₇ T(CA) ₁₅ (AT) ₉	214-223	3	c

*a – Perry et al. (2014): Simple sequence repeat-based identification of Canadian malting barley varieties; b – Korff et al. (2004): Insertion of 18 new SSR markers into the Oregon Wolfe Barley map; c – Leišová et al. (2007): Genetic resources of barley and oat characterised by microsatellites.

Separace a detekce získaných PCR produktů se provádí metodou kapilární elektroforézy. Vzorok se separují ve 12 kapilárovém fragmentačním analyzátoru od firmy Advanced Analytical (experimentální protokol DNF-900-55 – DNA 35-500bp.mthds), následně se vyhodnocují prostřednictvím programu PROSize™ 3.0 Analytical Software.

Pro kvalitativní analýzu dsDNA fragmentů o velikosti 35 bp až 500 bp se využívá komerční souprava DNF-900 dsDNA Reagent Kit, 35 bp – 500 bp. Vzorky se před fragmentační analýzou šestkrát ředí 1× TE pufrem, který je součástí kitu, přičemž celkový objem musí být minimálně 30 µl (25 µl 1× TE + 5 µl PCR produkt). Produkty MPBmag + Bmag0382 a MPEBmac + Bmag0005 se separují společně, pipetuje se tedy 20 µl 1× TE + 5 µl PCR produkt 1 + 5 µl PCR produkt 2. Analýzou surových dat se získají údaje o velikosti (bp) separovaných dsDNA fragmentů. Data jsou standardizována na dolní (LM, 35 bp) a horní (UM, 500 bp) kvalitativní marker, DNA Ladder o rozsahu 75-400 bp slouží jako hmotnostní standard (Obrázek 1) a je analyzován paralelně se vzorky. Pro správné sestrojení kalibrační křivky musí být detekováno všech 9 píků DNA Ladderu. V každém běhu (včetně beztemplátové kontroly PCR) musí být detekován rozeznatelný pík pro LM a UM.

Primární data se dále převádějí do binární matice a statisticky se zpracovávají pro určení genetické podobnosti (GS) mezi jednotlivými odrůdami. Na základě přítomnosti (1) či nepřítomnosti (0) alely se pro každý vzorek sestaví alelický profil (reprezentovaný binární maticí) pro všechny SSR markery. Maticový soubor se vyhodnotí ve statistickém programu PAST (Paleontological Statistics) ver. 3.17 stanovením koeficientu podobnosti dle Jaccarda. Informaci o vzájemné genetické odlišnosti (GD) lze získat jednoduchou transformací $GD = 1 - GS$. Vizualizace výsledných dat (genetických podobností) sestrojením dendrogramu se provádí metodu párování pomocí nevážených aritmetických průměrů (UPGMA).

Tabulka 3. Nukleotidové sekvence specifických primerů pro amplifikaci SSR markerů a referenčního genu (RG); teplotní profily a příslušný multiplex/singleplex pro PCR.

Marker	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	PCR	Set
Bmag0005	TCCATGATGATGTGTGCATAGA	CGGATCCCAACAAACACAC	TP1	-
Bmag0120	ATTTTCATCCCAAAGGAGAC	GTCACATAGACAGTTGTCTTCC	TP7	1
Bmag0223	TTAGTCACCCTCAACGGT	CCCCTAACTGCTGTGATG	TP6	-
Bmag0225	AACACACCAAAAAATATTACATCA	CGAGTAGTTCCCATGTGAC	TP8	4
Bmag0382	TGAAACCCATAGAGAGTGAGA	TCAAAAAGTTTCGTTCCAAATA	TP4	-
Bmag0692	GCAAGGTATCTCTTGTATTTTG	TGGCATCTACAATCTAAAACA	TP7	1
EBmac0415	GAAACCCATCATAGCAGC	AAACAGCAGCAAGAGGAG	TP4	2
EBmac0501	ACTTAAGTGCCATGCAAAG	AGGGACAAAAATGGCTAAG	TP4	2
EBmac0635	TGCTGCGATGATGAGAACT	TAGGGTAGATCCGTCCTATG	TP4	2
HvWaxy	AAGACGTGGTGTTCGTGTG	CAGATGGTTCCAGGGGTAAGTTC	TP8	3
EBmac0624	AAAAGCATTCAACTTCATAAGA	CAACGCCATCACGTAATA	TP8	4
MGB371	TTATTCAGGCAGCACCATTG	CACCAAGTTCACCTCGTCCT	TP8	3
MGB318	CGGCTCAAGGTCTCTTCTTC	TATCTCAGATGCCCTTTCC	TP8	5
MGB357	GCTCCAGGGCTCCTCTTC	AGCTCTCTCTGCACGTCCTT	TP8	5
HVM40	CGATTCCCCTTTTCCCAC	ATTCTCCGCCGTCCACTC	TP7	6
HVM74	AGGAAGTCATTGCGTGAG	TGATCAAGAATGATAACATGG	TP7	6
Bmag0500	GGGAAGTGTCTAATGAAGAG	AATGTAAGGGAGTGCCATAG	TP7	8
Bmag0496	AGTATAACCAACAGCCGTCTA	CTATAGCACGCCTTTGAGA	TP7	7
HVM36	TCCAGCCGAACAATTTCTTG	AGTACTCCGACACCACGTCC	TP7	6
BMS90	ACATCAACCCTCCTGCTC	CCGCACATAGTGGTTACATC	TP7	7
BMS32	CCATCAAAGTCCGGCTAG	GTCGGCCTCATACTGAC	TP7	8
<i>Referenční gen</i>				
trnL(UAA)	CGAAATCGGTAGACGCTACG	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	TP2	-

Tabulka 4. Příprava 10× primer mixů pro multiplex PCR (100 µl).

Zásobní primer 100µM	Objem (µl)	Finální koncentrace (µM)	Zásobní primer 100µM	Objem (µl)	Finální koncentrace (µM)
<i>10× MPBmag (1) primer mix</i>			<i>10× MPMGB (5) primer mix</i>		
PCR voda	92	-	PCR voda	92	-
F Bmag0120	2	2	F MGB318	2	2
R Bmag0120	2	2	R MGB318	2	2
F Bmag0692	2	2	F MGB357	2	2
R Bmag0692	2	2	R MGB357	2	2
<i>10× MPEBmac (2) primer mix</i>			<i>10× MPHVM (6) primer mix</i>		
PCR voda	80	-	PCR voda	90	-
F EBmac0415	2	2	F HVM36	1,25	1,25
R EBmac0415	2	2	R HVM36	1,25	1,25
F EBmac0501	4	4	F HVM40	1,67	1,67
R EBmac0501	4	4	R HVM40	1,67	1,67
F EBmac0635	4	4	F HVM74	2,1	2,1
R EBmac0635	4	4	R HVM74	2,1	2,1
<i>10× MPMGBHv (3) primer mix</i>			<i>10× MPY (7) primer mix</i>		
PCR voda	95	-	PCR voda	90	-
F MGB371	1	1	F BMS90	3	3
R MGB371	1	1	R BMS90	3	3
F HvWaxy	1,5	1,5	F Bmag0496	2	2
R HvWaxy	1,5	1,5	R Bmag0496	2	2
<i>10× MPG (4) primer mix</i>			<i>10× MPX (8) primer mix</i>		
PCR voda	92	-	PCR voda	92	-
F Bmag0225	2	2	F BMS32	2	2
R Bmag0225	2	2	R BMS32	2	2
F EBmac0624	2	2	F Bmag0500	2	2
R EBmac0624	2	2	R Bmag0500	2	2

Tabulka 5. Složení reakční směsi (12,5 µl) pro singleplex PCR.

Složka	Objem/1 reakce (µl)	Finální koncentrace
PCR voda	0,25	-
2× Type-it Multiplex PCR Master Mix	6,25	1×
Forward primer (10µM)	0,5	0,4µM*
Reverse primer (10µM)	0,5	0,4µM*
Templátová DNA (5 ng/µl)	5	25 ng

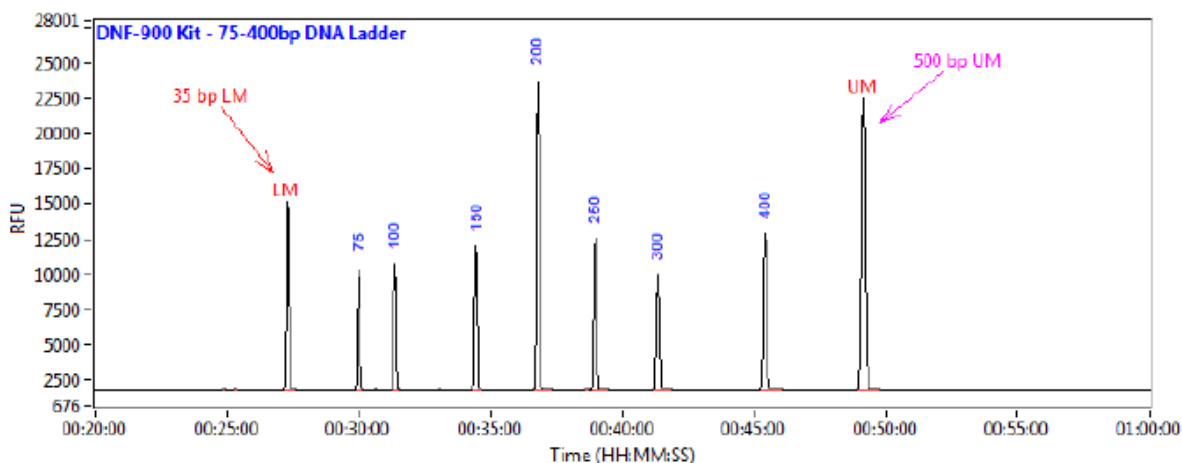
*finální koncentrace pro Bmag0382 je 0,8µM

Tabulka 6. Složení reakční směsi (13,25 µl) pro multiplex PCR.

Složka	Objem/1 reakce (µl)	Finální koncentrace
PCR voda	-	-
Q-Solution (5×)	0,75	0,3×
2× Type-it Multiplex PCR Master Mix	6,25	1×
10x primer mix (Tabulka 4)	1,25	0,1-0,2µM
Templátová DNA (5 ng/µl)	5	25 ng

Tabulka 7. Teplotní profily PCR.

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
TP1 (Bmag0005)			<i>TP1 35x30s58°C.prc1</i>
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	58	30	
Extenze	72	30	
Finální extenze	68	600	1
Chlazení	4	∞	1
TP2 (RG)			<i>TP2 RG55°C.prc1</i>
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	55	60	
Extenze	72	30	
Finální extenze	68	600	1
Chlazení	4	∞	1
TP4 (MPEBmac, Bmag0382)			<i>TP4 40x60s60s58°C.prc1</i>
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	40
Annealing	58	60	
Extenze	72	60	
Finální extenze	68	600	1
Chlazení	4	∞	1
TP6 (Bmag0223)			<i>TP6 40x60s90s58°C.prc1</i>
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	40
Annealing	58	60	
Extenze	72	90	
Finální extenze	68	600	1
Chlazení	4	∞	1
TP7 (MPBmag, MPHVM, MPY, MPX)			<i>TP7 35x60s60s58°C.prc1</i>
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	58	60	
Extenze	72	60	
Finální extenze	68	600	1
Chlazení	4	∞	1
TP8 (MPMGBHv, MPG, MPMGB)			<i>TP8 35x60s90s58°C.prc1</i>
Aktivace polymerázy	95	300	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	58	60	
Extenze	72	90	
Finální extenze	68	600	1
Chlazení	4	∞	1



Obrázek 1. 75-400 bp DNA Ladder, LM, UM.

3 Výsledky a diskuze

Metodické postupy pro úpravu a homogenizaci vzorků testovaného osiva a následnou extrakci DNA vycházely z JPP uvedených v kapitole 2.4. Ze všech 21 testovaných vzorků se podařilo získat vysokomolekulární DNA v dostatečném množství a kvalitě (Tabulka 8) pro následnou optimalizaci reakčních podmínek PCR.

Tabulka 8. Koncentrace a čistota DNA.

Vzorek	c (ng/μl)	A _{260/280}	A _{260/230}	Vzorek	c (ng/μl)	A _{260/280}	A _{260/230}
1A	35,2	1,8	1,6	1B	29,4	1,8	1,7
2A	24,6	1,8	2,1	2B	34,3	1,8	1,6
3A	18,4	1,7	1,6	3B	21,2	1,8	1,7
4A	21,6	1,8	1,8	4B	28,3	1,8	1,6
5A	64,3	1,8	2,1	5B	64,9	1,8	2,1
6A	32,9	1,8	1,8	6B	113,3	1,9	2,1
7A	116,5	1,9	1,9	7B	119,1	1,9	2,1
8A	131,7	2,0	2,1	8B	115,7	1,9	2,0
9A	90,9	1,9	2,1	9B	63,7	1,9	2,0
10A	130,5	2,0	2,0	10B	111,5	1,9	2,1
11A	63,4	1,9	2,2	11B	62,0	1,9	2,1
12A	31,6	1,8	2,1	12B	49,5	1,9	2,0
13A	55,9	1,8	2,1	13B	59,7	1,8	2,1
14A	42,1	1,8	2,0	14B	48,2	1,8	1,7
15A	38,2	1,8	2,0	15B	30,6	1,8	2,0
16A	30,8	1,8	2,0	16B	30,9	1,8	2,1
17A	53,5	1,8	1,7	17B	33,9	1,8	1,5
18A	39,4	1,8	1,7	18B	43,6	1,8	1,8
19A	32,7	1,8	1,9	19B	36,9	1,8	1,9
20A	40,2	1,8	1,9	20B	38,2	1,7	1,8
21A	19,0	1,8	1,7	21B	20,9	1,7	1,8

Amplifikovatelnost vyextrahované DNA byla ověřena PCR referenčního genu *trnL* (UAA). Jedná se o intronní oblast genu pro tRNA přítomného v plastidové DNA u rostlin. V případě ječmene dochází k amplifikaci produktu o délce 553 bp, detekce se provádí elektroforeticky na 2 % agarózovém gelu.

3.1 Optimalizace PCR

Analýza SSR polymorfismů je založena na PCR, která vyžaduje rozsáhlou optimalizaci reakčních podmínek pro všechny testované markery. Předpokladem úspěšné PCR je nastavení experimentálních parametrů reakce tak, aby měla specifický průběh a minimalizoval se výskyt nespecifických a jiných minoritních produktů.

Analýza mikrosatelitních oblastí DNA s detekcí na systémech s vysokým rozlišením je mnohdy spojena s velkými rozdíly v intenzitě fluorescenčního signálu a nerovnoměrnými výtěžky pro jednotlivé produkty. Častým jevem při PCR mikrosatelitů, které mají přímý dopad na interpretaci DNA profilů, je vznik různých artefaktů, zejména pak stutter píků, n-1 produktů, nebo výskyt tzv. nulových alel. Prokluz polymerázy při replikaci mikrosatelitní DNA může mít za následek amplifikaci určitého procenta PCR produktů kratších/delších o jeden či více SSR motivů, oproti očekávané délce. Jedná se o tzv. stutter píky, které se hojně vyskytují u dinukleotidových repeticí, u delších repeticí jsou méně časté. Jsou viditelné jako další vrcholy v elektroforetickém záznamu, čímž značně komplikují vyhodnocování vzorků, zvláště těch směsných. Nízká kvalita templátové DNA může vést k preferenční amplifikaci jedné (obvykle kratší) alely u heterozygota, který se pak chybně jeví jako homozygot. Jedná se o tzv. alelický dropout. Přítomnost nulové alely je způsobena mutací DNA v místě, které je homologní k sekvenci primeru. Tím je narušena jeho hybridizace, a proto nedochází k amplifikaci alely původně přítomné ve vzorku. Stochastický efekt je primárně způsoben nízkou koncentrací templátové DNA, kdy v důsledku nedostatečného nasedání primerů dochází k nevyvážené amplifikaci.

V rámci optimalizace PCR pro sadu testovaných mikrosatelitních markerů byly stanoveny optimální parametry pro složení reakční směsi, vstupní množství templátové DNA a teplotní profil amplifikace. Type-it Microsatellite PCR Kit obsahuje mastermix již ve formě ready-to-use, tzn. s optimálním složením směsi dNTP, MgCl₂, reakčního pufru a HotStarTaq DNA polymerázy. Při úpravě PCR reakčních podmínek se vycházelo z doporučení manuálu kitu. Množství vstupní templátové DNA významně ovlivňuje efektivitu annealingu primerů a tím úspěšnost celé PCR. Nízké koncentrace DNA neposkytují dostatečné množství komplementárních sekvencí, příliš mnoho templátu vede k větší míře chybného párování.

Bylo testováno (5-75) ng templátové DNA v reakční směsi o celkovém objemu 25 μ l, množství (25-50) ng DNA se jeví jako optimální. Sekvence a koncentrace primerů v reakční směsi výrazně ovlivňuje výsledek PCR. Příliš vysoká koncentrace může vést k nespecifickému nasedání primerů na templátovou DNA nebo k tvorbě primer dimerů. Příliš nízká koncentrace primerů vede k jejich předčasnému vyčerpání a nedostatečnému množství produktu. Byly testovány koncentrace forward a reverse primerů v rozmezí (0,2-1,0) μ M. Optimální koncentrace primerů v reakční směsi pro amplifikaci jednotlivých markerů je 0,4 μ M. Annealingová teplota (T_a), neboli teplota nasedání primerů, se odvíjí od délky primerů a počtu GC párů. Čím větší délka a vyšší obsah GC párů, tím je T_a vyšší. V zásadě platí, že T_a musí být dostatečně vysoká, aby nedocházelo k nespecifickému nasedání primerů k templátové DNA, pokud by ale byla příliš vysoká, primery by nenedaly vůbec. Optimální T_a byla určena vytvořením teplotního gradientu v rozmezí teplot (46-65) $^{\circ}$ C. První krok PCR, počáteční aktivace polymerázy, probíhá 5 minut při 95 $^{\circ}$ C. Následuje denaturace (30 s), annealing a extenze, které se cyklicky opakují. Finální extenze zajišťuje plné dosyntetizování všech nově vzniklých produktů. Byly porovnány rozdílné doby trvání annealingu (30-180) s a extenze (30-60) s, a počet cyklů 35-45. Optimální výtěžek PCR produktů byl získán mezi 35. a 40. cyklem. Finální extenze byla testována při teplotě (60-72) $^{\circ}$ C po dobu (5-30) min. Součástí kitu je i Q-Solution, který ovlivňuje vlastnosti tání DNA a jeho přítomnost v reakční směsi může vést ke zvýšení účinnosti PCR. Nicméně v případě singleplex PCR nebyl ve většině případů pozorován žádný pozitivní efekt. Optimální parametry pro jednotlivé markery jsou shrnuty v Tabulce 9. PCR je možné provádět i v polovičním reakčním objemu 12,5 μ l. 7,5 μ l tvoří mastermix se specifickými primery a 5 μ l DNA o koncentraci 5 ng/ μ l.

Testování 21 markerů vyžaduje provedení velkého množství PCR a následných fragmentačních analýz. Ve snaze snížit množství amplifikací a tím celkového času a nákladů pro analýzu, byla navržena multiplex PCR. Její přednost spočívá v rychlé detekci více produktů v jedné reakci za použití dvou a více sad primerů. Přestože se princip samotné reakce neliší od standardního protokolu PCR, efektivní využití metody vyžaduje důkladné navržení tak, aby se výsledné PCR produkty daly snadno a dostatečně vzájemně odlišit. Vzhledem k tomu, že amplifikace pro všechny markery neprobíhá se stejnou účinností a citlivostí, bylo nutné některé reakční podmínky přetestovat a upravit složení reakční směsi. Bylo navrženo několik variant multiplexů s různými kombinacemi markerů, pro které byl stanoven vhodný poměr koncentrací jednotlivých primerů. Současně by primery měly hybridizovat při podobné teplotě (T_a), nesmí být vzájemně komplementární a délka produktů by měla být při separaci kapilární elektroforézou odlišitelná alespoň o (20-30) bp. Přítomnost

0,5 × Q-Solution měla pozitivní efekt na proběhlou PCR. Přesto v několika případech docházelo k negativním interakcím a některé fragmenty nebyly amplifikovány. Podařilo se zoptimalizovat 8 multiplex PCR protokolů pro paralelní detekci 3 (MPEBmac, MPHVM) nebo 2 (MPBmag, MPMGBHv, MPG, MPMGB, MPY, MPX) SSR markerů. Pro zbylé 3 markery (Bmag0382, Bmag0005, Bmag0223), které se nepodařilo sloučit do jedné reakce, je zachován individuální protokol singleplex PCR. Nicméně v následujícím kroku lze provést společnou separaci pro MPBmag + Bmag0382 a MPEBmac + Bmag0005.

Tabulka 9. Optimalizované reakční podmínky PCR pro jednotlivé markery.

Marker	Konc. primerů (μM)	T_a ($^{\circ}\text{C}$)	Počet cyklů	Anneal./Extenze (s)
Bmag0005	0,4	58	35	30/30
Bmag0120	0,4	58	35	30/30
Bmag0223	0,4	58	40	60/90
Bmag0225	0,4	56	40	60/30
Bmag0382	0,8	58	40	60/30
Bmag0692	0,4	58	35	90/30
EBmac0415	0,4	58	35	30/30
EBmac0501	0,4	58	40	60/30
EBmac0635*	0,4	58	35	60/30
HvWaxy	0,4	58	35	30/30
EBmac0624	0,4	58	35	60/30
MGB371	0,4	58	35	60/60
MGB318	0,4	58	35	30/30
MGB357	0,4	58	35	30/30
HVM40	0,4	58	35	60/60
HVM74	0,4	58	35	60/60
Bmag0500	0,4	58	35	60/60
Bmag0496	0,4	58	35	60/60
HVM36	0,4	58	35	60/60
BMS90	0,4	58	35	60/60
BMS32	0,4	58	35	60/60

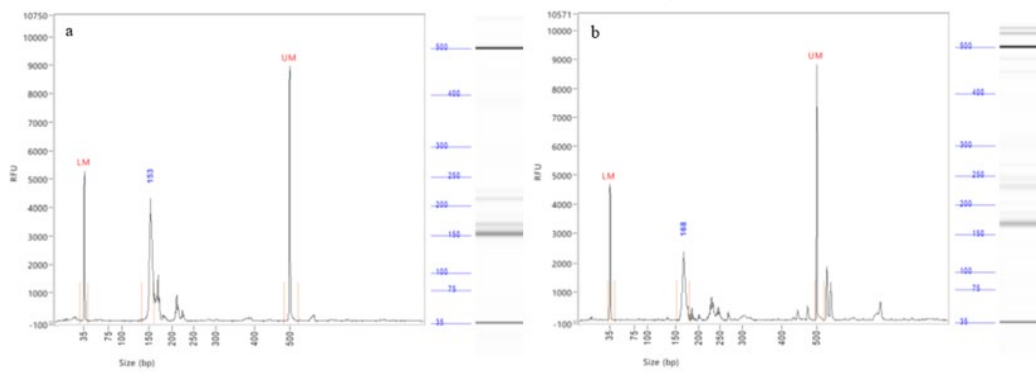
*Q-solution

3.2 Fragmentační analýza a vyhodnocení elektroferogramů

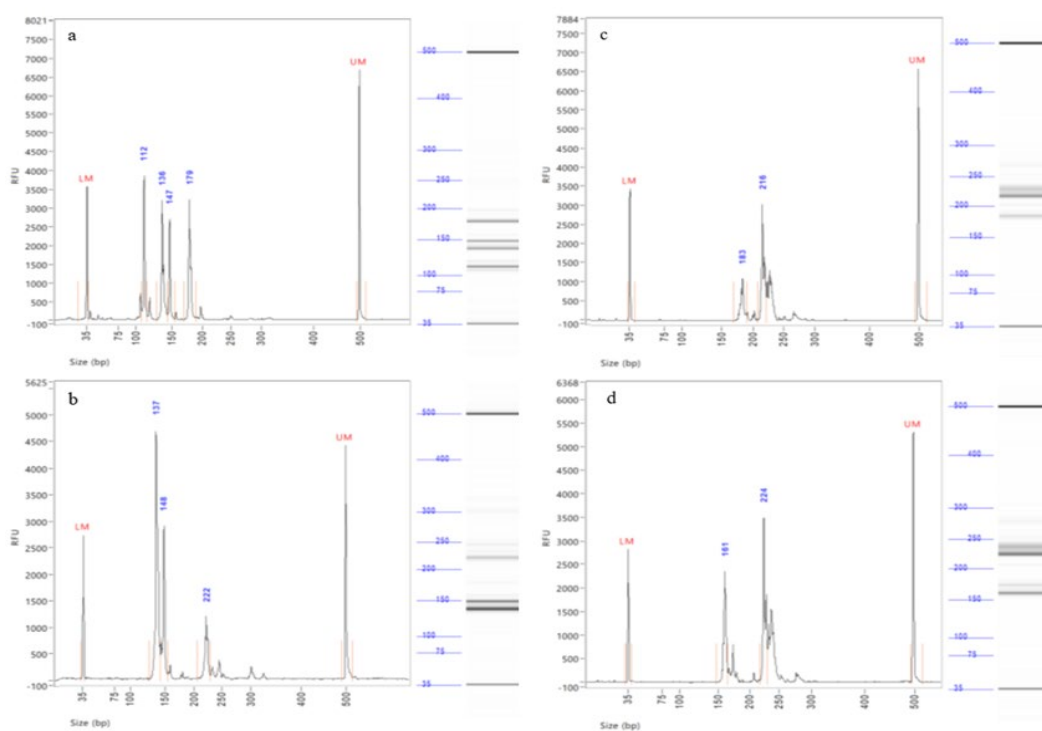
Produkty amplifikace byly separovány pomocí soupravy DNF-900 dsDNA Reagent Kit, která je určena pro analýzu dsDNA fragmentů o velikosti 35 bp až 500 bp. Separační rozlišení kitu při použití sady 55 cm dlouhých kapilár je nejméně (3-5) bp při 300 bp. DNA fragmenty byly vizualizovány softwarem PROSize™ 3.0 a vyhodnoceny pomocí 35 bp a 500 bp molekulárního standardu. Výsledkem analýzy jsou údaje o velikosti jednotlivých alel udávané v párech bazí (Obrázky 2-7). Kombinací alel pro všech 21 SSR markerů se získá DNA (alelický) profil vzorku (Tabulka 10).

Tabulka 10. Alelické profily testovaných odrůd získané analýzou 21 SSR markerů.

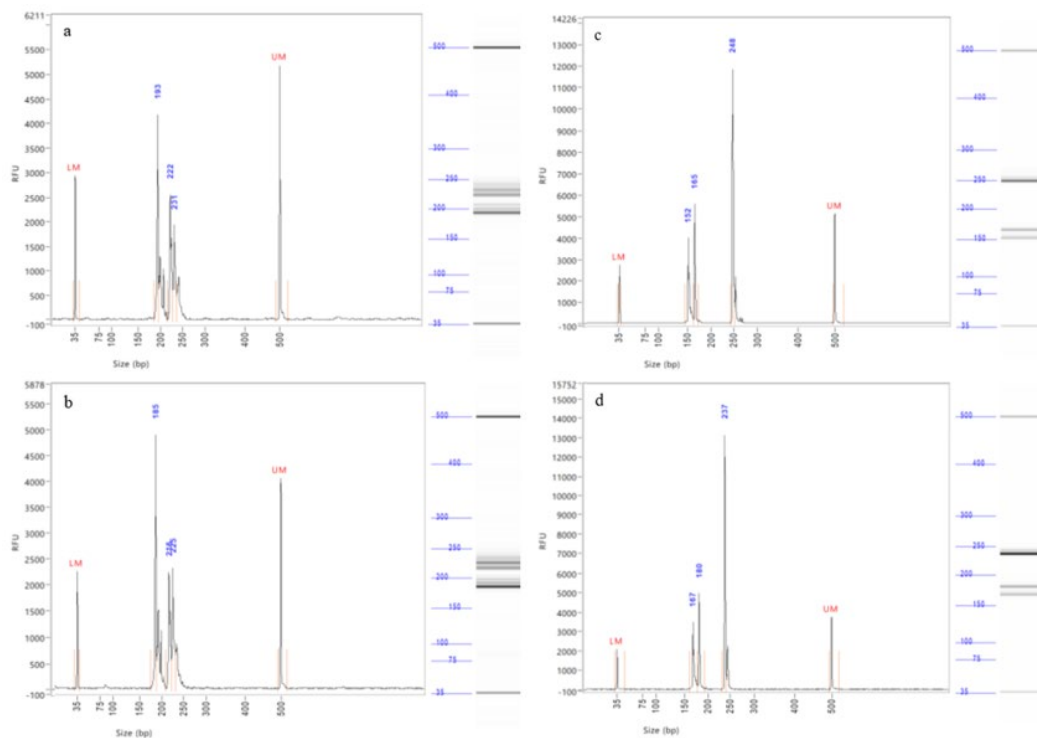
č. vz.	Bmag0120	MGB318	MGB357	EBmac0415	HvWaxy	EBmac0624	Bmag0692	EBmac0501	Bmag0382	Bmag0225	Bmag0005	EBmac0635	Bmag0223	MGB371	HVM36	HVM40	HVM74	BMS90	Bmag0496	BMS32	Bmag0500
1	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	B	B	C	A	A	B	B	C	A	C
2	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	B	B	C	A	A	A	B	B	A	E
3	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	C	B	C	B	A	B	B	C	A	E
4	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	B	C	C	B	B	B	C	C	A	N
5	A	A	B	C	C	B	B	C	C	D	B	B	B	C	A	A	B	B	C	A	E
6	A	A	B	B	C	B	C	C	C	D	B	B	B	C	A	A	B	B	C	A	E
7	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	B	B	C	A	A	A	B	B	A	E
8	A	A	B	B	C	B	B	C	C	D	B	B	B	C	A	A	B	B	C	A	E
9	B	A	B	A	C	B	C	C	A	D	C	B	C	C	A	C	B	B	C	A	A
10	A	A	B	B	C	B	C	C	C	D	B	B	C	C	A	A	B	C	C	A	E
11	C	A	A	C	ND	B	A	A	C	A	B	C	F	D	N	A	A	B	B	B	C
12	C	A	A	C	ND	B	A	A	C	A	B	C	E	A	N	A	A	B	B	B	D
13	B	A	A	C	ND	B	A	B	C	D	B	C	G	D	A	A	A	C	B	A	D
14	B	A	A	C	ND	B	A	B	C	D	B	C	G	D	A	A	A	C	B	B	D
15	A	A	A	C	C	B	A	A	C	D	B	C	H	D	N	B	A	B	B	B	C
16	B	B	A	C	B	C	C	D	B	A	B	C	F	B	N	A	D	A	A	C	D
17	B	AB	A	C	AB	AC	A	A	B	AB	AB	AC	A	AB	A	AC	CD	B	A	A	B
18	B	AB	A	C	AB	C	A	A	B	A	AB	A	A	B	B	AC	D	B	A	A	C
19	B	A	A	C	A	C	A	A	B	C	A	A	A	B	N	C	D	B	A	A	C
20	B	B	A	C	A	A	A	A	B	B	B	C	D	A	A	A	C	B	C	A	B
21	B	B	A	C	B	C	A	A	B	A	B	C	C	B	B	A	D	C	A	A	C



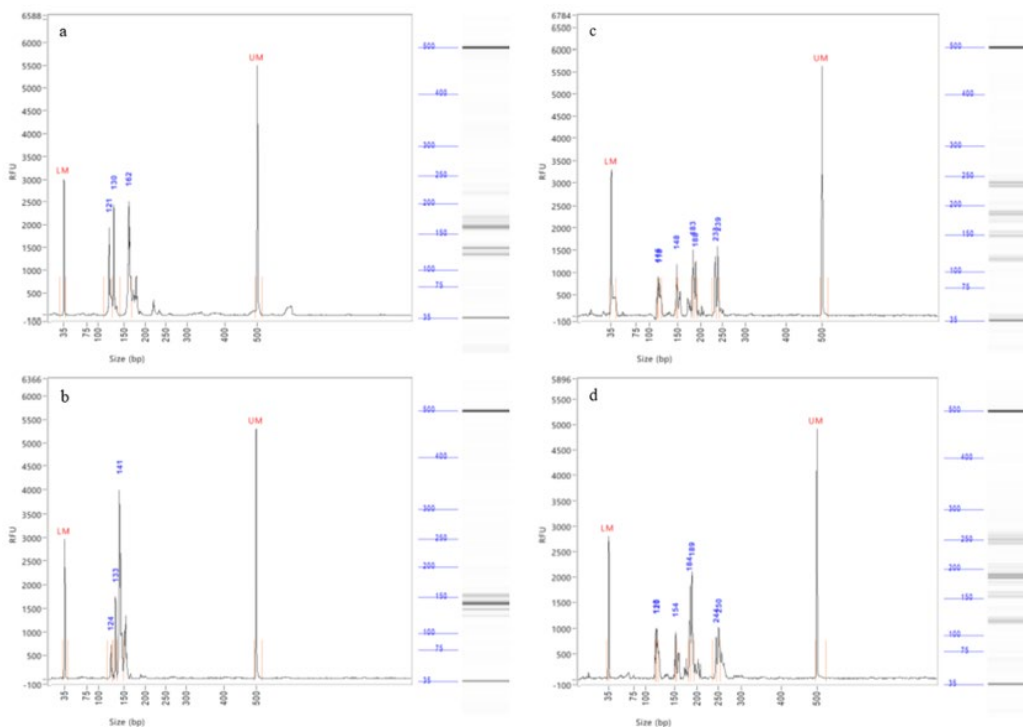
Obrázek 2. Porovnání elektroferogramů pro Bmag0223 u odrůd Odyssey (a - ječmen jarní) a Paso (b - ječmen ozimý).



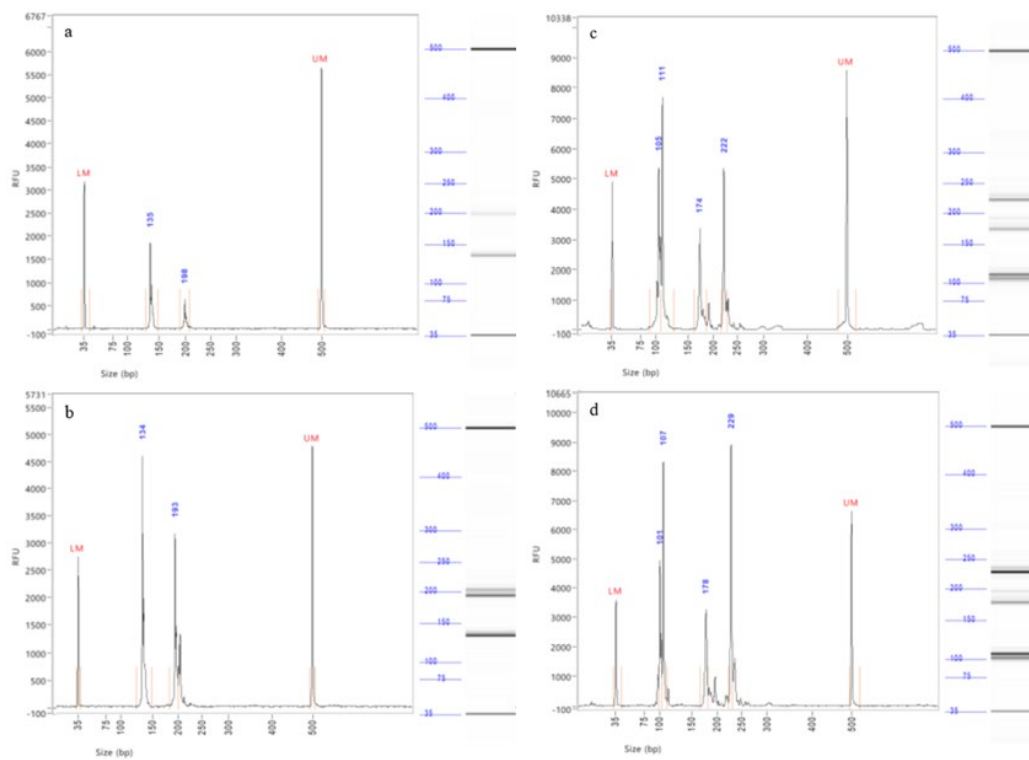
Obrázek 3. Porovnání elektroferogramů 5 SSR markerů (a,b – HVM36, HVM40, HVM74; c,d – BMS32, Bmag0500) pro odrůdy Odyssey (a,c - ječmen jarní) a Paso (b,d - ječmen ozimý).



Obrázek 4. Porovnání elektroferogramů 4 SSR markerů (a,b – BMS90, Bmag0496; c,d – MGB318, MGB357) pro odrůdy Odyssey (a,c - ječmen jarní) a Paso (b,d - ječmen ozimý).



Obrázek 5. Porovnání elektroferogramů 6 SSR markerů (a,b – Bmag0225, EBmac0624; c,d – EBmac0415, EBmac0501, EBmac0635, Bmag0005) pro odrůdy Odyssey (a,c - ječmen jarní) a Paso (b,d - ječmen ozimý).



Obrázek 6. Porovnání elektroferogramů 5 SSR markerů (a,b – MGB371, HvWaxy; c,d – Bmag0120, Bmag0692, Bmag0382) pro odrůdy Odyssey (a,c - ječmen jarní) a Paso (b,d - ječmen ozimý).

Bmag0120 (AG) ₁₅	MGB318 (CTG) ₆	MGB357 (CCG) ₈	EBmac0415 (AC) ₁₇	HvWaxy (GCAT) ₄	EBmac0624 (GT) _{6/7}	Bmag0692 (CT) ₁₉
222 221,2 A	148 147-149 A	236 236,7 A	221 220-1 A	190 189-190 A	104 104-5 A	160 160-1 A
228 227,8,9 B	164 164,5 B	248 247-9 B	231 230-1 B	192 191-192 B	118 118-9 B	172 172-3 B
256 256 C			243 242-4 C	196 196-197 C	121 121 C	176 176-7 C
				ND N		
Bmag0382 (AG) ₇ AA(AG) ₇	Bmag0225 (AG) ₂₆	Bmag0005 (AG) ₁₅	EBmac0635 (AC) ₂₃	Bmag0223 (AG) ₁₆	MGB371novýF (TG) ₆	EBmac0501 (AC) ₁₃
94 A	137 137-8 A	166 (179) 166 A	108 A	145 145-6 A	128 128-9 A	141 140-141 A
105 B	142 142-3 B	170 (183) 170-1 B	112 111-2 B	149 149-50 B	132 132-3 B	143 142-143 B
109 109-10 C	156 156 C	172 (185) 172 C	114 113-4 C	155 156-6 C	134 134-5 C	147 146-147 C
	158 158-9 D	bezQ (Q)		157 157 D	136 136-7 D	151 150-151 D
				159 159-60 E		
				163 F		
				165 165-6 G		
				171 171-2 H		
				173 173-4 I		
HVM36 (GA) ₁₃	HVM40 (GA) ₆ , (GT) ₄ , (GA) ₇	HVM74 (GA) ₁₃	BMS90 (AC) ₂₀	Bmag0496 (CT) ₂₀	BMS32 (AC) ₇ T(CA) ₁₅ (AT) ₉	Bmag0500 (AG) ₆ CG(AG) ₂₅ (AGAGGG) ₃ (AG) ₆
112 111-112 A	135 133-135 A	178 177-178 A	212 211-212 A	180 180-181 A	214 214-215 A	68-69 A
114 113-114 B	139 138-140 B	180 179-180 B	218 218-219 B	188 188-189 B	216 216 B	78 B
ND multá N	149 148-149 C	192 191-192 C	220 220-221 C	192 192-193 C	223 223 C	155 155-156 C
		221 220-221 D				157 157-158 D
						181 181 E
						ND multá N

Obrázek 7. Přehled pozorovaných alel pro 21 testovaných SSR markerů u 21 vzorků ječmene.

3.3 Genetická variabilita

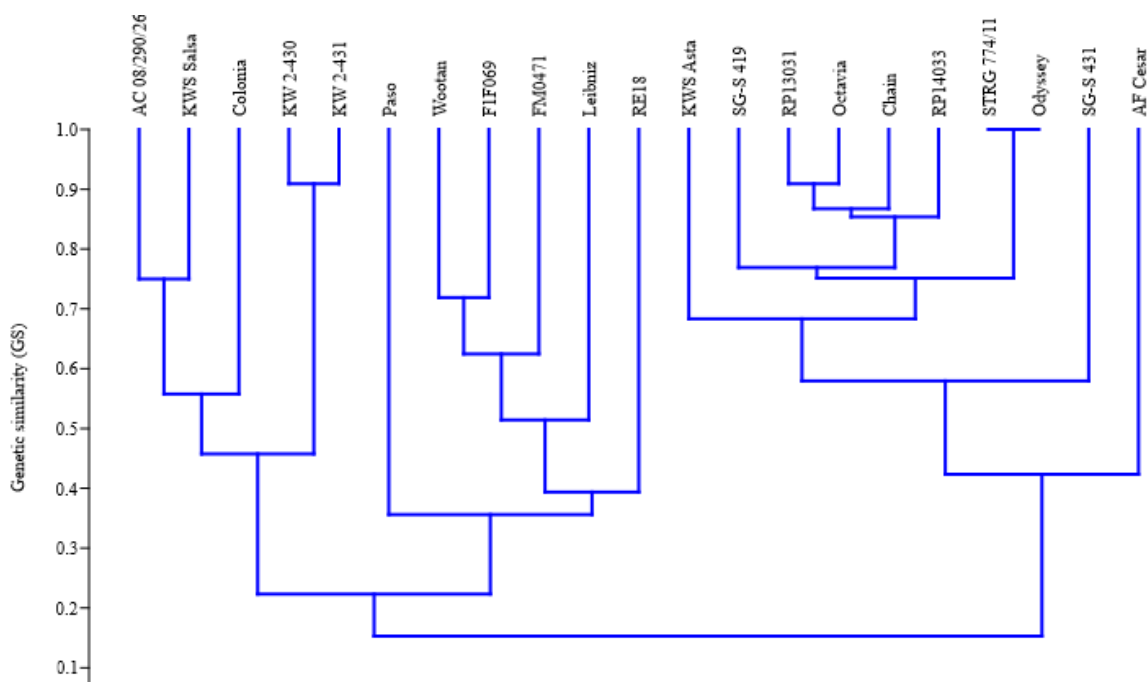
Výsledné profily byly převedeny do binárního formátu reprezentovaného přítomností (1) nebo absencí (0) jednotlivých alel (Obrázek 8). Pomocí programu PAST ver. 3.17 s využitím metody UPGMA a Jaccardova podobnostního koeficientu byla získána matice genetických podobností pro všechny testované odrůdy (Obrázek 9). Pro grafické vyjádření výsledků lze vytvořit dendrogram genetických podobností (Obrázek 10). SSR genotypizací DNA vyextrahované z 21 vzorků osiva ječmene byl získán alelický profil. Délka detekovaných fragmentů alel pro jednotlivé SSR markery se pohybovala v rozmezí hodnot uvedených v Tabulce 2. Pro testovanou sadu 21 SSR markerů bylo detekováno celkem 77 polymorfních alel.

V první části práce bylo zavedeno 14 SSR markerů. Bylo porovnáno 210 párů alelických profilů, 7 z nich nebylo odlišeno. V případě vzorků 13 (KW 2-430) a 14 (KW 2-431) šlo o ozimé odrůdy stejného původu, u zbylých šesti párů vzorků se jednalo o odrůdy ječmene jarního (1 (Chain) a 2 (STRG 774/11); 1 (Chain) a 7 (Odyssey); 1 (Chain) a 8 (Octavia);

14 SSR		Chain	STRG 774/11	SG-S 419	SG-S 431	RP13031	RP14033	Odyssey	Octavia	AF Cesar	KWS Asta	AC 08/290/26	KWS Salsa	KW 2-430	KW 2-431	Colonia	Paso	Wootan	FIF069	FM0471	RE18	Leibniz
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Chain	1	1,00	1,00	0,87	0,87	0,87	0,87	1,00	1,00	0,40	0,75	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
STRG 774/11	2	1,00	1,00	0,87	0,87	0,87	0,87	1,00	1,00	0,40	0,75	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
SG-S 419	3	0,87	0,87	1,00	0,75	0,75	0,75	0,87	0,87	0,33	0,65	0,22	0,22	0,27	0,27	0,40	0,08	0,09	0,07	0,04	0,08	0,08
SG-S 431	4	0,87	0,87	0,75	1,00	0,75	0,75	0,87	0,87	0,47	0,87	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
RP13031	5	0,87	0,87	0,75	0,75	1,00	0,75	0,87	0,87	0,40	0,65	0,22	0,22	0,27	0,27	0,40	0,08	0,09	0,11	0,08	0,08	0,08
RP14033	6	0,87	0,87	0,75	0,75	0,75	1,00	0,87	0,87	0,47	0,87	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,08	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
Odyssey	7	1,00	1,00	0,87	0,87	0,87	0,87	1,00	1,00	0,40	0,75	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
Octavia	8	1,00	1,00	0,87	0,87	0,87	0,87	1,00	1,00	0,40	0,75	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,04	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
AF Cesar	9	0,40	0,40	0,33	0,47	0,40	0,47	0,40	0,40	1,00	0,56	0,08	0,08	0,17	0,17	0,17	0,08	0,06	0,07	0,08	0,04	0,04
KWS Asta	10	0,75	0,75	0,65	0,87	0,65	0,87	0,75	0,75	0,56	1,00	0,17	0,17	0,22	0,22	0,33	0,08	0,06	0,07	0,04	0,04	0,04
AC 08/290/26	11	0,17	0,17	0,22	0,17	0,22	0,17	0,17	0,17	0,08	0,17	1,00	0,75	0,56	0,56	0,56	0,27	0,30	0,29	0,22	0,27	0,33
KWS Salsa	12	0,17	0,17	0,22	0,17	0,22	0,17	0,17	0,17	0,08	0,17	0,75	1,00	0,47	0,47	0,47	0,22	0,35	0,29	0,22	0,33	0,33
KW 2-430	13	0,22	0,22	0,27	0,22	0,27	0,22	0,22	0,22	0,17	0,22	0,56	0,47	1,00	1,00	0,56	0,22	0,25	0,24	0,22	0,27	0,27
KW 2-431	14	0,22	0,22	0,27	0,22	0,27	0,22	0,22	0,22	0,17	0,22	0,56	0,47	1,00	1,00	0,56	0,22	0,25	0,24	0,22	0,27	0,27
Colonia	15	0,33	0,33	0,40	0,33	0,40	0,33	0,33	0,33	0,17	0,33	0,56	0,47	0,56	0,56	1,00	0,17	0,25	0,24	0,22	0,27	0,27
Paso	16	0,04	0,04	0,08	0,04	0,08	0,08	0,04	0,04	0,08	0,08	0,27	0,22	0,22	0,22	0,17	1,00	0,46	0,48	0,27	0,33	0,65
Wootan	17	0,06	0,06	0,09	0,06	0,09	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,30	0,35	0,25	0,25	0,25	0,46	1,00	0,81	0,59	0,59	0,59
FIF069	18	0,07	0,07	0,07	0,07	0,11	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,29	0,29	0,24	0,24	0,24	0,48	0,81	1,00	0,72	0,41	0,63
FM0471	19	0,04	0,04	0,04	0,04	0,08	0,04	0,04	0,04	0,08	0,04	0,22	0,22	0,22	0,22	0,27	0,59	0,72	1,00	0,33	0,40	0,40
RE18	20	0,04	0,04	0,08	0,04	0,08	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,27	0,33	0,27	0,27	0,33	0,59	0,41	0,33	1,00	0,47	0,47
Leibniz	21	0,04	0,04	0,08	0,04	0,08	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,33	0,33	0,27	0,27	0,27	0,65	0,59	0,63	0,40	0,47	1,00

21 SSR		Chain	STRG 774/11	SG-S 419	SG-S 431	RP13031	RP14033	Odyssey	Octavia	AF Cesar	KWS Asta	AC 08/290/26	KWS Salsa	KW 2-430	KW 2-431	Colonia	Paso	Wootan	FIF069	FM0471	RE18	Leibniz
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Chain	1	1,00	0,75	0,75	0,62	0,83	0,83	0,75	0,91	0,45	0,68	0,20	0,17	0,24	0,20	0,27	0,08	0,13	0,15	0,11	0,17	0,11
STRG 774/11	2	0,75	1,00	0,68	0,50	0,75	0,75	1,00	0,83	0,35	0,62	0,24	0,24	0,31	0,27	0,31	0,05	0,13	0,12	0,08	0,14	0,08
SG-S 419	3	0,75	0,68	1,00	0,62	0,75	0,75	0,68	0,83	0,35	0,62	0,20	0,20	0,24	0,20	0,27	0,11	0,13	0,15	0,08	0,17	0,14
SG-S 431	4	0,62	0,50	0,62	1,00	0,56	0,56	0,50	0,62	0,40	0,68	0,11	0,11	0,20	0,17	0,24	0,05	0,06	0,10	0,05	0,08	0,11
RP13031	5	0,83	0,75	0,75	0,56	1,00	0,83	0,75	0,91	0,45	0,68	0,20	0,20	0,27	0,24	0,27	0,11	0,16	0,15	0,11	0,20	0,11
RP14033	6	0,83	0,75	0,75	0,56	0,83	1,00	0,75	0,91	0,50	0,83	0,17	0,17	0,24	0,20	0,24	0,11	0,13	0,12	0,08	0,17	0,08
Odyssey	7	0,75	1,00	0,68	0,50	0,75	0,75	1,00	0,83	0,35	0,62	0,24	0,24	0,31	0,27	0,31	0,05	0,13	0,12	0,08	0,14	0,08
Octavia	8	0,91	0,83	0,83	0,62	0,91	0,91	0,83	1,00	0,45	0,75	0,17	0,17	0,24	0,20	0,24	0,08	0,13	0,12	0,08	0,17	0,08
AF Cesar	9	0,45	0,35	0,35	0,40	0,45	0,50	0,35	0,45	1,00	0,50	0,08	0,08	0,17	0,14	0,14	0,08	0,13	0,12	0,14	0,14	0,05
KWS Asta	10	0,68	0,62	0,62	0,68	0,68	0,83	0,62	0,75	0,50	1,00	0,14	0,14	0,27	0,24	0,20	0,11	0,11	0,10	0,05	0,14	0,11
AC 08/290/26	11	0,20	0,24	0,20	0,11	0,20	0,17	0,24	0,17	0,08	0,14	1,00	0,75	0,45	0,50	0,62	0,24	0,24	0,28	0,24	0,24	0,27
KWS Salsa	12	0,17	0,24	0,20	0,11	0,20	0,17	0,24	0,17	0,08	0,14	0,75	1,00	0,45	0,50	0,50	0,24	0,28	0,24	0,20	0,27	0,24
KW 2-430	13	0,24	0,31	0,24	0,20	0,27	0,24	0,31	0,24	0,17	0,27	0,45	0,45	1,00	0,91	0,40	0,20	0,24	0,21	0,17	0,27	0,27
KW 2-431	14	0,20	0,27	0,20	0,17	0,24	0,20	0,27	0,20	0,14	0,24	0,50	0,50	0,91	1,00	0,45	0,20	0,21	0,18	0,14	0,24	0,24
Colonia	15	0,27	0,31	0,27	0,24	0,27	0,24	0,31	0,24	0,14	0,20	0,62	0,50	0,40	0,45	1,00	0,14	0,19	0,21	0,24	0,20	0,20
Paso	16	0,08	0,05	0,11	0,05	0,11	0,11	0,05	0,08	0,08	0,11	0,24	0,24	0,20	0,20	0,14	1,00	0,34	0,35	0,24	0,24	0,45
Wootan	17	0,13	0,13	0,13	0,06	0,16	0,13	0,13	0,13	0,13	0,11	0,24	0,28	0,24	0,21	0,19	0,34	1,00	0,72	0,55	0,59	0,50
FIF069	18	0,15	0,12	0,15	0,10	0,15	0,12	0,12	0,12	0,12	0,10	0,28	0,24	0,21	0,18	0,21	0,35	0,72	1,00	0,70	0,35	0,64
FM0471	19	0,11	0,08	0,08	0,05	0,11	0,08	0,08	0,08	0,14	0,05	0,24	0,20	0,17	0,14	0,24	0,24	0,55	0,70	1,00	0,27	0,40
RE18	20	0,17	0,14	0,17	0,08	0,20	0,17	0,14	0,17	0,14	0,14	0,24	0,27	0,27	0,24	0,20	0,24	0,59	0,35	0,27	1,00	0,35
Leibniz	21	0,11	0,08	0,14	0,11	0,11	0,08	0,08	0,08	0,05	0,11	0,27	0,24	0,27	0,24	0,20	0,45	0,50	0,64	0,40	0,35	1,00

Obrázek 9. Genetická podobnost na základě analýzy 14 a 21 SSR markerů.



Obrázek 10. Dendrogram genetických podobností testovaných odrůd (21 SSR).

4 Závěr

S rozvojem moderních molekulárně biologických metod a mapování rostlinného genomu se mikrosatelity staly užitečným nástrojem pro genotypizaci rostlin, především díky jejich extrémní variabilitě, kodominantní dědičnosti a distribuci napříč celým genomem. Postupné poznávání mikrosatelitních sekvencí vedlo k vyvinutí postupů pro rychlou, reprodukovatelnou a snadnou detekci jejich polymorfizmu, které mají široké spektrum využití v populační biologii rostlin.

V rámci práce byla zavedena podpůrná metoda pro identifikaci odrůd ječmene pomocí 21 SSR markerů. Byly zoptimalizovány reakční podmínky pro PCR a fragmentační analýzu, snížení reakčního objemu PCR na polovinu a sloučení jednotlivých reakcí do multiplexů vedlo k výraznému snížení nákladů a celkového množství prováděných analýz. Diskriminační síla vybrané sady markerů byla ověřena na souboru 21 vybraných odrůd ječmene. Bylo získáno 20 odlišných alelických profilů, u dvou odrůd ječmene jarního byla detekována shoda. Výsledné SSR profily pro jednotlivé odrůdy se ukládají do interní databáze, která bude průběžně doplňována.

5 Literatura

1. ISTA: Method validation reports on rules proposals for the International Rules for Seed Testing 2017 Edition. OM16-06, **2016**, 10-43.
2. ISTA: Species and variety testing. International Rules for Seed Testing **2017**, Chapter 8, i-8-26.
3. Korf M et al., **2004**. Insertion of 18 new SSR markers into the Oregon Wolfe Barley map.
4. Koutecký P, Košnar J, **2013**. Metody molekulární biologie v ekologii a systematice rostlin (Mikrosatelity).
5. Leišová L, Kučera L, Dotlačil L, **2007**. Genetic resources of barley and oat characterised by microsatellites. Czech J. Genet. Plant Breed., 43 (3): 97–104.
6. Leišová L a kol., **2008**. Použití metody analýzy mikrosatelitů pro charakterizaci odrůd pšenice, ječmene a ovsa pro potřeby semenářských podniků, šlechtitelských stanic a odrůdového zkušebnictví, VÚRV.
7. Mason AS, **2015**. SSR Genotyping. Plant Genotyping: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 1245, 77-89.
8. Nunno HM, **2012**. Forensic DNA Analysis. Forensic Chemistry Handbook, 291-326.
9. Perry DJ, Fernando U, Lee SJ, **2014**. Simple sequence repeat-based identification of Canadian malting barley varieties. Canadian Journal of Plant Science 94(3):485-496.
10. Pospíš P, Michálek P, Ruttkay-Nedecký B, Kopel P, Trnková L, **2014**. Optimalizace multiplex PCR. Journal of Metallomics and Nanotechnologies, 1(2), 60-63.
11. Taberlet P et al., **2007**. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. Nucleic acids research Vol. 35, No. 3 e14.
12. UPOV, **2013**. TGP/15 Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of DUS.
13. UPOV, **2010**. UPOV/INF/17/1 Guidelines for DNA-profiling: Molecular marker selection and database construction.
14. UPOV, **2010**. UPOV/INF/18/1 Possible use of molecular markers in the examination of DUS.
15. VŠÚO: Molekulární metody - hodnocení genotypů - Marker Assisted Breeding.
16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

JPP ÚKZÚZ

17. 60075.1 - Úprava a homogenizace vzorků osiv pro extrakci DNA.
18. 10700.1 - Izolace DNA (kit DNeasy Plant Mini).
19. 10250.2 - Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR.
20. 10258.1 - Kapilární elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR.

Manuály

21. Advanced Analytical: DNF-900 dsDNA Reagent Kit User Guide, **2014**.
22. Qiagen: DNeasy[®]Plant Handbook, **2012**.
23. Qiagen: Type-it[®]Microsatellite PCR Handbook, **2011**.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXV, 2021/3

Ročník: XXV, č. 3

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2021

Odpovědný redaktor: Mgr. Kristina Kohoutová

Počet stran: 60

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196