

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2026

Ročník XXX, číslo 2/2026

Brno 2026

Obsah

1	Zavedení stanovení bromidů v krmivech Eva Špačková, Petra Kosubová, Hana Kosová, Libor Jaša Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno Hroznová 2, 603 00 Brno	1
2	Zavedení kvalitativní detekce transgenu DP915635 u kukuřice Jana Stehlíková Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdMB Hroznová 2, 603 00 Brno	10
3	Testování přenosu tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) osivem Miroslava Hejlová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdDŠOR Šlechtitelů 773/23, 779 00 Olomouc	29

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Zavedení stanovení bromidů v krmivech

Eva Špačková, Petra Kosubová, Hana Kosová, Libor Jaša

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

ONRL Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno

eva.spackova@ukzuz.gov.cz

1 Souhrn

Cílem práce bylo vyvinout a validovat metodu pro stanovení bromidů v krmivech v rámci skupiny nežádoucích látek (reziduí pesticidů). Z navrhovaných metod pro stanovení bromidů – ICP-MS a LC-MS/MS byla v rámci této práce testována pouze metoda ICP-MS.

2 Úvod

Ve vyšších obsazích se bromidy přirozeně vyskytují v mořské vodě, v mořských řasách, případně jiných mořských organismech. Naproti tomu přirozený obsah bromidů v zemské kůře je velmi malý. Vyšší obsahy bromidů se mohou vyskytovat po aplikaci methylbromidu, kdy bromidový anion je jeho degradačním produktem. Používání methylbromidu jako fungicidního, případně insekticidního nebo rodenticidního přípravku, je v EU zakázáno od 1. 1. 2005. Methylbromid je nicméně stále využíván jako fumigační činidlo k ošetřování dřevěného obalového materiálu a palet. Samotný methylbromid poškozují ozónovou vrstvu a z toho důvodu bylo jeho použití v konvenčním zemědělství zakázáno.

Toxicita bromidů je významná na několika úrovních: vysoké koncentrace bromidů jsou neurotoxické. Dále interferují s metabolismem jódu, což má za následek nedostatečnou tvorbu thyroidních hormonů ve štítné žláze. To má vliv na celou řadu metabolických procesů – ovlivnění spotřeby kyslíku v ledvinové, jaterní a srdeční tkáni, ovlivnění termoregulace, regulace rychlosti buněčných oxidačních procesů a další. Sekundárně v průběhu laktace nedochází k efektivnímu transportu jódu do mléka, což má za následek neprospívající mláďata, která trpí nedostatkem jódu. (1)

Maximální limity bromidů v krmivech a potravinách upravuje nařízení Evropské komise EC 839/2008 (2). V Tabulce 1 jsou uvedeny matrice, které byly vybrány v rámci úředních kontrol/monitoringů v ÚKZÚZ pro stanovení bromidů včetně maximálních limitů pro bromidy.

Tabulka 1. Maximální limity pro rezidua bromidů podle nařízení EC 839/2008 (1).

Matrice	MLR (mg/kg)
Lupina úzkolistá	-
Žito	50
Pelushka	-
Pšenice	50
Pšeničná mouka krmná	50
Sójový extrahovaný šrot	20
Sója	20
Rýžové otruby	50
Slunečnice	20
Řasy	5
Kukuřice	50
Oves	50

Z analytického hlediska se nejčastěji využívají metody GC-MS a LC-MS s ohledem na další spektrum pesticidních analytů. Nicméně vzhledem k tomu, že se jedná, co se velikosti týče, o jednoduchý analyt, je paradoxně stanovení těmito technikami náročnější a je zatíženo různými interferencemi. Naproti tomu technika ICP-MS nevyžaduje separaci na koloně a je možné měřit bromidy přímo v extraktu vzorku. Co se týče extrakce vzorku, využila se analogie se stanovením jódu v krmivech, a proto byla testována extrakce tetramethylamonium hydroxidem (3).

Pro vývoj metody a následnou validaci byly použity vzorky z úředních kontrol a monitoringu krmiv (2023-2024).

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- 3.1.1 Demineralizovaná voda, ultračistá.
- 3.1.2 Tetramethylamonium hydroxid, 25% (m/m), p.a.
- 3.1.3 Základní standardní roztok Ge, $c = 1000 \text{ mg/l}$.
- 3.1.4 Základní standardní roztok Te, $c = 1000 \text{ mg/l}$.
- 3.1.5 Bromid draselný, p.a.

3.2 Zařízení

- 3.2.1 Analytické váhy.
- 3.2.2 Sušárna.
- 3.2.3 Plastové cejchované uzavíratelné nádoby (objem 50 ml) vhodné do centrifugy.
- 3.2.4 ICP-MS spektrometr.
- 3.2.5 Zařízení na přípravu ultračisté vody.
- 3.2.6 Plastové nádoby.
- 3.2.7 Centrifuga.
- 3.2.8. Skleněné odměrné baňky.
- 3.2.9. Automatické pipety.

3.3 Příprava vzorků

Vzorek byl navážen (0,5 g s přesností 0,0001 g) do 50 ml PE nádoby (3.2.3), bylo přidáno 10 ml vody (3.1.1.) a důkladně promíchán. Poté byly přidány 2 ml TMAH (3.1.2) a obsah byl opět důkladně promíchán. Nádoba byla poté uzavřena a umístěna do sušárny (3.2.2) na 3 h při teplotě $(90 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Po vyjmutí ze sušárny se extrakt nechal zchladnout na laboratorní teplotu. Poté se doplnil vodou (3.1.1) na objem 50 ml a extrakt se odstředil na centrifuze (3.2.7) po dobu 20 min při 2000 g. Čirý supernatant se slil do plastové nádoby (3.2.6) a do měření se uchoval v lednici. Měření probíhalo do 24 h po extrakci.

3.4 Měření

Neředěné extrakty byly analyzovány metodou ICP-MS. V tabulce 2 jsou uvedeny pracovní podmínky pro ICP-MS techniku.

Tabulka 2. Pracovní podmínky ICP-MS spektrometru.

Parametr	Hodnota	
Výkon (W)	1600	
Plazmový plyn (l/min)	15,00	
Auxiliary plyn (l/min)	0,90	
Makeup (l/min)	0,15	
Zmlžovač (l/min)	1,00	
Měřicí mód	He	H ₂
Průtok He/H ₂ (ml/min)	5,0	4,1

Pro přípravu kalibračních standardů byl použit pevný bromid draselný (3.1.5.), ze kterého byl připraven základní standardní roztok o koncentraci 1 g/l Br. Postupným ředěním byla následně připravena řada kalibračních roztoků o koncentraci (0; 10; 20; 50; 100; 500; 1000) µg/l. Roztoky vnitřních porovnávacích prvků Ge a Te (o koncentraci 500 µg/l) byly připraveny postupným ředěním základních standardních roztoků (3.1.3 a 3.1.4). Kalibrační roztoky i roztoky vnitřních porovnávacích prvků obsahovaly 1% TMAH (3.1.2).

4 Výsledky a diskuse

Pro stanovení bromidů v krmivech byly testovány dva izotopy brómu, a to ⁷⁹Br a ⁸¹Br. U obou izotopů se vyskytuje několik významných spektrálních interferencí (Tabulka 3).

Tabulka 3. Možné spektrální interference při stanovení brómu.

Izotop	Interferent
⁷⁹ Br	⁴⁰ Ar ³⁹ K ⁺ , ³⁸ Ar ⁴⁰ ArH ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ₃ ⁺ , ¹⁵⁸ Gd ²⁺
⁸¹ Br	⁴⁰ Ar ⁴⁰ ArH ⁺ , ³² S ¹⁶ O ₃ H ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ₃ ⁺ , ¹⁶² Dy ²⁺

S ohledem na charakter polyatomických interferencí a rozmanitost vzorků bylo stanovení prováděno jak ve vodíkovém, tak v héliovém módu. Pro vyhodnocení naměřených dat byly taktéž použity dva vnitřní porovnávací prvky – ⁷²Ge a ¹²⁵Te.

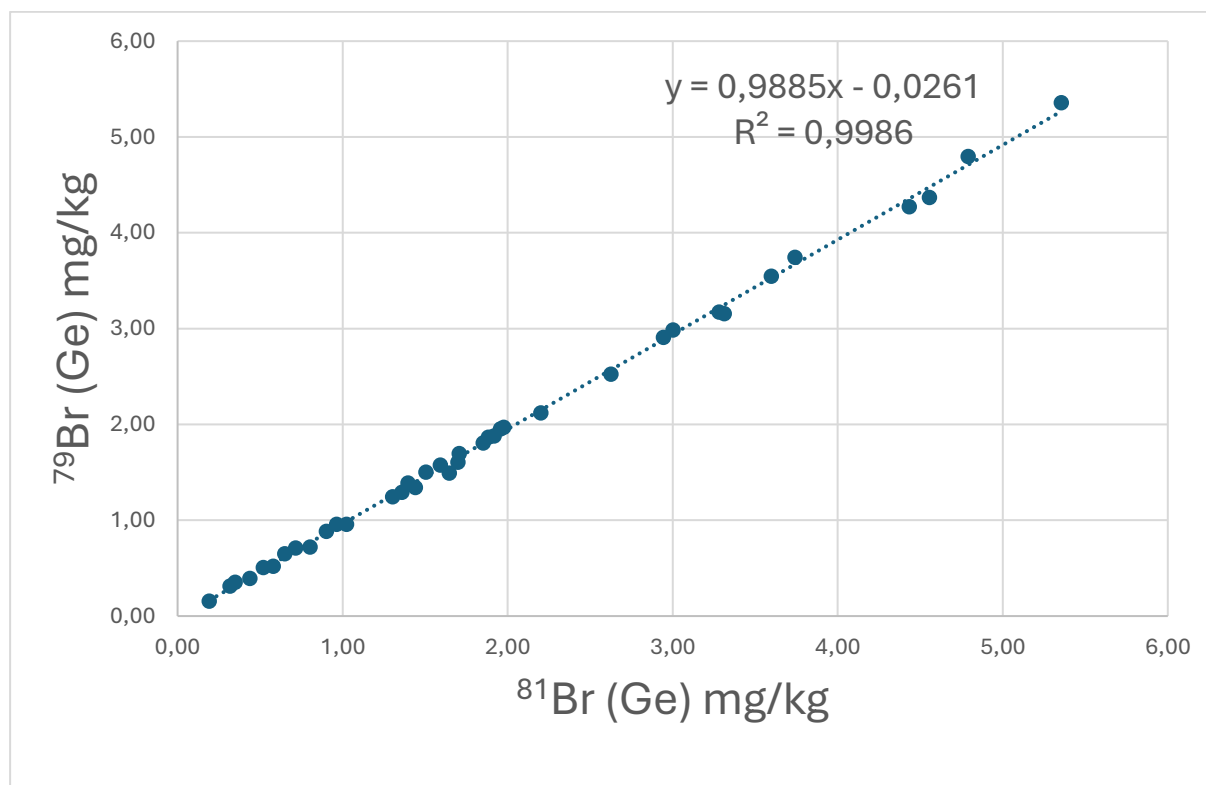
Tabulka 4. Naměřené obsahy brómu ve vybraných vzorcích krmiv (mg/kg).

Vzorek	⁷⁹ Br				⁸¹ Br			
	He mód		H ₂ mód		He mód		H ₂ mód	
	⁷² Ge	¹²⁵ Te	⁷² Ge	¹²⁵ Te	⁷² Ge	¹²⁵ Te	⁷² Ge	¹²⁵ Te
117	0,48 ± 0,01	0,55 ± 0,06	0,51 ± 0,04	0,52 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,55 ± 0,03	0,52 ± 0,05	0,52 ± 0,01
122	0,77 ± 0,04	0,85 ± 0,06	0,71 ± 0,04	0,78 ± 0,03	0,76 ± 0,07	0,82 ± 0,07	0,71 ± 0,02	0,77 ± 0,02
158	3,02 ± 0,08	3,22 ± 0,11	2,98 ± 0,51	3,17 ± 0,10	3,05 ± 0,11	3,25 ± 0,15	3,00 ± 0,14	3,00 ± 0,33
197	0,65 ± 0,04	0,71 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0,70 ± 0,02	0,61 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,69 ± 0,02
206	2,20 ± 0,13	3,13 ± 0,06	1,97 ± 0,08	2,85 ± 0,14	2,21 ± 0,05	3,14 ± 0,17	1,98 ± 0,07	2,64 ± 0,40
256	1,51 ± 0,03	1,69 ± 0,05	1,39 ± 0,02	1,62 ± 0,04	1,51 ± 0,03	1,67 ± 0,01	1,40 ± 0,02	1,61 ± 0,04
266	2,16 ± 0,05	2,43 ± 0,10	1,95 ± 0,04	2,17 ± 0,03	2,13 ± 0,08	2,31 ± 0,11	1,96 ± 0,03	2,17 ± 0,02
120	0,39 ± 0,04	0,42 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,39 ± 0,01
155	1,58 ± 0,04	1,71 ± 0,13	1,50 ± 0,14	1,62 ± 0,11	1,68 ± 0,09	1,76 ± 0,08	1,51 ± 0,13	1,63 ± 0,08
196	1,79 ± 0,09	1,81 ± 0,07	1,70 ± 0,04	1,78 ± 0,05	1,87 ± 0,05	1,89 ± 0,03	1,71 ± 0,01	1,77 ± 0,03
264	5,77 ± 0,22	5,82 ± 0,25	5,36 ± 0,17	5,64 ± 0,12	5,78 ± 0,08	5,82 ± 0,10	5,36 ± 0,15	5,78 ± 0,23
486	2,06 ± 0,09	2,11 ± 0,13	1,81 ± 0,06	2,00 ± 0,12	2,03 ± 0,06	2,11 ± 0,14	1,85 ± 0,07	2,08 ± 0,10
568	3,24 ± 0,17	3,39 ± 0,14	2,91 ± 0,06	3,33 ± 0,06	3,19 ± 0,08	3,36 ± 0,09	2,94 ± 0,05	3,38 ± 0,03
742	5,57 ± 0,10	5,78 ± 0,04	4,80 ± 0,04	5,54 ± 0,11	5,57 ± 0,07	5,81 ± 0,06	4,79 ± 0,03	5,60 ± 0,29
1371	4,13 ± 0,20	4,59 ± 0,14	3,55 ± 0,03	4,17 ± 0,23	4,29 ± 0,28	4,49 ± 0,36	3,72 ± 0,10	4,08 ± 0,22
504	1,08 ± 0,07	1,23 ± 0,12	0,96 ± 0,02	1,14 ± 0,04	1,06 ± 0,04	1,20 ± 0,08	0,96 ± 0,02	1,15 ± 0,04
505	2,06 ± 0,05	2,20 ± 0,11	1,88 ± 0,09	2,16 ± 0,12	2,07 ± 0,06	2,18 ± 0,07	1,92 ± 0,08	2,24 ± 0,09
737	1,99 ± 0,08	2,07 ± 0,09	1,87 ± 0,06	2,12 ± 0,06	2,00 ± 0,12	2,09 ± 0,14	1,88 ± 0,06	2,10 ± 0,08
739	0,38 ± 0,05	0,42 ± 0,03	0,31 ± 0,04	0,36 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,39 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,38 ± 0,04
768	3,90 ± 0,03	4,03 ± 0,04	3,75 ± 0,01	3,91 ± 0,03	3,90 ± 0,14	4,03 ± 0,16	3,74 ± 0,05	3,67 ± 0,41
1043	1,68 ± 0,04	1,90 ± 0,06	1,61 ± 0,02	1,50 ± 0,03	1,69 ± 0,08	1,90 ± 0,06	1,70 ± 0,01	1,87 ± 0,02
1162	0,86 ± 0,07	1,04 ± 0,02	0,88 ± 0,06	0,88 ± 0,01	0,84 ± 0,03	0,96 ± 0,13	0,90 ± 0,01	1,00 ± 0,08
1056	3,30 ± 0,08	3,61 ± 0,46	3,16 ± 0,12	3,35 ± 0,27	3,40 ± 0,10	3,75 ± 0,31	3,31 ± 0,16	3,65 ± 0,23
1530	1,30 ± 0,01	1,31 ± 0,14	1,25 ± 0,06	1,09 ± 0,12	1,22 ± 0,10	1,31 ± 0,11	1,30 ± 0,06	1,28 ± 0,08
1474	1,55 ± 0,09	1,67 ± 0,10	1,49 ± 0,06	1,43 ± 0,06	1,56 ± 0,13	1,67 ± 0,14	1,65 ± 0,20	1,75 ± 0,21
1546	1,31 ± 0,16	1,43 ± 0,19	1,29 ± 0,05	1,22 ± 0,06	1,35 ± 0,10	1,46 ± 0,10	1,36 ± 0,07	1,48 ± 0,07
1482	3,30 ± 0,05	3,59 ± 0,05	3,17 ± 0,08	2,88 ± 0,03	3,30 ± 0,02	3,63 ± 0,07	3,28 ± 0,07	3,59 ± 0,02
1021	4,36 ± 0,12	5,02 ± 0,16	4,37 ± 0,10	3,77 ± 0,19	4,51 ± 0,08	4,85 ± 0,22	4,56 ± 0,09	4,74 ± 0,28
1419	0,68 ± 0,02	0,68 ± 0,01	0,72 ± 0,05	0,69 ± 0,02	0,70 ± 0,02	0,71 ± 0,04	0,80 ± 0,05	0,73 ± 0,02
1420	1,33 ± 0,11	1,35 ± 0,10	1,34 ± 0,12	1,23 ± 0,10	1,30 ± 0,10	1,32 ± 0,10	1,44 ± 0,10	1,29 ± 0,08
1190	0,52 ± 0,01	0,59 ± 0,11	0,52 ± 0,04	0,51 ± 0,04	0,54 ± 0,04	0,53 ± 0,04	0,58 ± 0,05	0,53 ± 0,04
1254	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,03
1139	1,63 ± 0,10	1,68 ± 0,08	1,58 ± 0,06	1,55 ± 0,01	1,70 ± 0,03	1,76 ± 0,01	1,59 ± 0,09	1,65 ± 0,02
1186	0,38 ± 0,02	0,41 ± 0,06	0,39 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,40 ± 0,02

Vzorek	⁷⁹ Br				⁸¹ Br			
	He mód		H ₂ mód		He mód		H ₂ mód	
	⁷² Ge	¹²⁵ Te	⁷² Ge	¹²⁵ Te	⁷² Ge	¹²⁵ Te	⁷² Ge	¹²⁵ Te
1236	2,02 ± 0,11	2,04 ± 0,09	2,12 ± 0,10	1,99 ± 0,10	2,02 ± 0,07	2,07 ± 0,09	2,20 ± 0,07	2,06 ± 0,12
1348	2,49 ± 0,01	2,54 ± 0,25	2,52 ± 0,05	2,43 ± 0,09	2,60 ± 0,08	2,58 ± 0,22	2,63 ± 0,02	2,51 ± 0,09
1554	4,25 ± 0,01	4,25 ± 0,01	4,27 ± 0,01	4,27 ± 0,02	4,31 ± 0,02	4,31 ± 0,01	4,43 ± 0,03	4,40 ± 0,01
1308	0,95 ± 0,07	0,91 ± 0,08	0,96 ± 0,05	0,89 ± 0,03	1,01 ± 0,07	0,96 ± 0,06	1,02 ± 0,02	0,94 ± 0,03

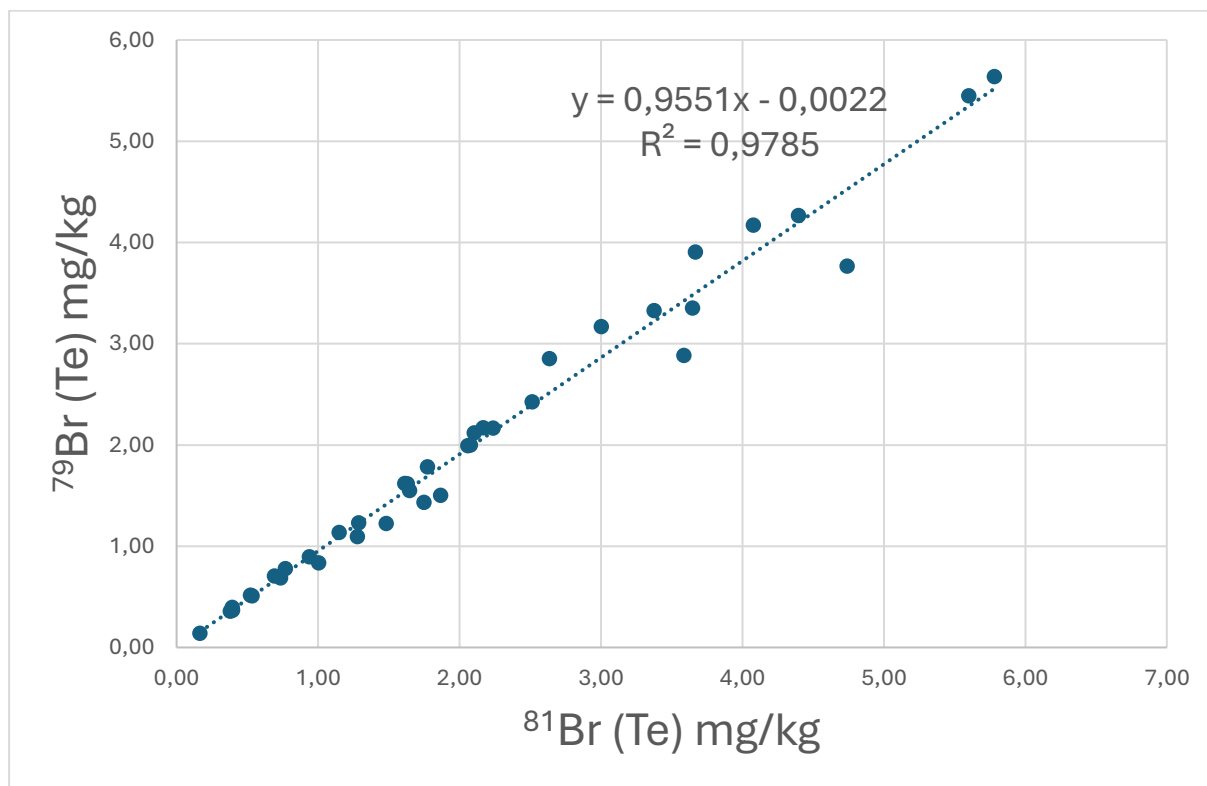
V Tabulce 4 jsou prezentována všechna naměřená data spolu se směrodatnou odchylkou (dvě paralelní stanovení). Během měření bylo zjištěno, že výsledky měřené v heliovém módu jsou zatíženy podstatně vyšší relativní směrodatnou odchylkou měření ($> 3\%$). Naproti tomu ve vodíkovém módu byla relativní směrodatná odchylka měření do 3% . Proto pro výběr vhodného izotopu brómu, vnitřního porovnávacího prvku a následnou validaci metody byla vybrána pouze data naměřená ve vodíkovém módu.

Oba zmiňované izotopy brómu poskytují velmi podobné výsledky při použití Ge jako vnitřního porovnávacího prvku (Obrázek 1).



Obrázek 1. Srovnání dat naměřených na izotopech ⁷⁹Br a ⁸¹Br – ⁷²Ge jako vnitřní porovnávací prvek.

Jiná situace je při použití Te jako vnitřního porovnávacího prvku, kde při obsazích nad 2,5 mg/kg jsou již výsledky výrazně rozdílné (Obrázek 2).



Obrázek 2. Srovnání dat naměřených na izotopech ^{79}Br a ^{81}Br – ^{125}Te jako vnitřní porovnávací prvek.

Z tohoto důvodu bylo jako vnitřní porovnávací prvek vybráno ^{72}Ge a izotop ^{81}Br .

Vzorky řas, které obsahují podstatně vyšší obsahy brómu, byly posuzovány samostatně a nebyly zahrnuty do celkového srovnání, právě z důvodu mnohonásobně vyšších obsahů bromidů (Tabulka 5). Zde je nutné uvést, že vzorky řas nebyly určeny k výrobě krmiv ani potravin a byly získány v rámci validační studie pro stanovení anorganického arsenu v řasách.

Tabulka 5. Obsahy brómu ve vzorcích řas (mg/kg).

Vzorek	^{79}Br				^{81}Br			
	He mód		H ₂ mód		He mód		H ₂ mód	
	^{72}Ge	^{125}Te	^{72}Ge	^{125}Te	^{72}Ge	^{125}Te	^{72}Ge	^{125}Te
HIJIKI	177,7 ± 0,9	188,1 ± 3,7	175,2 ± 2,1	195,2 ± 2,9	183,7 ± 3,3	193,5 ± 4,0	175,6 ± 3,7	195,9 ± 4,3
745	520,7 ± 9,0	558,0 ± 3,9	511,6 ± 10,1	579,8 ± 11,8	523,2 ± 10,6	567,2 ± 7,0	505,8 ± 13,5	574,5 ± 5,8
892	1331 ± 67	1394 ± 24	1385 ± 46	1686 ± 39	1309 ± 36	1417 ± 24	1379 ± 10	1678 ± 40
906	402,8 ± 7,8	455,4 ± 17,7	406,3 ± 7,4	481,7 ± 9,2	405,6 ± 4,0	481,5 ± 7,6	404,0 ± 7,5	478,9 ± 9,4

Srovnání naměřených hodnot t-testem (vodíkový mód, Ge jako vnitřní porovnávací prvek) prokázalo, že výsledky získané měřením na obou izotopech jsou shodné.

Vzhledem k absenci většího souboru vzorků řas nebyly tyto výsledky zařazeny do validace metody, a tudíž nebude zatím metoda pro tuto matici validována. Nařízení Evropské komise EC 839/2008 (2), které uvádí maximální limit pro řasy 5 mg/kg, je zřejmě určeno pro řasy sladkovodní a nikoli mořské, které mají samy o sobě vysoký přirozený obsah brómu.

Naměřené hodnoty ze slepých pokusů byly použity pro výpočet meze detekce (MD) a meze stanovitelnosti (MS). Z hodnot získaných z paralelních stanovení byly vypočítány hodnoty opakovatelnosti a nejistoty.

Tabulka 6. Základní validační parametry.

Parametr	⁸¹ Br
	H ₂ mód
	⁷² Ge
MD	0,09 mg/kg
MS	0,3 mg/kg
Opakovatelnost <3MS	5,58 %
Opakovatelnost >3MS	3,49 %
Nejistota <3MS	11,2 %
Nejistota >3MS	6,98 %

Pro ověření správnosti bylo analyzováno několik referenčních materiálů – rýže, čočka, a sója s velmi dobrou shodou s referenční hodnotou (Tabulka 7).

Tabulka 7. Obsahy brómu v referenčních materiálech a vzorcích z PT (mg/kg).

Vzorek	⁸¹ Br	RM hodnota
	H ₂ mód	
	⁷² Ge	
RM Rýže	97,0 ± 1,2	97,6 ± 31,4
RM Čočka	42,2 ± 0,6	41,4 ± 3,11
RM Sója	15,2 ± 0,2	15,3 ± 1,15
RM P2415	12,1 ± 0,1	12,0

Validační parametry, stejně tak správnost, byly zpracovány v modulu Validace v Labsystému (LIMS 7).

5 Závěr

V rámci práce byl zaveden nový parametr – Br v krmivech. Metoda byla validována na vzorcích krmiv/krmných surovin získaných v rámci úředních kontrol a monitoringu krmiv na rezidua pesticidů. Pro nedostatečný počet vzorků řas a podstatně vyšší přirozené obsahy brómu v řasách mořských, které byly v rámci práce testovány, byla tato matrice z validace prozatím vyřazena.

6 Literatura

1. Risk to human and animal health from the presence of bromide in food and feed, EFSA Journal, 2025; 23:e9121.
2. Nařízení Komise (ES) č. 839/2008 ze dne 31. července 2008.
3. Stanovení obsahu jódu metodou ICP-MS, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv, ÚKZÚZ, 2025.

Zavedení kvalitativní detekce transgenu DP915635 u kukuřice

Jana Stehlíková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdMB, Hroznová 2, 603 00 Brno
jana.stehlikova@ukzuz.gov.cz

1 Úvod

Geneticky modifikovaný organismus (GM organismus, GMO) je [organismus](#), jehož [genetický materiál](#) byl úmyslně změněn, a to způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací. Dotčené techniky jsou definovány v Zákonu o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty č. 78/2004 Sb.

Geneticky modifikované (GM) plodiny jsou takové rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál (DNA) pomocí genových technologií.

GM kukuřice DP915635

Unique Identifier UI: DP-915635-4

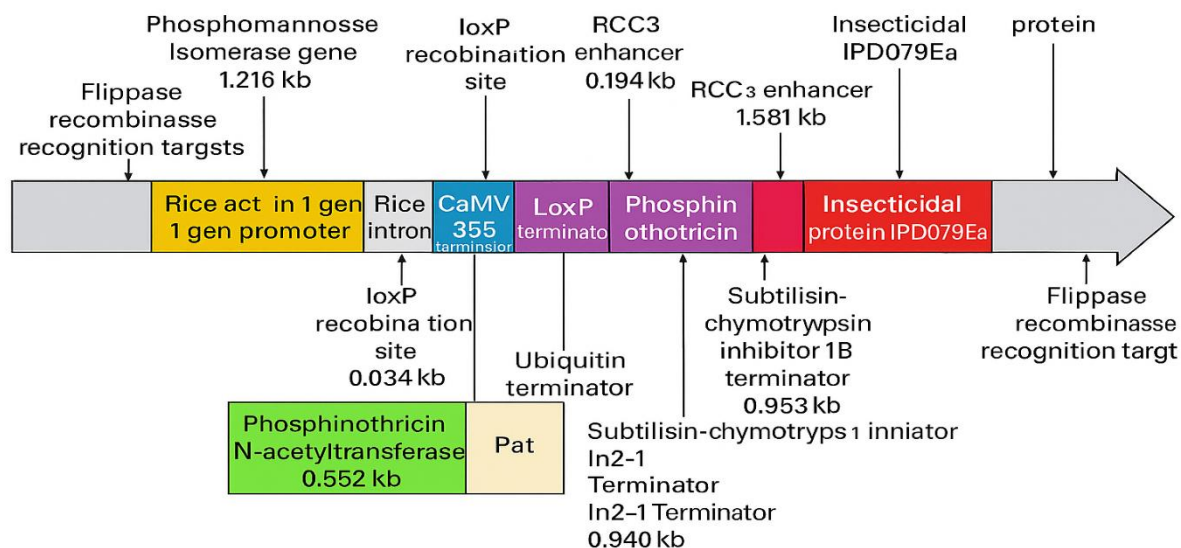
Pro vývoj kukuřice DP-915635-4 byla využita transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Výsledná GM kukuřice vykazuje kombinovanou toleranci k herbicidům glufosinátu, glyfosátu, odolnost vůči vybranému hmyzu a změněný metabolismus manózy.

Základní obsažené genetické modifikace jsou:

- pat, umožňující rostlině syntézu enzymu fosfinotricin N-acetyltransferáza (PAT) ze *Streptomyces viridochromogenes* a tím eliminuje herbicidní účinek glufosinátových herbicidů.
- PMI, umožňující syntézu enzymu fosfomanózové izomerázy (PMI) z *Escherichia coli*, tím metabolizuje manózu a umožňuje pozitivní selekci pro obnovu transformovaných rostlin (selekční markr).

- ipd079Ea gen z *Ophioglossum pendulum*, který umožňuje syntézu proteinu IPD0079Ea, který zajišťuje odolnost vůči hmyzím škůdcům (*Diabrotica* spp.)

Transgenní kazeta DP915635 je znázorněna na obrázku č. 1.



Flippase recombinase recognition targets	0.048 kb
Phosphomannose Isomerase gene	1.216 kb
Proteinase inhibitor II gene terminator	0.311 kb
19-kDa zein gene terminator	0.742 kb
Rice actin 1 gene promoter	1.682 kb
Rice actin 1, intron	0.000 kb
Phosphinothricin N-actyltransferase	0.552 kb
CaMV 35S terminator	0.194 kb
loxP recombination site	0.034 kb
Ubiquitin terminator	0.584 kb
Gomma kafarin terminator	0.464 kb
RCc3 enhancer	1.581 kb
RCc3 enhancer	1.581 kb
RCc3 enhancer	1.581 kb
PCOa promoter	0.911 kb
Predicted calmodulin 5 gene intron	0.856 kb
Insecticidal protein IPD079Ea	1.440 kb
Subtilisin-chymotrypsin inhibitor 1B terminator	0.953
27-kDA gamma zein terminator	0.460 kb
In2-1 Terminator	0.940 kb
Flippase recombinase recognition targets	0.048 kb

Obrázek č. 1. Transgenní kazeta DP-915635-4, Biosafety Clearing-House

2 Cíl

Cílem práce bylo rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u kukuřice o kvalitativní stanovení DP915635 a určení meze detekce stanovení (MD). Součástí je ověření detekce screeningového elementu pat v použitém referenčním materiálu.

3 Princip

Základem metody detekce genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o běžně používanou metodu, při které dochází k mnohonásobnému zmnožení konkrétního požadovaného úseku DNA. V tomto případě se jedná o klasickou PCR s elektroforetickou detekcí amplikonu na agarózovém gelu.

4 Materiál a metody

Pro zavedení byly použity izoláty DNA z certifikovaných referenčních materiálů od The American Oil Chemists' Society (AOCS) a IRMM Institute for reference Material and Measurements (IRMM).

- AOCS 0411-C, non modified maize powder, (pure, blank) - laboratorní značení: CRM 14/2016
- ERM – BF447b, DP915635 Maize, seed powder, (990 g/kg) - laboratorní značení: CRM 1/2025
- ERM – BF447c, DP915635 Maize, seed powder, (990 g/kg) - laboratorní značení: CRM 2/2025
- AOCS 0707-B4, A2704-12 soy leaf tissue genomic DNA (> 999.9 ng/μg) – laboratorní značení: CRM 24/2012

Izolace byla provedena pomocí zavedeného komerčního kitu (NucleoSpin® Food – MACHEREY-NAGEL). U izolátů DNA byla změřena koncentrace, byly otestovány na kvalitu i amplifikovatelnost DNA.

V rámci verifikace byla stanovena správnost stanovení. K tomu bylo využito 5 izolátů (A-C) CRM 1 a 2/2025. Zároveň byl otestován i směsný CRM 14/2016, sloužící pro stanovení meze

detekce. Směsný izolát (Sm) vznikl smícháním izolátů A-E CRM 14/2016, změřením koncentrace výsledné směsi a naředěním na koncentraci požadovanou do reakce.

PCR s koncentrací DNA v izolátu 5ng/μl a s koncentrací DNA 10 ng/μl byla provedena u CRM DP915635 v izolátech A-E.

Dále byla ověřena detekce screeningového elementu pat v CRM 1/2025 a 2/2025 u izolátů A-C a u směsného izolátu CRM 14/2016.

Součástí verifikace bylo stanovení meze detekce (MD) na hladině $\leq 0,1$ % GM m/m. K dispozici byl CRM s 99 % GM m/m. Postupným ředěním izolované DNA byla připravena koncentrační řada 99-0,05 % m/m GM. Pro ředění izolátu DNA z CRM s GM byl použit izolát DNA z CRM stejné, nemodifikované plodiny (NK, CRM 14/2016, 0 % GM m/m) o stejné koncentraci DNA v izolátu.

Mez detekce byla ověřena provedením pěti nezávislých PCR (amplifikací) zaváděné modifikace.

Pro zavedení byly využity následující metody.

- Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1
- ID č. 7_Validace metod v NRL, Příloha č. 6_Verifikace metod založených na polymerázové řetězové reakci pro stanovení genetických modifikací v osivech, krmivech a krmných směsích.
- Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2011.
- Event-specific Method for the Quantification of maize DP915635 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, EURL-VL-07/20VP, JRC Publication JRC132849, 2023.

4.1 Přístroje a pomůcky

Extrakce DNA

Váhy s přesností 0,01 g.

Vodní lázeň nebo termoblok, přednostně s vibrací, třepáním.

Centrifuga.

Minishaker, vortex.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Přenosná UV lampa.

Digestoř.

pHmetr.

Lednice.

Mrazicí box.

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

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2 – 2,5) ml.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Nízkoobjemový spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

pHmetr.

Mrazicí box.

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

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2 – 2,5) ml.

Elektroforetická vana, zdroj napětí, elektroforetické hřebínky.

Fotodokumentační zařízení se softwarem BIO PRINT TX4 (Vilber Lourmat).

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

PCR reakce – amplifikace

PCR box.

Minishaker, vortex.

Termální cyklér C 1000 Touch Thermal Cycler (BIO RAD)

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

Plastové sterilní zkumavky, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.

Výrobník ledu.

Lednice.

Mrazicí box.

Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování ledu.

4.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

Extrakce DNA: NucleoSpin® Food, výrobce Macherey – Nagel, kit pro izolaci genomické DNA z potravin a krmiv

Lysis Buffer CF.

Buffer C4.

Wash buffer CQW.

Wash buffer C5 (koncentrát).

Elution buffer CE.

NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).

Proteinase K (lyofilizát).

Proteinase buffer PB.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Agaróza pro molekulární biologii (Agarose for molecular biology, Sigma Aldrich).

Pracovní roztok 1 × TAE pro elektroforézu.

1% Pracovní roztok interkalačního barviva (ethidium bromid).

Elektroforetický marker pro izolát DNA (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Life Technologies Czech Republic).

6 × Loading Dye Solution.

Elektroforetický marker pro amplifikáty (EZ Load™ Molecular Ruler 50 bp PCR Biorad).

Ribonuklease A 10 mg / ml (DNase and protease free).

PCR reakce – amplifikace

REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl₂, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDTaq).

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.

PCR voda.

Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů

Voda vhodná pro PCR.

Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.

Amplifikační primery:

Pro analýzy byly použity amplifikační primery od firmy Generi-Biotech.

Vnitřní (referenční) gen kukuřice – škrobová invertáza: IVRI-F / IVRI-R

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

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

DP915635: DP-915635-4 F / DP915635- 4 R

DP915635-4 F: GCA TCT AGG ACC GAC TAG CTA ACT AAC

DP915635-4 R: CTT TGC ATC ATG TCT TGA ACA ATG

Pat: pat_16-L / pat_16-R

PAT_16-L (F): GAT ATG GCC GCG GTT TGT GAT

PAT_16-R (R): TTC CAG GGC CCA GCG TAA G

5 Pracovní postup

Pro zavádění byly použity postupy JPP 10252.1 (Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR-kit Nucleospin Food), JPP 10255.1 (Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO), JPP 10257.1 (Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR) a JPP 10259.1 (Vyhodnocení výsledků stanovení GMO metodou PCR).

Složení reakční směsi pro PCR pomocí kitu REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (jednoduchá PCR) pro vnitřní gen kukuřice, GM DP915635 a pat je uvedeno v tabulce č. 1. Jednotlivé amplifikační programy jsou uvedeny v tabulkách č. 2 až 4.

Tabulka č. 1.

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			6,5
RedTaq PCR MIX	2×	1×	12,5
Primer F	20 μM	0,4 μM	0,5
Primer R	20 μM	0,4 μM	0,5
Templátová DNA	10 ng/μl	2 ng/ul	5
Objem směsi vč. templátu			25

Vnitřní gen kukuřice (škrobová invertáza)primery: IVRI-F / IVRI-Rdélka amplikonu: 225 bp**Tabulka č. 2. Amplifikační program.**

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	50	35
Annealing	68	110	
Extenze	72	120	
Závěrečná extenze	72	300	1

patprimery: PAT_16-L (F)/ PAT_16-R (R):délka amplikonu: 186bp**Tabulka č. 3. Amplifikační program.**

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing a extenze	60	60	

DP915635primery: DP915635-4 F / DP915635-4 Rdélka amplikonu: 74 bp

Tabulka č. 4. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing a extenze	60	60	

6 Výsledky a diskuse

6.1 Kvalita DNA

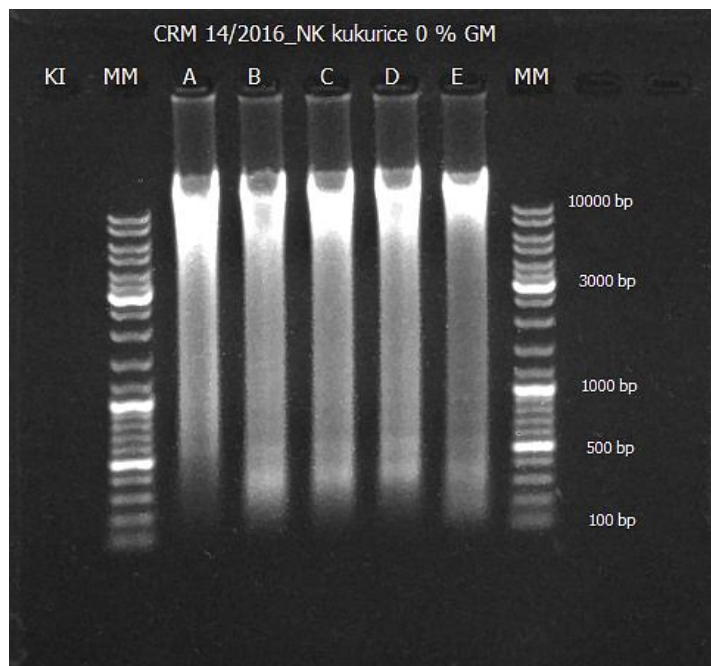
Pro potřeby zavádění, byla extrahována DNA z CRM geneticky nemodifikované kukuřice (CRM 14/2016) a z CRM GM kukuřice DP915635-4 (CRM 1/2025 a 2/2025). U izolátů byla změřena koncentrace (tabulka č. 5), otestována kvalita i amplifikovatelnost DNA při stanovení vnitřního genu – škrobové invertázy (obrázky č. 5 až 7).

Všechny získané izoláty CRM vyhovovaly pro následující analýzy.

Tabulka č. 5. CRM 14/2016, CRM 1/2025, CRM 2/2025– hodnoty naměřených koncentrací a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.

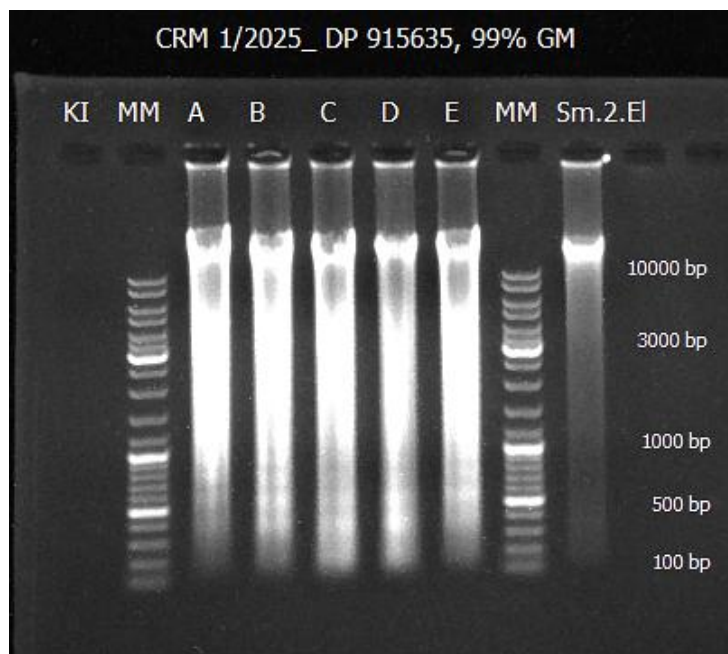
CRM	Izolát	Koncentrace ng/μl	A 260/A 280	A 260/A 230
CRM 1/2025_ DP915635 99 % GM m/m Izolace 4.12. 2025 Izoláty A, B, C, D, E	A	308,3	1,84	2,25
	B	278,9	1,85	2,32
	C	263,2	1,85	2,30
	D	262,5	1,85	2,28
	E	245,0	1,85	2,32
CRM 2/2025_ DP915635 0,099 % GM m/m Izolace 4. 12. 2025 Izoláty A, B, C, D, E	A	265,4	1,85	2,28
	B	234,6	1,86	2,32
	C	202,9	1,85	2,26
	D	171,2	1,85	2,35
	E	199,5	1,86	2,33
CRM 14/2016_ Kukuřice NK 0 % GM m/m Izolace 3. 12. 2025 Izoláty A, B, C, D, E	A	185,8	1,84	2,30
	B	172,1	1,85	2,31
	C	177,6	1,85	2,30
	D	167,3	1,85	2,31
	E	187,1	1,85	2,29

Kvalita izolátů DNA



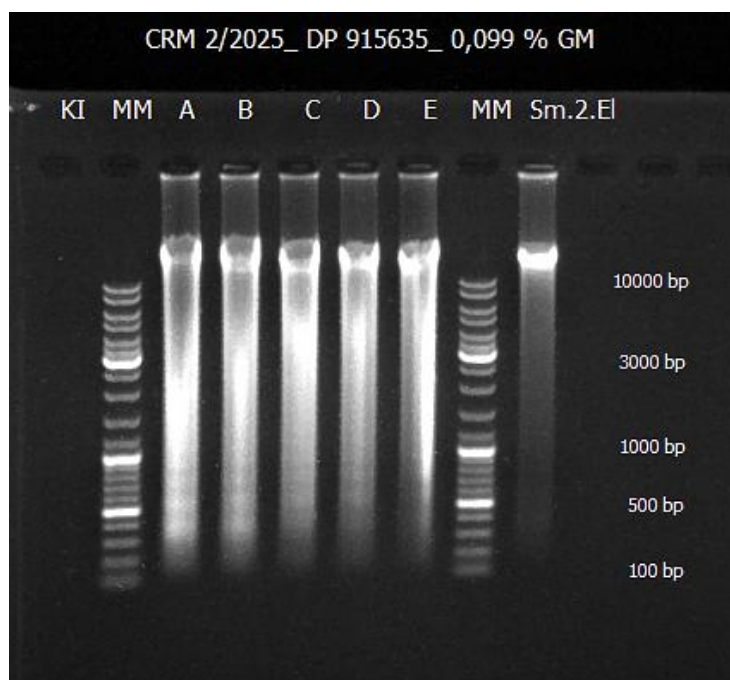
Obrázek č. 2.

Kvalita izolátů DNA, CRM 14/2016_ izoláty NK A-E. MM – Elektroforetický marker, KI – kontrola izolace. 9. 12. 2025.



Obrázek č. 3.

Kvalita izolátů DNA, CRM 1/2025 izoláty A-E a směs izolátů z 2. eluce (Sm2.El). MM – Elektroforetický marker, KI – kontrola izolace. 9. 12. 2025.

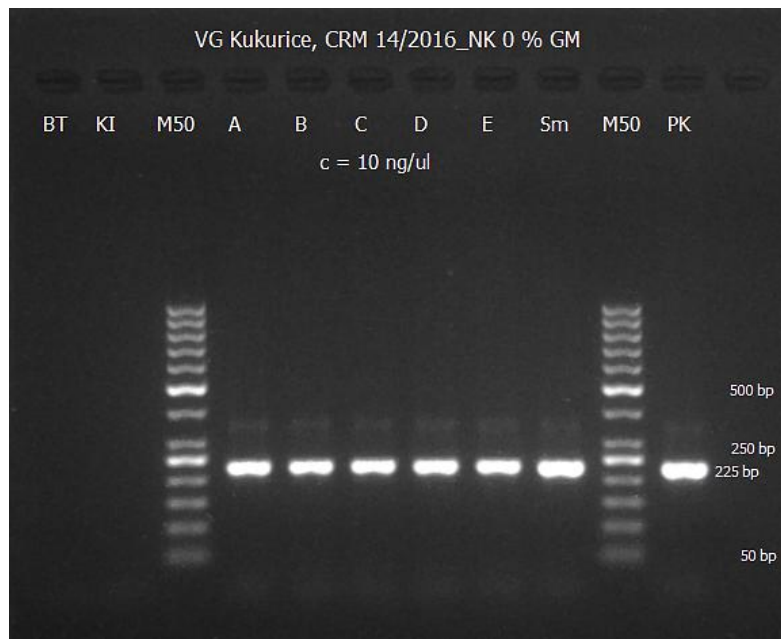


Obrázek č. 4.

Kvalita izolátů DNA, CRM 2/2025 izoláty A-E a směs izolátů z 2. eluce (Sm2.El).

MM – Elektroforetický marker, KI – kontrola izolace. 9. 12. 2025.

6.2 Vnitřní gen kukuřice



Obrázek č. 5.

Vnitřní gen kukuřice (225 bp) pro CRM 14/2016, izoláty A-E a směsný izolát Sm. BT – beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace. PK – CRM 5/2022. 13. 1. 2026.



Obrázek č. 6.

Vnitřní gen kukuřice (225 bp) pro CRM 1/2025, izoláty A-E, směsný izolát (Sm) a směsný izolát z 2. eluce (Sm2.El) pro koncentrace 10 ng/ μ l a 5 10 ng/ μ l.

BT – beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace.

PK – CRM 5/2022. 13. 1. 2026



Obrázek č. 7.

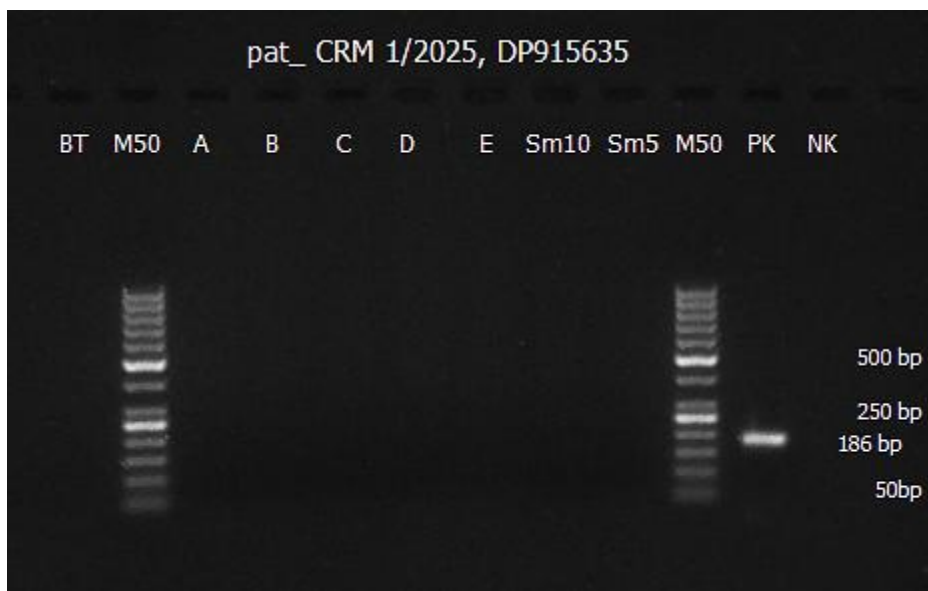
Vnitřní gen kukuřice (225 bp) pro CRM 2/2025, izoláty A-E, směsný izolát (Sm) a směsný izolát z 2. eluce (Sm2.El) pro koncentrace 10 ng/ μ l a 5 10 ng/ μ l.

BT – beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace.

13. 1. 2026.

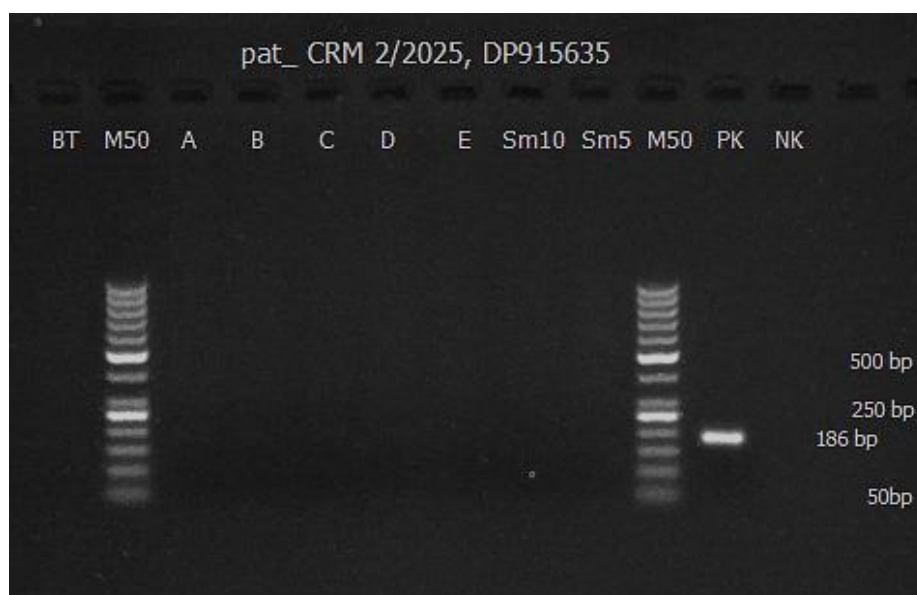
6.3 Screeningové elementy

U CRM 1/2025 a 2/2025 DP915635 byla ověřena detekce screeningového elementu pat. Výsledky zkoušek byly opakovaně negativní u CRM 1/2025 i 2/2025. Obrázky č. 8 až 10. U CRM 14/2016 byla ověřena nepřítomnost screeningového elementu pat ve směsném izolátu. Výsledky zkoušek byly negativní. Obrázky č. 8, 9.



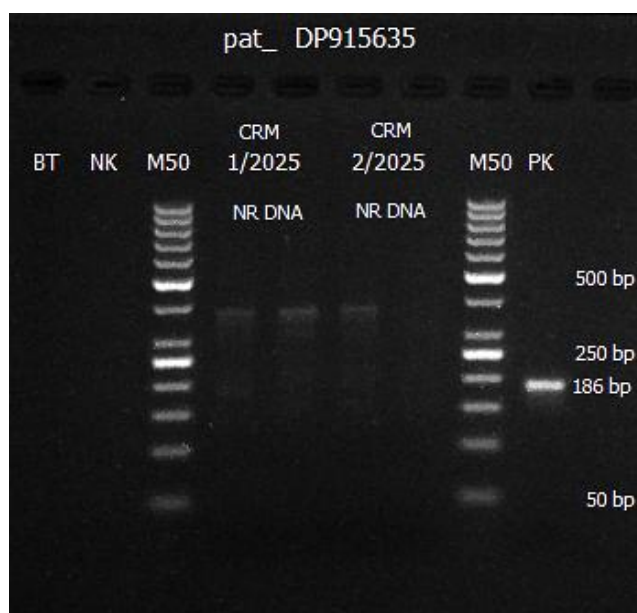
Obrázek č. 8.

pat (186 bp) - CRM 1/2025, izoláty A-E, směsný izolát Sm o koncentraci 5 a 10 ng/μl, BT – beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50bp, NK – CRM 14/2016 směsný izolát, PK – CRM 24/2012. 14. 1. 2026.



Obrázek č. 9.

pat (186 bp) - CRM 2/2025, izoláty A-E, směsný izolát Sm o koncentraci 5 a 10 ng/μl, BT – beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50bp, NK – CRM 14/2016 směsný izolát, PK – CRM 24/2012. 14. 1. 2026.

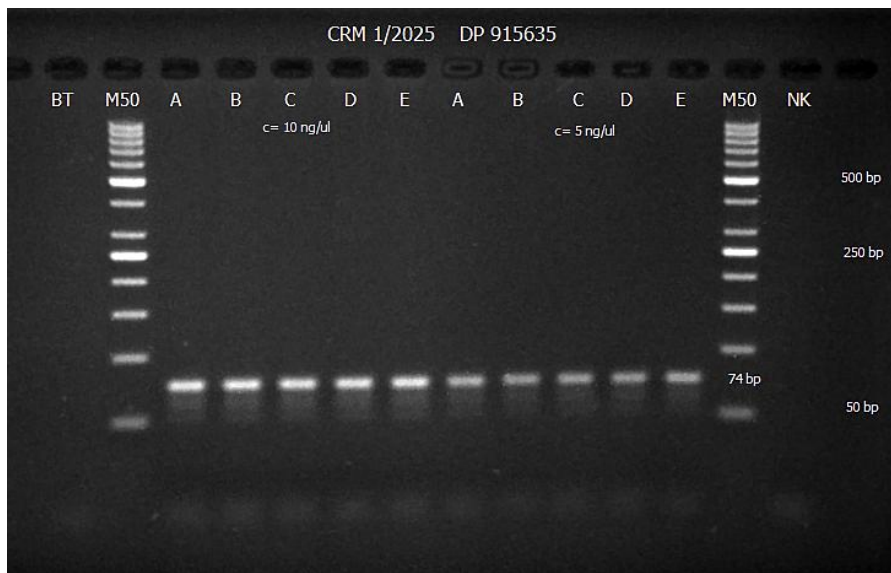


Obrázek č. 10.

pat (186 bp) - CRM 2/2025, směsný izolát Sm neředěné DNA, BT – beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50bp, NK – CRM 14/2016 směsný izolát, PK – CRM 24/2012. 19. 1. 2026.

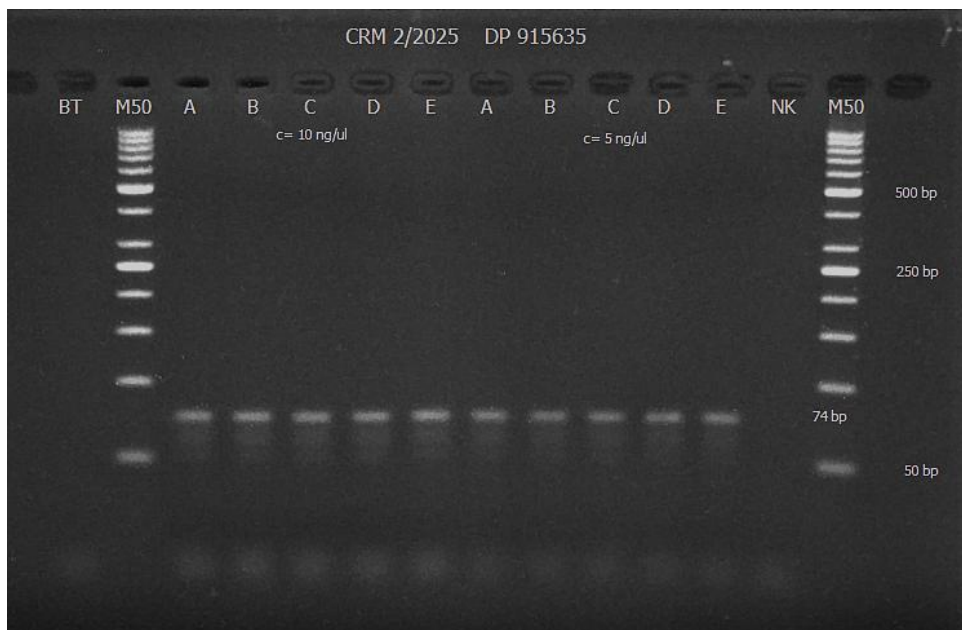
6.4 Správnost stanovení

Bylo provedeno stanovení DP915635 z izolátů (A-E) CRM 1/2025 a 2/2025. PCR byla provedena s koncentrací 5 ng/μl a s koncentrací DNA 10 ng/μl DNA v izolátu. Výsledky zkoušek byly pozitivní. (obrázek č. 11 a 12).



Obrázek č. 11. Stanovení DP915635 (74 bp); 14. 1. 2026.

BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM14/2016 směsný izolát, M50-marker 50 bp, CRM 1/2025: PK, Izoláty A, B, C, D, E v koncentracích 10 ng DNA/ul a 5 ng DNA/ul.



Obrázek č. 12. Stanovení DP915635 (74 bp); 14. 1. 2026.

BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM14/2016 směsný izolát, M50-marker 50 bp, CRM 2/2025: PK, Izoláty A, B, C, D, E v koncentracích 10 ng DNA/ul a 5 ng DNA/ul.

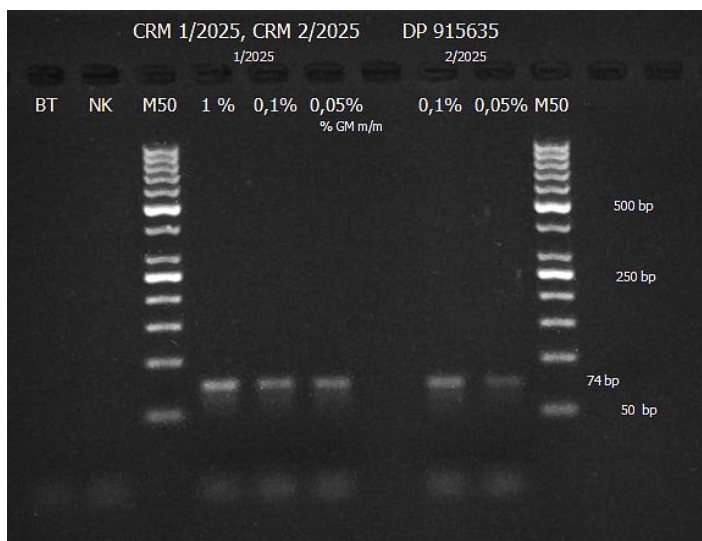
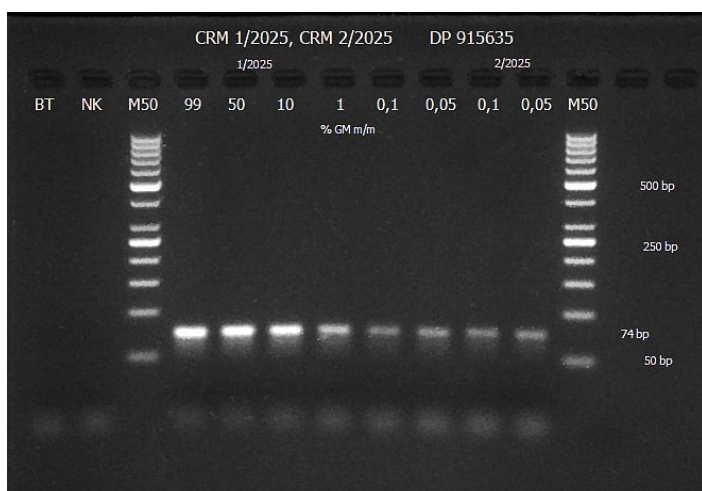
6.5 Mez detekce stanovení (MD)

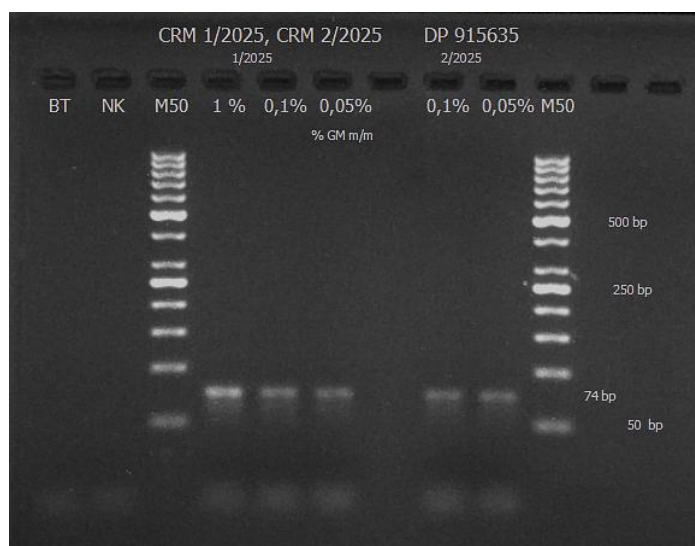
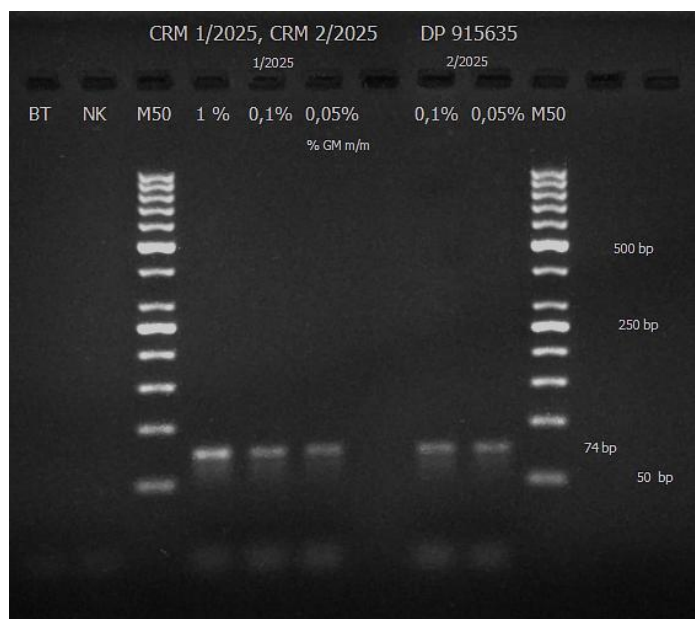
Cílem verifikace bylo stanovení meze detekce na hladině $\leq 0,1$ % GM m/m.

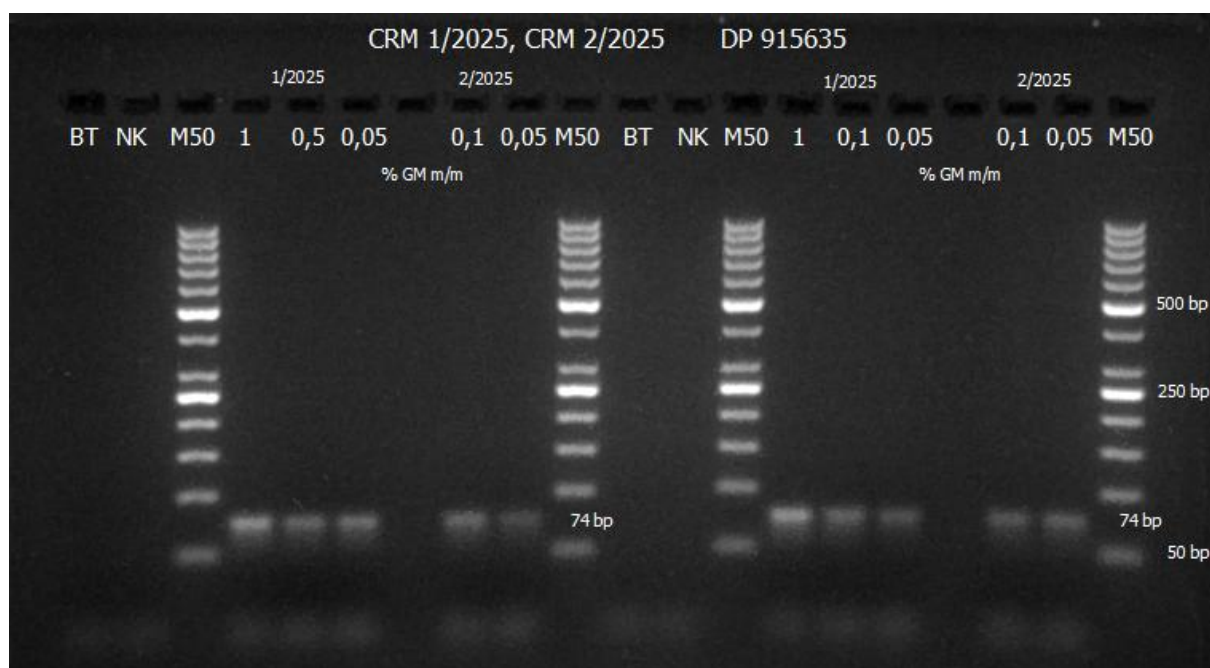
Byla provedena amplifikace izolátu CRM 1/2025 a 2/2025 o koncentraci DNA 10 ng/ μ l a obsahu modifikace (99-0,05) % m/m GM.

K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních. (Obrázky č. 13 až 17)

Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace DP915635 lze detekovat na hladině 0,05 % GM m/m.







Obrázky č. 13 až 17. 2. - 5. 2. 2026.

Stanovení MD transgenů DP915635 (74 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK– CRM 14/2016, M50-marker 50 bp.

CRM 1/2025: 99 %, 10 %, 1 %; 0,1 %; 0,05 % GM m/m. PCR proběhla do koncentrace 0,05 % GM m/m.

CRM 2/2025: 0,1 %; 0,05 % GM m/m. PCR proběhla do koncentrace 0,05 % GM m/m.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testované certifikované referenční materiály vykazují pruhy v příslušných místech.

Detekovatelnost produktů PCR je závislá zejména na koncentraci templátové DNA, kvalitě templátové DNA (závisí na způsobu izolace, skladování apod.), kvalitě amplifikačních primerů, kvalitě gelu, použitém interkalačním barvivu a provedení elektroforézy.

7 Závěr

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci nové genetické modifikace kukuřice DP915635 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OdMB.

Metoda stanovení kukuřice DP915635 byla úspěšně zavedena s vyhovující mezí detekce 0,05 % GM.

S ohledem na negativní výsledek screeningového elementu pat, prozatím nebude tento GMO zařazen jako další parametr při zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv a osiv.

V případě výskytu této genetické modifikace v ČR, požadavku ze strany OOS, OdK nebo jiného závažného důvodu zařadí laboratoř OdMB detekci DP915635 mezi stanovované parametry.

8 Literatura

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1.
2. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2011.
3. Event-specific Method for the Quantification of maize DP915635 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, EURL-VL-07/20VP, JRC Publication JRC132849, 2023.

Testování přenosu tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) osivem

Miroslava Hejlová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdDŠOR, Šlechtitelů 773/23, 779 00 Olomouc
miroslava.hejlova@ukzuz.gov.cz

1 Úvod

Cílem práce bylo ověřit v laboratorních podmínkách možnost přenosu viru hnědé vrásčitosti plodů rajčete (tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV) z osiva papriky na vzcházející rostliny. Záměrem bylo posoudit riziko následné infekce porostu, které je dáno snadným mechanickým způsobem přenosu tohoto viru. Dalším předmětem úkolu bylo opakované testování osiv uložených v chladu/mrazu za účelem posouzení stability a detekovatelnosti viru metodou real-time PCR.

Virus hnědé vrásčitosti plodů rajčete (tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV) je zástupcem rodu *Tobamovirus* a byl poprvé popsán jako původce infekce rajčat (*Solanum lycopersicum* L.) v Izraeli v roce 2014. Ve stejném roce zde způsobil významné ztráty na výnosech rajčat (Luria et al., 2017), v roce 2015 pak v Jordánsku (Salem et al., 2016). Významné škody byly zaznamenány i na paprikách (*Capsicum annuum* L.), například v Itálii (Panno et al., 2019). V roce 2019 byl ToBRFV zařazen na varovný seznam EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation) a následně ustanoven jako regulovaný karanténní škodlivý organismus Prováděcím nařízením Komise (EU) 2020/1191. Od roku 2014 byly hlášeny výskyty ToBRFV již z více než 50 zemí světa (EPPO Global Database, 2025). Na základě zpráv z několika členských států a informací získaných z aktualizované analýzy rizik (PRA ToBRFV: EPPO, 2024) dospěla Evropská komise k závěru, že navzdory přísným eradikačním opatřením je ToBRFV v Unii natolik rozšířený, že již nesplňuje kritéria pro karanténní škodlivý organismus. S účinností od 1. 1. 2025 byl proto jeho status změněn na regulovaný nekaranténní škodlivý organismus pro EU, podle Prováděcího nařízení Komise (EU) 2024/2970, kterým se mění Prováděcí nařízení (EU) 2019/2072, pokud jde o opatření s cílem zamezit výskytu

organismu Tomato brown rugose fruit virus na rostlinách k pěstování *Solanum lycopersicum* L. a jejich hybridech a *Capsicum annuum* L., a kterým se stanoví míry četnosti úředních kontrol. Stejně jako ostatní tobamoviry je ToBRFV přenosný osivem. Virus se nachází v obalu semene, byl detekován v endospermu, avšak nikoliv v embryu (Davino et al., 2020). Procento přenosu ToBRFV osivem uváděné v literatuře je poměrně nízké: (0,08 – 2,8) % (Davino et al., 2020). A. Dombrovsky, pers.com., 2024 udává, že z 8000 rostlin získaných výsevem infikovaného osiva byly ToBRFV infikovány dvě. Přesto i jedna infikovaná rostlina v porostu představuje hrozbu, protože virus je velmi snadno mechanicky přenosný (Zhang et al., 2022), vysoce stabilní v prostředí a dlouhodobě detekovatelný například v půdě (Dombrovsky et al., 2022) a ve vodě (Mehle et al., 2023).

2 Materiál a metody

Testování přenosu ToBRFV osivem spočívalo ve výsevu semen odrůd paprik českého původu pocházejících z rostlin pozitivně testovaných na ToBRFV a následném testování vzešlých rostlin. Počet testovaných rostlin každé odrůdy byl stanoven na 500. Rostliny byly testovány ve fázi děložních a dvou pravých listů. Samotné pěstování i testování probíhalo za přísných hygienických podmínek z důvodu zamezení kontaminace pokusu a laboratoře tímto extrémně snadno mechanicky přenosným virem. Rostliny byly testovány molekulárními metodami v souladu s legislativou platnou v době pokusu (Prováděcí nařízení Komise (EU) 2020/1191, ve znění pozdějších předpisů). Molekulární metody detekují RNA viru a nerozliší, zda se jedná o virus schopný infikovat rostlinu, nebo pouze o neinfekční fragmenty RNA. Proto byl v případě pozitivní detekce ToBRFV v rostlině proveden biologický test mechanickou inokulací indikátorových rostlin.

2.1 Získání přirozeně infikovaného osiva paprik

Pro účely pokusu byla použita osiva českých odrůd paprik pocházející z jednoho místa produkce s různou úrovní infekce ToBRFV. Úroveň infekce je v tomto případě vyjádřena hodnotou Cq získanou testováním vzorků osiv metodou real-time RT-PCR podle protokolu ISF, 2020. Nižší hodnota Cq indikuje vyšší množství viru detekovaného ve vzorku osiva, zatímco vyšší hodnota Cq odpovídá nižšímu množství viru detekovaného ve vzorku. Část osiv byla získána v roce 2022 z rostlin pozitivně testovaných na ToBRFV (odrůdy č. 3, 4, 8, 9, 10), část osiv byla získána v roce 2023 z ToBRFV pozitivně testovaných vzorků osiv (odrůdy č. 1, 2, 5, 6, 7). Cq hodnoty všech vybraných odrůd osiv jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Cq hodnoty osiv (ISF, 2020.)

Odrůda	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cq hodnota	15,6	22,2	22,5	22,6	23	25,6	25,7	26,4	29,4	29,6

2.2 Pěstování rostlin paprik

Semena deseti odrůd paprik byla postupně vysévána v pěstební komoře Oddělení diagnostiky škodlivých organismů Olomouc (Obrázek 1) s řízenými teplotními a světelnými podmínkami (28 °C, 16 hodin den, 8 hodin noc). Kapacita komory je přibližně 720 rostlin, doba potřebná ke vzejití a otestování jednoho výsevu byla asi 2 až 3 měsíce. Výsevy jednotlivých odrůd probíhaly postupně, v závislosti na aktuální kapacitě laboratoře virologie. Vysévalo se vždy jedno semeno do samostatného květináče s perlitem. Na jednom tácu bylo umístěno 12 až 24 květináčů. Rostliny byly pravidelně zavlažovány živným roztokem (Agro Kristalon start). Ve fázi děložních listů a prvního páru pravých listů byly z rostlin za přísných hygienických podmínek odebrány vzorky, které se testovaly real-time RT-PCR na ToBRFV podle ISF, 2020. Po získání výsledků byl pokus ukončen, rostliny zlikvidovány autoklávováním a veškeré použité pomůcky (květináče, tácy) i celá pěstební komora dezinfikovány 1,3% roztokem chlornanu sodného, aby se zabránilo následné kontaminaci.

U osmi odrůd bylo vypěstováno a otestováno 500 rostlin podle stanoveného plánu. U odrůdy číslo 1 se vzhledem k nedostatečnému množství semen podařilo vypěstovat a otestovat pouze 253 rostlin, u odrůdy číslo 10 z důvodu slabé klíčivosti pouze 400 rostlin. Odrůdy 3 a 4 vykazovaly také velmi nízkou klíčivost, a proto musely být vysety opakovaně, aby bylo dosaženo stanoveného počtu 500 rostlin. Tento postup vedl k prodloužení celkové doby trvání úkolu.



Obrázek 1. Pěstební komora OddŠOR Olomouc – vzešlé rostliny paprik.

2.3 Testování rostlin

Po vzejití rostlin ve fázi děložních listů byly odebrány vzorky, z nichž byla izolována RNA pomocí RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) a následně byly testovány metodou real-time RT-PCR podle protokolu ISF (2020). Stejný postup se opakoval ve fázi prvního páru pravých listů.

2.3.1 Vzorkování rostlin

Vzorky z rostlin byly odbírány v jednorázových rukavicích utržením malé části listu. Po každém odběru byla rukavice vyměněna, aby se zamezilo případné kontaminaci z rostliny na rostlinu a následným testováním byly zachyceny pouze ty rostliny, jejichž infekce ToBRFV pochází z osiva. Odebrané listy byly vloženy do homogenizačních sáčků (Bioreba) a testovány ve směsných vzorcích z rostlin z jednoho až dvou táčů (podle počtu vzešlých rostlin – max počet 48). Standardně se v Laboratoři virologie testuje ToBRFV z rostlin ve směsných vzorcích odebraných maximálně z padesáti rostlin (PM 7/146(2) Tomato brown rugose fruit virus).

2.3.2 Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena kitem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Odebrané listy v množství (0,5 – 1) g byly zhomogenizovány v extrakčním pufru (Loewe) v poměru 1 : 10. Z homogenátu bylo odebráno 50 µl, který byl přidán do 450 µl RLT pufru s merkaptoethanolem a dále se postupovalo dle postupu doporučeného výrobcem (RNeasy Plant Mini Kit, Quick-Start Protocol, 2016). V posledním kroku izolace se RNA eluuje dvakrát ve 30 µl RNase Free Water (výsledný objem je 60 µl).

2.3.3 Real-time RT-PCR

Vzorky byly testovány metodou real-time RT-PCR se specifickými primery CaTa28F, CaTa28R a sondou CaTa28P (ISF, 2020). Ke každé testované sadě vzorků byla zařazena negativní izolační kontrola k ověření správnosti izolace RNA, pozitivní amplifikační kontrola k potvrzení funkčnosti reakce a negativní amplifikační kontrola (RNase Free Water z PCR kitu) k vyloučení kontaminace reakční směsi (PM 7/146(2) Tomato brown rugose fruit virus). Vzorky i kontroly byly analyzovány ve dvou technických opakováních. U všech vzorků a kontrol byla současně provedena interní real-time RT-PCR kontrola (samostatná reakce ve stejném běhu) s primery COX-F, COX-R a sondou COX-P detekující rostlinnou RNA (Weller et al., 2020).

Vzorky byly testovány v souladu s požadavky v době trvání pokusu platného Nařízení Komise (EU) 2020/1191, ve znění pozdějších předpisů, které přesně vymezuje testovací metody na ToBRFV.

2.4 Testování osiv paprik

Osiva paprik byla opakovaně testována s účelem zjistit, zda délka doby uskladnění a teplota ovlivňují stabilitu viru z pohledu detekovatelnosti metodou real-time RT-PCR. Odrůdy paprik č. 3, 4, 8, 9, 10 byly uchovávány v chladu při teplotě +4 °C, odrůdy č. 1, 5, 6, 7 byly rozděleny na dvě části: polovina osiva těchto odrůd byla uložena v chladu při +4 °C, druhá polovina v mrazu při -20 °C. Odrůda 2 nebyla za účelem zjištění virové stability testována.

2.4.1 Izolace RNA

RNA byla izolována kitem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Osivo v množství 1000 semen bylo zhomogenizováno ve 20 ml extrakčního pufru (Loewe). Z homogenátu bylo odebráno 100 µl, který byl přidán do 450 µl RLT pufru s merkaptoethanolem a dále se postupovalo podle postupu doporučeného výrobcem (RNeasy Plant Mini Kit, Quick-Start Protocol, 2016).

V posledním kroku izolace se RNA eluuje dvakrát ve 30 μ l RNase Free Water (výsledný objem je 60 μ l).

2.4.2 Real-time RT-PCR

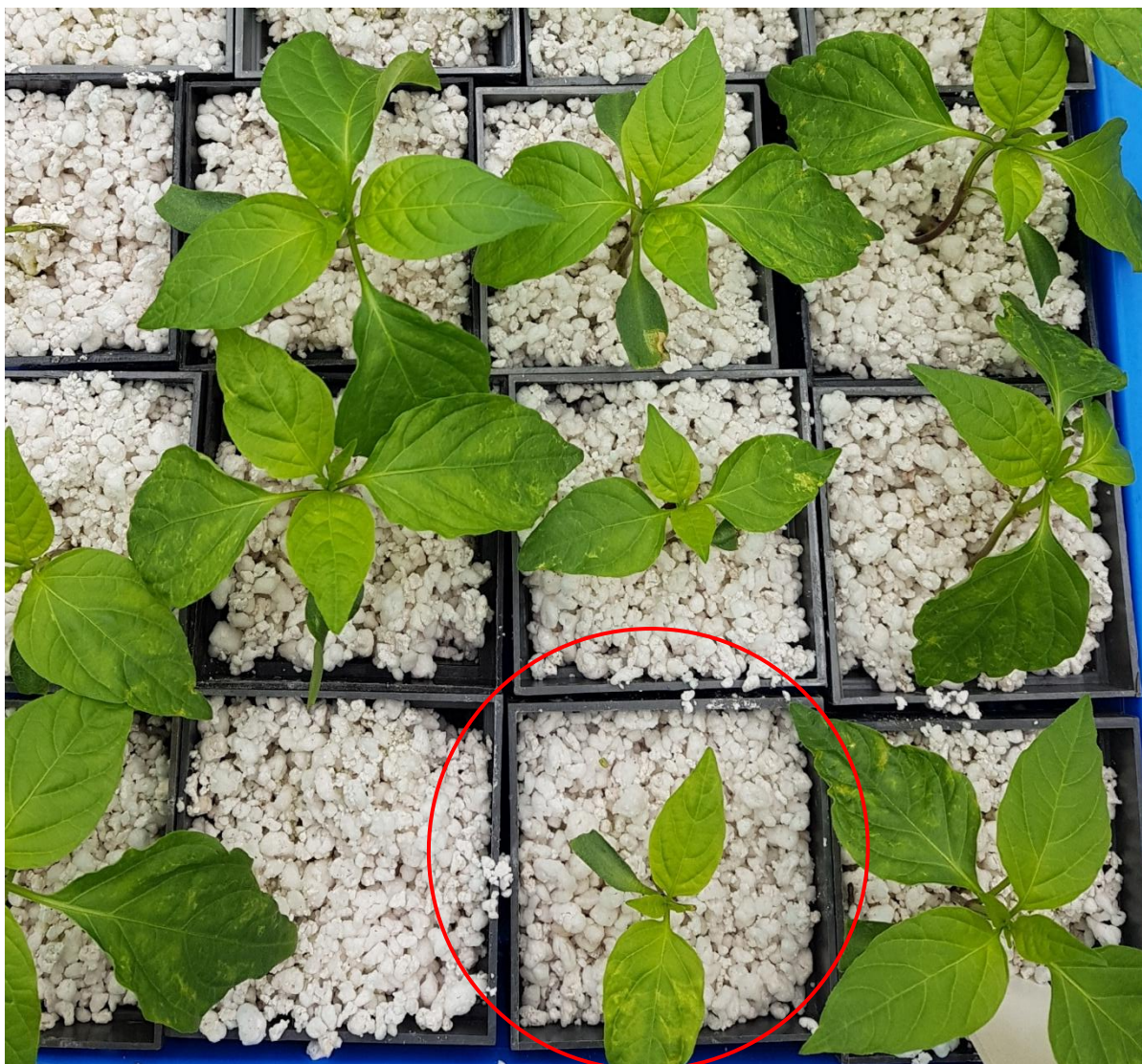
Vzorky osiv byly testovány shodnou metodou jako vzorky odebrané z listů, viz kapitola 2.3.3.

2.5 Výsledky

2.5.1 Výsledky testování ToBRFV v rostlinách

Celkem bylo v laboratorních podmínkách vypěstováno a otestováno 4653 rostlin paprik z infikovaného osiva. Při testování odrůdy č. 1, odrůdy s nevyšší mírou infekce (původní Cq 15,6), byl ToBRFV detekován ve směsném vzorku 21 rostlin pěstovaných v tácu 2. Tyto rostliny byly znovu jednotlivě vzorkovány z děložních listů a testovány. ToBRFV byl zjištěn v jediné rostlině s Cq 33 (ISF, 2020), což odpovídá limitnímu množství virové RNA detekovatelnému ve vzorku. Vzorek odebraný z prvního páru pravých listů stejné rostliny byl následně testován s negativním výsledkem (Obrázek 2).

Z pozitivně testované rostliny byl proveden biologický test mechanickou inokulací na indikátorové rostliny *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun a *Nicotiana occidentalis* PI (PM 7/153 (1) Mechanical inoculation of test plants). Inokulované rostliny nevykazovaly symptomy virové infekce. Následné laboratorní testování metodou real-time RT-PCR (ISF, 2020) potvrdilo negativní výsledek na přítomnost ToBRFV.



Obrázek 2. Rostlina papriky pozitivně testovaná na ToBRFV.

2.5.2 Výsledky testování ToBRFV v osivu paprik

Osiva odrůd 3, 4, 8, 9, a 10 byla uskladněna v chladu v období 2022 až 2024 a dvakrát přetestována. Získané výsledky prokazují jednoznačnou detekci ToBRFV ve všech testovaných odrůdách i po třech letech skladování. U odrůdy 4 došlo ke zvýšení Cq hodnoty o 4,1 cyklu, u ostatních odrůd nebyl rozdíl původní a po třech letech získané Cq hodnoty vyšší než jeden cyklus (což je zanedbatelný rozdíl vyskytující se v rámci parametru opakovatelnosti testování stejného vzorku danou metodou; Tabulka 2).

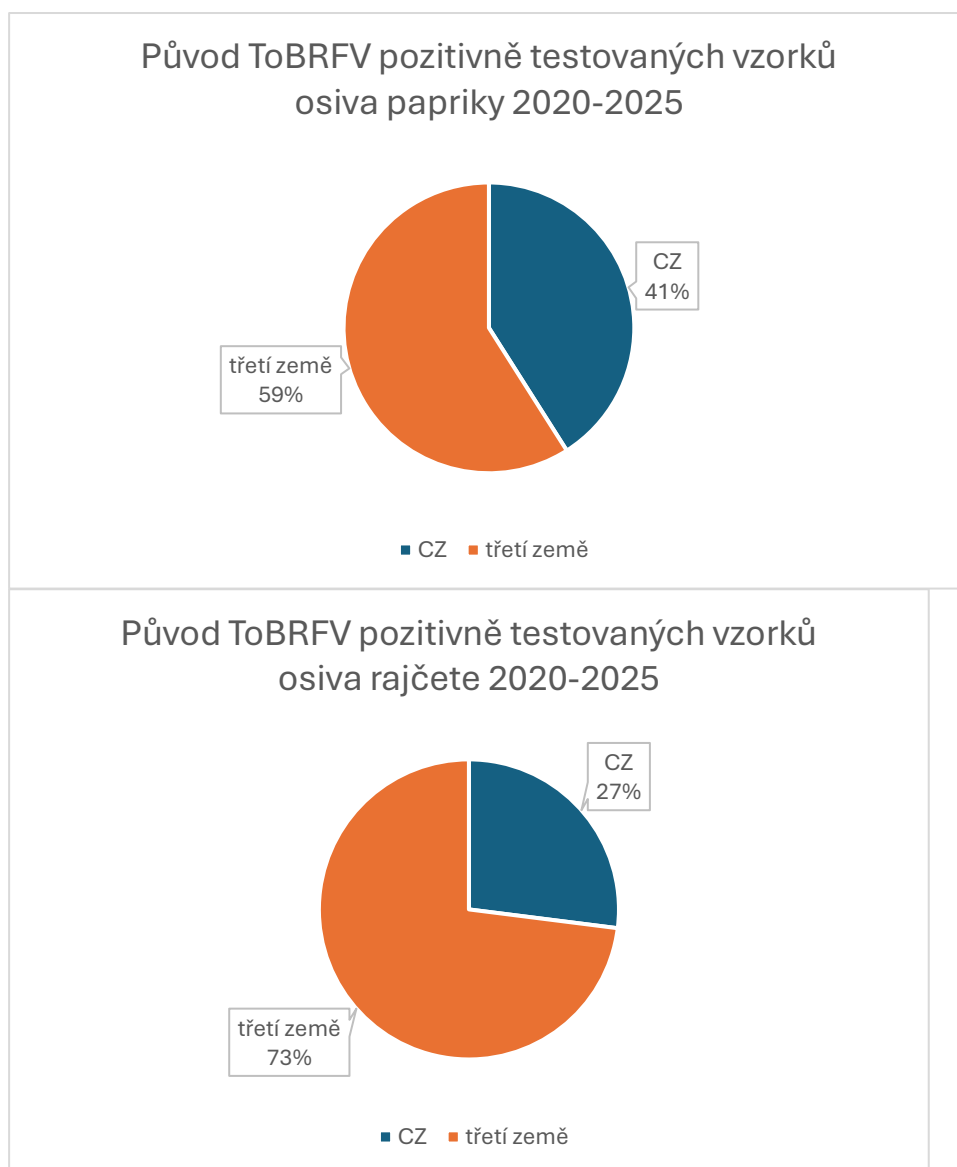
Tabulka 2. Cq vzorků osiv vybraných odrůd paprik v letech 2022 až 2024.

Odrůda	Rok Cq		
	2022	2023	2024
3	22,6	22,6	23,7
4	25,6	25,1	29,7
8	26,4	25,9	26,6
9	25,7	28,0	26,7
10	29,6	28,2	29,0

U osiv odrůd 1, 5, 6 a 7 byl sledován vliv teploty uskladnění na Cq hodnoty. Na základě získaných dat lze konstatovat, že skladování osiva v chladu ($\pm 4\text{ °C}$) ani v mrazu ($\pm 20\text{ °C}$) nemá významný vliv na stabilitu viru z hlediska jeho detekovatelnosti (Obrázek 3). Rozdíly mezi oběma variantami byly zanedbatelné: u odrůd 1, 6 a 7 byl rozdíl Cq hodnot všech testování v rozmezí 0,5 až 1,1, což, jak již bylo výše uvedeno, je běžný rozdíl vyskytující se v rámci parametru opakovatelnosti testování stejného vzorku danou metodou, u odrůdy 5 byl rozdíl mírně vyšší (Tabulka 3). Pravděpodobným vysvětlením výrazného zvýšení Cq hodnoty vzorku osiva vůči hodnotě původně testovaného vzorku u odrůdy 1 z 15,6 na 25,8 je rozdílná, výrazně vyšší, koncentrace viru v původně odebraném a testovaném vzorku, způsobená degradací virové RNA po jeho odumření, která ve vzorku přetrvává a působí jako kontaminant z pohledu detekce molekulárními metodami.

Tabulka 3. Rozdíl Cq hodnot jednotlivých odrůd uložených v chladu/mrazu.

Odrůda	2023	2024		Rozdíl	2025		Rozdíl
	Původní Cq	+ 4 °C	-20 °C		+ 4 °C	-20 °C	
1	15,6	25,8	25,1	0,7	26,5	25,7	0,8
5	22,2	25,0	27,3	2,3	26,4	27,7	1,3
6	23	25,4	26,5	1,1	26,8	27,6	0,8
7	21,1	26,6	26,1	0,5	27,1	26,6	0,5



Obrázek 3. Původ pozitivně testovaných vzorků osiv v letech 2020 až 2025 v laboratoři virologie ODŠOR.

3 Diskuze a závěr

V laboratoři virologie je ToBRFV testován od roku 2019. První pozitivní vzorek byl detekován v roce 2020 ve vzorku osiva papriky testovaném v rámci dovozní rostlinolékařské kontroly. V období 2020*–¹2025 bylo přijato k diagnostice ToBRFV celkem 5038 vzorků, z toho 3313 vzorků osiv druhů *Capsicum annuum* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum pubescens* Ruiz. & Pav., *Solanum aethiopicum* L.,

¹ * Analýza zahrnuje vzorky testované na ToBRFV v letech 2020-2025, kdy se k testování používaly výhradně molekulární metody.

Solanum lycopersicum L., *Solanum melongena* L., *Solanum pimpinellifolium* L. Z tohoto množství představovalo 1803 vzorků osiva paprik, 1510 vzorků osiva rajčat. ToBRFV byl detekován celkem ve 169 vzorcích osiv, 95krát v osivu papriky, 74krát v osivu rajčete. Většina pozitivních záchytů ToBRFV v laboratoři virologie ve vzorcích osiv rajčat a paprik pocházela z dovozu ze třetích zemí (Obrázek 3). Analýzy vzorků provedené v laboratoři virologie ODŠOR za posledních pět let spolu s výsledky vývojového úkolu potvrzují údaje uváděné v literatuře, že přenos ToBRFV z osiva na vzcházející rostliny, v našem případě papriky, se vyskytuje jen ve velmi nízkém procentu případů. Přesto i toto nízké procento má zásadní význam pro epidemiologii patogenu, neboť se během poslední dekády rozšířil z původního ohniska v Izraeli do více než padesáti zemí světa (EPPO Global Database, 2025). Tento fakt podtrhuje význam mezinárodního obchodu osiv při šíření ToBRFV.

Je známo, že papriky mohou být nositeli genů rezistence k tobamovirům L3 a L4 (ToBRFV je zástupcem rodu *Tobamovirus*). Rostliny paprik, ze kterých pocházelo testované osivo, nevykazovaly příznaky virové infekce a dobře prosperovaly, což naznačuje přítomnost uvedených genů rezistence. Od roku 2019 byl v EPPO Reporting Service nahlášen pouze jeden významný výskyt ToBRFV na paprikách s výrazným ekonomickým dopadem – v roce 2020 na Sicílii (Panno et al., 2019). V tomto případě byly mozaiky a deformace plodů pozorovány na 85 % pěstovaných rostlin *Capsicum annuum*. Pěstovaná odrůda však nebyla nositelem genů rezistence a byla pěstována v lokalitě, kde byl v předchozím roce ToBRFV detekován v porostu rajčat. V současné době by měly být v zemích EU dostupné seznamy odrůd paprik nesoucích geny rezistence k tobamovirům, avšak tyto informace nejsou k dispozici pro všechny odrůdy (například české odrůdy paprik). Navíc, jak uvádí Eldan et al. (2022), rezistence může být za určitých podmínek překonána, například při teplotách nad 30 °C.

Do 1. ledna 2025 byla diagnostika ToBRFV ve vzorcích osiva legislativně omezena výhradně na molekulární metody detekce. Tyto metody jsou vysoce citlivé, avšak interpretace výsledků těchto metod může být problematická. Údaje z Nizozemska, Slovinska, Belgie, Spojeného království Velké Británie a Severního Irska uveřejněné ve studii Giesbers a kol., 2024 zaměřené na testování rostlin, skleníků a jejich okolí poukazují na možnost vlivu environmentální kontaminace způsobené přítomností reziduí genetického materiálu ToBRFV v prostředí na celkový výsledek rozboru vzorku. Pozitivní nález získaný testováním vzorku molekulárními metodami pak může odrážet pouze přítomnost neinfekčních fragmentů RNA viru, nikoli skutečnou infekci rostliny (Giesbers et al., 2024). U osiv mohou být pozitivní nálezy s vysokými Cq hodnotami vnímány podobně.

Na základě výše uvedeného testování, dostupných publikovaných údajů a reklasifikace ToBRFV na regulovaný nekaranténní škodlivý organismus Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) upravuje od 16. února 2026 procesní postup testování osiv rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) a papriky (*Capsicum annuum* L.) původem z Česka a ze třetích zemí na přítomnost viru hnědé vrásčitosti plodů rajčete ToBRFV pro účely dovozu a vnitřního trhu. Oba viry se v souladu s platnou regulací v EU nesmějí v osivu a sadbě rajčete a papriky vyskytovat. ÚKZÚZ ověřuje tuto skutečnost laboratorním testováním s využitím molekulárních metod. Nově bude možno doplnit molekulární diagnostiku biologickým testem (ISHI-Veg, 2019a, b), který v případě hraničních hodnot pozitivního molekulárního testu umožní jednoznačně prokázat přítomnost infekčního a biologicky aktivního viru. Pro vývoz osiv do třetích zemí bude vždy rozhodujícím kritériem pouze výsledek molekulárního testu bez ohledu na dosažené Cq hodnoty real-time RT-PCR na detekci viru, biologický test se neprovádí.

4 Literatura

1. Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Barone, S., & Panno, S. (2020) Tomato Brown Rugose Fruit Virus: Seed Transmission Rate and Efficacy of Different Seed Disinfection Treatments. *Plants*, 9 (11), 1615. <https://doi.org/10.3390/plants9111615>
2. Dombrovsky, A., Mor, N., Gantz, S., Lachman, O., & Smith, E. (2022) Disinfection Efficacy of Tobamovirus-Contaminated Soil in Greenhouse-Grown Crops. *Horticulturae*, 8(7), 563. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070563>
3. Eldan, O., Ofir, A., Luria, N., Klap, C., Lachman, O., Bakelman, E., Belausov, E., Smith, E., & Dombrovsky, A. (2022) Pepper Plants Harboring L Resistance Alleles Showed Tolerance toward Manifestations of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Disease. *Plants*, 11(18), 2378. <https://doi.org/10.3390/plants11182378>
4. EPPO (2022) PM 7/146 (2) Tomato brown rugose fruit virus. *EPPO Bulletin*, 52, 665–692. <https://doi.org/10.1111/epp.12891>
5. EPPO (2022) PM 7/153 (1) Mechanical inoculation of test plants. *EPPO Bulletin*, 52, 693–703. <https://doi.org/10.1111/epp.12901>
6. EPPO (2024) EPPO Technical Document No. 1092. Updated version of the pest risk analysis for Tobamovirus fructirugosum (tomato brown rugose fruit virus). EPPO, Paris. <https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/documents>
7. EPPO Global Database (2025) Tomato brown rugose fruit virus. EPPO, Paris. <https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/distribution>
8. Giesbers, A.K.J., Vogel, E., Skelton, A., Zisi, Z., Wildhagen, M., Loh, Y.L. et al. (2024) Detection of tomato brown rugose fruit virus in environmental residues: The importance of contextualizing test results. *Plant Pathology*, 73, 2071–2083. <https://doi.org/10.1111/ppa.13968>
9. <https://doi.org/10.1111/ppa.13968>
10. ISHI-Veg (2019a) Detection of Infectious Tobamoviruses in Pepper Seeds
11. ISHI-Veg (2019b) Detection of Infectious Tobamoviruses in Tomato Seeds

12. ISHI-Veg (2020) Detection of Infectious Tomato brown rugose fruit virus in Tomato and Pepper Seed
13. Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I, Elad N, Tam Y, Sela N, Abu-ras A, Ezra N, Haberman A, Yitzhak L, Lachman O & Dombrovsky A (2017) A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-2 2 Resistance Genes. *PLoS ONE*, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>
14. Mehle N, Bačnik K, Bajde I, Brodarič J, Fox A, Gutiérrez-Aguirre I, Kitek M, Kutnjak D, Loh YL, Maksimović Carvalho Ferreira O, Ravnikar M, Vogel E, Vos C, Vučurović A. (2023) Tomato brown rugose fruit virus in aqueous environments - survival and significance of water-mediated transmission. *Front Plant Sci*, 2;14:1187920. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1187920>
15. Panno S, Caruso AG & Davino S (2019) First Report of tomato brown rugose fruit virus on tomato crops in Italy. *Plant Disease* 103(6), 1443. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN>
16. Prováděcí nařízení Komise (EU) 2024/2970, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) 2019/2072, pokud jde o opatření s cílem zamezit výskytu organismu Tomato brown rugose fruit virus na rostlinách k pěstování *Solanum lycopersicum* L. a jejich hybridech a *Capsicum annuum* L., a kterým se stanoví míry četnosti úředních kontrol. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2024/2970/oj
17. RNeasy Plant Mini Kit, Quick-Start Protocol, 2016)
18. Salem N, Mansour A, Ciuffo M, Falk BW & Turina M (2016) A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology* 161(2), 503–506. <http://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
19. Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N, Stead (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Appl Environ Microbiol* 66. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2853-2858.2000>
20. Zhang, S., Griffiths, J.S., Marchand, G., Bernards, M.A. & Wang, A. (2022) Tomato brown rugose fruit virus: An emerging and rapidly spreading plant RNA virus that threatens tomato production worldwide. *Molecular Plant Pathology*, 23, 1262–1277. <https://doi.org/10.1111/mpp.13229>

Bulletin Národní referenční laboratoře XXX, 2026/2

Ročník: XXX, č. 2

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2026

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 40

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196