



Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v B r n ě ,
odbor krmiv Praha
Za opravnou 4, 150 06 Praha 5 - Motol

Zpráva

o výsledcích mimořádné cílené kontroly vybraných druhů krmných surovin se zaměřením na monitorování, zda tyto krmné suroviny pocházejí z geneticky modifikovaných organismů.

Předkládá: Ing. Jiří Zedník, CSc.
ředitel odboru krmiv

Zpracoval: Ing. Svoboda Josef

V Praze, červen 2003

I. Úvod

V posledních desetiletích byla zejména v USA připravena metodami genetického inženýrství řada geneticky modifikovaných organismů. Významné jsou geneticky modifikované plodiny např. sója, řepka, kukuřice, brambory, rajčata, čekanka, papaja, tykev.

Na základě potřeby získání informací o monitoringu geneticky modifikovaných organismů a jejich produktů v oblasti krmiv byla vyhlášena Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (dále jen ÚKZÚZ), odborem krmiv, mimořádná cílená kontrola vybraných druhů krmných surovin, které jsou používány převážně při výrobě krmných směsí. V omezené míře byly provedeny analýzy ze založených vzorků osiv (4 vzorky). Monitoring byl prováděn podle metodiky vypracované odborem krmiv.

Odběry vzorků sóji luštěnaté, sójového extrahovaného šrotu, zrna kukuřice, semena řepky olejné zajišťovali pracovníci regionálních oddělení krmiv ÚKZÚZ v rámci celé České republiky, převážně u výrobců, dodavatelů a dovozců a výrobců krmných surovin. Část vzorků byla odebrána přímo při nákupu. Jednalo se o semeno řepky olejné a kukuřice přímo ze sklizně. Vzorky osiv byly získány ze založených vzorků odboru osiv ÚKZÚZ. Vzorkování bylo prováděno v souladu s postupy na vzorkování krmiva stanovenými ve vyhlášce č. 124/2000 Sb. Metodika vzorkování geneticky modifikovaných organismů a produktů není v současné době v EU legislativně stanovena, její uzákonění se očekává do konce roku 2004.

II. Výklad základních pojmů

Genetická modifikace:	cílená změna dědičného materiálu organismu způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací, a to vnesením cizorodého dědičného materiálu do dědičného materiálu organismu nebo vynětím části dědičného organismu (Zákon č. 153/2000 Sb.),
GMO:	organismus, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací,
Dědičný materiál:	deoxyribonukleová nebo ribonukleová kyselina,
Příjemce:	organismus, do jehož dědičného materiálu se vnáší cizorodý dědičný materiál,
Insert:	cizorodý dědičný materiál, vložený do dědičného materiálu příjemce,
Konstrukt:	uměle upravená molekula nukleové kyseliny,
Signální gen:	gen obsažený v konstruktě a určující snadno zjistitelnou vlastnost buněk nebo organismu, který obsahuje funkční konstrukt,
Selekční gen:	gen obsažený v konstruktě a určující necitlivost k určité látce nebo k vlivu zabraňujícímu množení buněk, které tento gen neobsahují
Nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty:	každá činnost, jejímž předmětem jsou geneticky modifikované organismy nebo produkty od jejich vzniku genetickou modifikací až do okamžiku, kdy ztratí schopnost rozmnožování nebo přenosu dědičného materiálu.

III. Legislativa

ČR:

Zákon č. 153/2000 Sb., o nakládání s GMO a produkty a prováděcí vyhlášky 372-374/2000 Sb.

EU:

Směrnice 90/219 EEC pro uzavřené nakládání s geneticky modifikovanými organizmy.

Směrnice 90/219 EEC pro uvážlivé uvádění geneticky modifikovaných organismů do prostředí (v posledním znění).

IV. Screeningové a identifikační schéma analýz vzorků pro běžná osiva a krmné suroviny, u nichž je znám druh plodiny.

Schéma je prozatimní, je omezeno dosud zavedenými detekčními metodami.

Používaný kit: Biogenics kity firmy Biottols Madrid.

Sója

I. Izolace DNA

II. Použití izolace DNA jako templátu pro PCR

1) *Ověření amplifikovatelnosti DNA amplifikací sójového genu (Soya Master Mix)*

- a) pozitivní → DNA lze použít pro další reakce,
- b) negativní → nalézt příčinu, případně opakovat izolaci.

2) *Screening na přítomnost promotoru 35 S (35 S Master Mix)*

- a) pozitivní → provést identifikaci modifikace RoundUp-Ready,
- b) negativní → provést dodatečný screening na terminátor NOS, (zda jde o jinou modifikaci než RoundUp-Ready a pro potvrzení „čistoty“ vzorku od GMO; NOS Master Mix).

3) *Identifikace RoundUp-Ready sóji (EPSP Synthase Master Mix)*

- a) pozitivní → prokázána přítomnost genetické modifikace RoundUp-Ready, jedná se o odrůdu RoundUp-Ready nebo o její příměs v daném vzorku,
- b) negativní → provést dodatečný screening na terminátor NOS, (zda jde o jinou modifikaci než RoundUp-Ready; NOS Master Mix).

Detekční limit kitu a laboratoře je asi 0,1%. Toto bylo stanoveno pomocí IRMM standardu 0,1% č. 410 S-1, což je jemná mouka. U vzorků upravených šrotováním je možné připustit mírné kolísání limitu.

Kukuřice

MON 810 (Monsanto):	35 S	intron hsp 70	cry IA(b)		
Event - 176 (Novartis):	35 S		cry IA(b)	bar	
Liberty (AgrEvo):	35 S			pat	
Bt-11 (Novartis):	35 S	intron hsp 70	cry IA(b)	pat	NOS
RoundUp-Ready kuk.:	35 S	intron hsp 70	CPT2 CP4 EPSPS		NOS

Poznámka:

(Jedná se o neúplný výčet detekovatelných amplikonů, neobsahuje počet konstruktů a informace o pořadí v konstruktě)

I. Izolace DNA

II. Použití izolace DNA jako templátu pro PCR

1) *Ověření amplifikovatelnosti DNA amplifikací kukuřičného specifického genu* (Maize Master Mix, Biotools)

- a) pozitivní → DNA lze použít pro další reakce,
- b) negativní → nalézt příčinu, případně opakovat izolaci.

2) *Screening na přítomnost promotoru a terminátoru NOS* (STD kit Biotools)

- a) 35 S pozitivní a NOS pozitivní → jedná se o Bt-11 nebo RR kukuřici provést → identifikaci (ident. na Bt-11, je-li pozitivní, je to Bt-11; je-li negativní, je to pravděpodobně RR kuk., dokázat to lze snad pomocí EPSPS Master mixu pro RR sóju od Biotools, ale i kdyby ne, přítomnost 35 S a zároveň NOS je dost výmluvná)
- b) 35 S pozitivní a NOS negativní → jedná se o MON 810, Bt-176 nebo Liberty → provést identifikaci (identifikace na Bt-176 a MON 810 pomocí Master mixu od Biotools; nebude-li ani jedno z nich ident. Liberty pomocí vlastních primerů - sekv. v literatuře, kit Sigma-Aldrich),
- c) 35 S negativní a NOS negativní → GMO nenalezen.

Řepka

I. Izolace DNA

Na stanovení GMO u řepky dosud neexistuje komerční kit ani metoda, pouze screening (promotor 35 S, terminátor NOS).

1. *Screening na přítomnost promotoru 35 S* (35 S Master Mix) a terminátoru NOS (NOS Master Mix) (kity Biotools).

2. Detekce přítomnosti transgenů bar v duplexní PCR s vnitřní kontrolou (druhově specifický gen, zde gen pro UDP - glukóza synapát glukosyltransferázu) - metoda je vyvinuta v ÚMBR České Budějovice, Branišovská 31, upraveno pro potřeby detekce GMO ve vzorcích ÚKZÚZ. Použitý kit: REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit firmy Sigma-Aldrich v kombinaci se specifickými amplifikačními primery od firmy Generi-Biotech.

Detekce se provádí u všech vzorků (i v případě negativního výsledku screeningu) kvůli potřebě ověření amplifikovatelnosti DNA amplifikací vnitřní kontroly.

IV. Diagnostika GMO

Diagnostika geneticky modifikovaných organismů (GMO) je prováděna s využitím metod:

- **PCR** (Polymerase Chain Reaction) (kvalitativní) a **RT - PCR** (kvantitativní) pro diagnostiku specifických sekvencí DNA (např. 35 S, NOS).

Odebrané vzorky byly zasílány do laboratoře molekulárně-genetické diagnostiky ÚKZÚZ v Brně. Kvalitativními metodami, založenými na detekci geneticky modifikovaných sekvencí DNA metodou PCR byly diagnostikovány genetické modifikace vybraných druhů krmných surovin, surovin k jejich výrobě a omezeně osiv. Výsledky analýz byly předány oddělení registrace a kontroly krmiv protokolem o zkouškách. Přesnost kvalitativní analýzy metody PCR je uváděná výrobcem používaného kitu hodnotou 0,1%, u sóji až 0,05%. Hranice GMO positivity není v současné době v EU ani ČR zatím stanovena, je uvažováno o hranici nad 2%. V případě, že bude zákonem stanoven určitý limit, vznikne potřeba kvantifikace GMO, která však je finančně značně náročná.

Při přípravě vzorku pro mletí a vážení nesmí dojít ke kontaminaci dalších analyzovaných vzorků. Proto po každém úkonu se všechny použité nástroje sterilizují a dekontaminují. V sušce při 170°C, v autoklávu při 120°C nebo roztokem Sava, který rozkládá DNA dle materiálu. Nejde vlastně o mikrobiologickou sterilitu; je nutné vyloučit možnost kontaminace cizí DNA, případně enzymy degradujícími DNA (např. na pokožce - nesahat prsty). Vzorky mořených osiv byly několikrát oprány ve vodě a následně sušeny 10 až 15 minut při 50°C. Po těchto přípravách následuje izolace DNA a amplifikace tzn. „vnitřní kontroly“, tj. gen specifického pro danou rostlinu. Konkrétně se jedná u sóji o gen sójový licitin, u kukuřice o gen o škrobovou invertázu. U řepky gen pro UDP - glukózu synapát glukosyltransferázu. Tento způsob amplifikace ověřuje, že vyizolovaná DNA je amplifikovatelná metodou PCR, což slouží k vyloučení falešně negativních výsledků v následujících analýzách. Poté následuje screening na Promotor 35 S a Terminátor NOS (vyskytují se u 95% komerčních GMO). Pro účely této zprávy bylo provedeno pouze kvalitativní stanovení a GMO pozitivní byly hodnoceny jen ty vzorky, u kterých byl prokázán konkrétní transgen. Za vzorky u nichž nebyla GMO pozitivně zjištěna byly vyhodnoceny ty, které se při screeningu na promotor 35 S a terminátor NOS ukázaly jako negativní a dále ty, které byly na promotor 35 S pozitivní → a negativní na terminátor NOS a transgen bar a současně vykazovaly pozitivitu na přítomnost vira květákové mozaiky (CAMV pouze u řepky). Při odběrech vzorků nebyla výrobci ani dovozci žádná partie krmných surovin a osiv signifikována jako GMO pozitivní. Dle informace z regionálních oddělení krmiv žádný dodavatel, dovozce nebo výrobce při deklaraci údaj o GMO nebo produktu neuvádí a naopak žádný výrobce tento údaj nepožaduje.

Vzorky byly odebírány u kukuřice a řepky olejné pouze z domácí produkce a sójový extrahovaný šrot pouze z dovozu.

VI. Výsledky mimořádné cílené kontroly

V rámci mimořádné cílené kontroly zaměřené na monitoring GMO positivity vybraných druhů krmných surovin, surovin k jejich výrobě a v omezeném množství i osiv bylo odebráno a analyzováno:

- 40 vzorků sójových loupáných extrahovaných šrotů,
- 2 vzorky osiva sóji luštinaté,
- 18 vzorků kukuřice seté (merkantil),
- 2 vzorky osiva kukuřice seté,
- 20 vzorků řepky olejné.

1. Sójový extrahovaný loupáný toastovaný šrot a osivo sóji luštinaté

Sledování GMO positivity a celkový přehled uvádí tab. č. 1 a její pokračování. Z tabulky je patrné, že bylo provedeno 42 stanovení promotoru 35 S (z toho pozitivních 30) a 14 stanovení terminátoru NOS (z toho dva pozitivní). Na základě těchto stanovení bylo provedeno 36 stanovení na gen EPSP syntézu z toho bylo 30 stanovení pozitivních, tj. 71,4% z celkového počtu vzorků. Tímto byla prokázána GMO pozitivita 30 vzorků na gen EPSP syntézu (Roundup Ready). Je to nejvyšší GMO pozitivita ze všech sledovaných druhů krmných surovin v rámci mimořádné kontroly.

2. Kukuřice setá

Celkový přehled o počtu a výsledcích analyzovaných vzorků uvádí tab. č. 2 a její pokračování. Z celkového 30 vzorků kukuřice 2 vzorky osiva. Celkem bylo provedeno 30 stanovení promotoru 35 S (z toho bylo 7 pozitivních) dále 29 stanovení terminátoru NOS (pozitivita nebyla zjištěna). Jako ukazatel GMO positivity byl sledován transgen Bt-176 (odolnost proti zavíječi kukuřičnému). Na tento ukazatel bylo analyzováno 12 vzorků, z nichž byl jeden vzorek zjištěn pozitivní jeho GMO. Ostatních 6 vzorků, které byly pozitivní na promotor 35 S zůstávají jako podezřelé, jelikož existuje možnost výskytu jiné GMO modifikace, jejíž detekce při laboratorních analýzách nebyla prováděna.

3. Řepka olejná

Celkový přehled o počtu a výsledcích analyzovaných vzorků uvádí tabulka č. 3. U 20 vzorků řepky bylo provedeno po dvaceti stanoveních promotoru 35 S, terminátoru NOS, Transgen bar (tolerance k herbicidu glufosinátu = fosfinotricinu) a řepkového genu a 10 stanovení CAMV. Z výše uvedených stanovení bylo pozitivních 10 na Promotor 35 S, 20 na

řepkový gen a 8 na CAMV. Dva vzorky byly hodnoceny jako podezřelé (může se jednat o přítomnost jiného transgenu, jehož detekci neprovádíme).

VII. Souhrn

Pro účely monitorování GMO pozitivitu (viz tabulka č. 4) bylo u odebraných 92 vzorků sójového extrahovaného šrotu, sóji luštinaté, kukuřice seté a jejího osiva a řepky olejné provedeno:

92 stanovení Promotoru 35 S (37 pozitivních)

63 stanovení Terminátoru NOS (2 pozitivní)

20 stanovení řepkové gen (0 pozitivních)

10 stanovení CAMV (0 pozitivních)

36 stanovení gen pro EPSP syntézu (30 pozitivních)

12 stanovení na transgen Bt - 176 (1 pozitivní)

20 stanovení transgenu bar (0 pozitivních).

Jako GMO pozitivních bylo analýzami zjištěno 30 vzorků sojového extrahovaného šrotu, 1 vzorek kukuřice. Prováděnými analýzami vzorků řepky olejné nebyla GMO pozitivita prokázána. Kromě výše uvedených zjištění byly dále hodnoceny vzorky kukuřice (6x) a řepky (2x). Jako podezřelé z důvodu možnosti výskytu jiné modifikace, která nabyla laboratoří ÚKZÚZ sledována.

Závěr

Získané výsledky z monitoringu prokázaly u sledovaných ukazatelů GMO pozitivitu u vybraných druhů krmných surovin a surovin k jejich výrobě použitím kvalitativních metod zkoušení jednoznačně GMO pozitivitu u 30 vzorků sójového extrahovaného šrotu (dovoz) a 1 vzorku kukuřice. Dále bylo hodnoceno 8 vzorků jako podezřelé z GMO pozitivitu z důvodu možnosti výskytu jiné modifikace, než která byla laboratorně sledována. V deklaraci žádný z analyzovaných vzorků neměl uveden údaj o genetické modifikaci.

Na základě získaných informací z roku 2002 o GMO pozitivitě bude nutné i v roce 2003 pokračovat ve sledování tohoto ukazatele u vybraných druhů krmných surovin a surovin k jejich výrobě.

**Přehled
o výsledcích analýz odebraných vzorků vybraných krmných surovin - sójového
extrahovaného šrotu a sóji luštinaté (osiva) na sledované ukazatele GMO
v ČR rok 2002**

Číslo vzorku	GMO - sledovaný ukazatel			Poznámka
	Promotor 35 S	Gen pro EPSP syntézu (Roundup Ready)	Terminátor NOS	
235	+	+	-	GMO nalezen
236	+	+	-	GMO nalezen
237	+	+	-	GMO nalezen
238	+	+	-	GMO nalezen
239	+	+	-	GMO nalezen
240	+	+	-	GMO nalezen
241	+	+	-	GMO nalezen
243	+	+	-	GMO nalezen
248	+	+	-	GMO nalezen
259	+	+	-	GMO nalezen
260	+	+	-	GMO nalezen
273	+	+	-	GMO nalezen
282	0	+	0	GMO nalezen
292	0	-	0	-
293	0	-	0	-
383	0	-	0	-
384	0	-	0	-
385	0	-	0	-
386	0	-	0	-
428	slabě +	0	0	-
429	0	0	0	-
430	0	0	0	-
477	+	+	+	GMO nalezen
478	+	+	+	GMO nalezen
492	+	+	-	GMO nalezen
508	+	+	-	GMO nalezen
509	+	+	-	GMO nalezen
510	0	0	-	-
511	+	+	-	GMO nalezen
512	+	+	-	GMO nalezen

Číslo vzorku	GMO - sledovaný ukazatel			Poznámka
	Promotor 35 S	Gen pro EPSP syntézu (Roundup Ready)	Terminátor NOS	
799	+	+	-	GMO nalezen
800	+	+	-	GMO nalezen
801	+	+	-	GMO nalezen
802	+	+	-	GMO nalezen
803	+	+	-	GMO nalezen
832	+	+	-	GMO nalezen
840	slabě +	slabě +	-	GMO nalezen
847	+	+	-	GMO nalezen
876	+	+	-	GMO nalezen
1009	+	+	-	GMO nalezen
Osivo	0	0	-	-
Osivo	0	0	-	-
Počet vzorků celkem	Počet stanovení celkem			
	Promotor 35 S	Gen pro EPSP syntézu (Roundup Ready)	Terminátor NOS	Počet nalezených GMO
42	42	36	14	30
z toho pozitivních	30	30	2	

Poznámka: 0 - negativní

+ - pozitivní

- - analýza neprovedena

**Přehled
o výsledcích analýz vybraných krmných surovin - kukuřice seté a kukuřice (osivo)
na sledované ukazatele GMO v ČR za rok 2002**

Číslo vzorku kukuřice	GMO - sledovaný ukazatel			Poznámka
	Promotor 35 S	Terminátor NOS	Transgen Bt-176 (odolnost proti zavíječi kukuřičnému)	
590/2	0	0	0	-
619/2	0	0	0	-
611/02	0	0	-	-
651/02	0	0	-	-
652/02	0	0	-	-
680/02	0	0	-	-
656/02	+	0	0	Podezřelý vzorek (možnost výskytu jiné modifikace, jejíž detekci zatím neprovádíme)
1273	0	0	-	-
1280	0	0	-	-
1281	0	0	-	-
1335	0	0	-	-
1283	0	0	0	-
1336	0	0	0	-
1282	+	0	0	Podezřelý vzorek (možnost výskytu jiné modifikace, jejíž detekci zatím neprovádíme)
1330	0	-	0	-
1570	0	0	-	-
1680	0	0	-	-
1695	+	0	0	Podezřelý vzorek (možnost výskytu jiné modifikace jejíž detekci zatím neprovádíme)
Osiva Djerba	0	0	-	Před analýzou osivo opláchnuto od mořícího přípravku
Osivo Flavius	0	0	-	Před analýzou osivo opláchnuto od mořícího přípravku
1856	0	0	-	-
1872	0	0	-	-
1892	0	0	-	-
1918	0	0	-	-

Číslo vzorku kukuřice nebo osiva	GMO - sledovaný ukazatel			Poznámka
	Promotor 35 S	NOS terminátor (reeming)	Transgen B t 176 (odolnost proti zavíječi kukuřičném)	
1922	0	0	-	-
1815	+	0	+	GMO nalezen
1883	+	0	0	Podezřelý vzorek (možnost výskytu jiné modifikace, jejíž detekci zatím neprovádíme)
1967	+	0	0	Podezřelý vzorek (možnost výskytu jiné modifikace, jejíž detekci zatím neprovádíme)
1987	+	0	0	Podezřelý vzorek (možnost výskytu jiné modifikace, jejíž detekci zatím neprovádíme)
1708 Počet vzorků celkem	0	0	-	-
	Počet stanovení celkem			Počet nalezených GMO
	Promotor 35 S	Terminátor NOS	Transgen Bt-176 (odolnost proti zavíječi kukuřičnému)	
30	30	29	12	1
z toho pozitivních	7	0	1	+ 6 podezřelých vzorků

Poznámka: 0 - negativní

+ - pozitivní

- - analýza nebyla provedena

**Přehled
o výsledcích analýz odebraných vzorků semene řepky olejné na sledované ukazatele
GMO**

Číslo vzorku	GMO - sledovaný ukazatel					Poznámka Počet nalezených GMO
	Promotor 35 S	Terminátor NOS	Transgen bar	Řepkov ý gen	CAM V	
833	0	0	0	+	-	-
834	0	0	0	+	-	-
835	+	0	0	+	0	Podezřelý vzorek (možnost výskytu jiné modifikace, jejíž detekci zatím neprovádíme)
836	+	0	0	+	+	-
837	+	0	0	+	+	-
838	+	0	0	+	+	-
839	+	0	0	+	+	-
4	+	0	0	+	+	-
5	0	0	0	+	-	-
6	+	0	0	+	0	Podezřelý vzorek (možnost výskytu jiné modifikace, jejíž detekci zatím neprovádíme)
7	+	0	0	+	+	-
8	+	0	0	+	+	-
9	+	0	0	+	+	-
10	0	0	0	+	-	-
11	0	0	0	+	-	-
12	0	0	0	+	-	-
13	0	0	0	+	-	-
14	0	0	0	+	-	-
15	0	0	0	+	-	-
16	0	0	0	+	-	-

Poznámka: 0 - negativní
+ - pozitivní
- - analýza neprovedena

**Přehled
o výsledcích analýz odebraných vzorků semene řepky olejné na sledované ukazatele
GMO**

Počet vzorků celkem	Počet stanovení celkem					Poznámka
	Promotor 35 S	Terminátor NOS	Transgen bar	Řepkový gen	CAMV	Počet nalezených GMO
20	20	20	20	20	10	0
z toho pozitivní	10	0	0	20	8	2 podezřelé vzorky

Sumář výsledků odebraných a analyzovaných vzorků vybraných druhů krmných surovin na monitoring GMO - období rok 2002 ČR

Druh krmé suroviny	Počet analyzovaných vzorků	Počet provedených stanovení celkem							Počet nalezených GMO
		Promotor 35 S	Terminátor NOS	Řepkový gen	CAMV	Gen pro EPSP syntázu	Transgen Bt-176	Transgen bar	
Sójový extrahovaný šrot	40	40	12	-	-	34	-	-	30
Soja luštinatá	2	2	2	-	-	2	-	-	-
Kukuřice setá (merkantil)	28	28	29	-	-	-	12	-	1 + 6 podezřelých vzorků
Kukuřice setá (osivo)	2	2	0	-	-	-	0	-	0
Řepka olejná	20	20	20	20	10	-	-	20	0 + 2 podezřelé vzorky
Celkem	92	92	63	20	10	36	12	20	31 + 8 podezřelých vzorků
z toho pozitivních	-	37	2	0	0	30	1	0	