

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### VYUŽITÍ SPEKTROSKOPIE V BLÍZKÉ INFRAČERVENÉ OBLASTI VE ŠLECHTĚNÍ ŘEPKY OLEJKY

LENKA ENDLOVÁ<sup>a,b,c</sup>, VIKTOR VRBOVSKÝ<sup>a,c</sup>, ZUZANA NAVRÁTILOVÁ<sup>b</sup> a LADISLAV TENKL<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Oseva vývoj a výzkum s.r.o., Hamerská 698, 756 54 Rožnov-Zubří, <sup>b</sup> Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, Katedra chemie, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, <sup>c</sup> Oseva pro s.r.o., Purkyňova 10, 747 43 Opava, <sup>d</sup> Nicolet CZ s.r.o., Křelovická 970, 104 00 Praha 10  
endlova@oseva.cz

Došlo 24.8.16, přepracováno 24.2.17, přijato 1.3.17.

Klíčová slova: olejniny, řepka olejka, kvalita, FT-NIR, šlechtění

#### Úvod

Olejniny reprezentují z botanického hlediska rozsáhlé množství druhů patřících do různých rodů a čeledí. Jejich společným znakem jsou semena obsahující významné množství tuků a olejů. Celosvětově, vlivem změny stravovacích návyků, vzrůstá spotřeba a používání rostlinných tuků a olejů v důsledku vhodnějších výživových vlastností v porovnání s většinou tuků živočišných. Mezi nejvýznamnější olejniny ČR patří brukev řepka olejka, slunečnice roční, hořčice bílá, mák setý a len olejný<sup>1,2</sup>.

Brukev řepka olejka (*Brassica napus* L.) je hlavní olejnou plodinou nejen v ČR, ale také v Evropské unii (EU). Celosvětově se jedná o jeden z nejvýznamnějších zdrojů rostlinného oleje. Ve sklizňovém roce 2016 zaujímala tato plodina v ČR téměř 393 tis. ha orné půdy. Z hlediska velikosti osevní plochy je tedy druhou nejpěstovanější plodinou po ozimé pšenici. Cílem intenzivní produkce řepky je v první řadě zisk rostlinného oleje, který v semenech moderních odrůd zaujímá 46–49 % sušiny. Výnos oleje je hlavním parametrem kvality této plodiny. Snaha o jeho zvyšování šlechtitelskými a pěstitelskými postupy je dána, mimo jiné, rostoucí poptávkou po produkci bionafty v EU, která se vyrábí převážně z řepkového oleje. U současných moderních odrůd vyniká olej vysokou dietetickou kvalitou. K dalším výhodám patří jeho stabilita při použití v teplé kuchyni a dobré chuťové vlastnosti. Současně pěstované odrůdy řepky mají vlivem šlechtění výrazně sníženou hladinu antinutričních složek – glukosi-

nolátů (GSL) v semeni i kyseliny erukové (KE) v oleji. Nachází proto uplatnění jak v potravinářství, tak ve výrobě krmiv. Řepkové extrahované šrotky nebo výlisky jsou do krmných směsí zařazovány jako kvalitní bílkovinová komponenta. GSL obsažené v řepkovém semeni a jejich degradační produkty jsou sice považovány za antinutriční faktory, ale na druhou stranu hrají úlohu v ochraně rostlin před škůdci nebo chorobami. Rovněž byly vyšlechtěny speciální odrůdy řepky olejky vykazující vysoké obsahy kyseliny erukové v oleji. Olej těchto odrůd nachází uplatnění v průmyslu maziv<sup>1,3–7</sup>.

Stejně jako u řady jiných plodin je u řepky hlavním faktorem rozhodujícím o kvalitě výsledného produktu odrůda. Šlechtění je dlouhodobý a komplexní proces tvorby nových odrůd, které musí mít přínosné vlastnosti jak z pohledu pěstitele (výnos a agrobiologické vlastnosti), tak následného zpracovatele (kvalita suroviny)<sup>8</sup>. Za posledních 40 let prošla řepka olejka vzhledem k šlechtitelskému pokroku výraznou kvalitativní změnou. Došlo ke značnému posunu ve snížení obsahu nežádoucích složek a zvýšení obsahu oleje. Současné šlechtitelské směry jsou zaměřeny např. na další zvyšování obsahu oleje, kyseliny olejové nebo linolenové, na snížení obsahu nasycených mastných kyselin a GSL<sup>1,7</sup>.

Sledování, případně modifikace profilu kvalitativních složek zahrnuje při šlechtění řepky olejky velmi rozsáhlé hodnocení kvality nově vytvořených genotypů. V případě šlechtění řepky olejky ve firmě Oseva pro s.r.o., o.z. Výzkumný ústav olejin Opava (VÚO) se jedná o tisíce analýz šlechtitelského materiálu ročně. Analýza tak velkého počtu genotypů pomocí referenčních metod, jako jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC), extrakce v Soxhletově extraktoru, gravimetrie aj., je velmi náročná. Tyto metody sice nabízejí vysokou přesnost a preciznost, ale naproti tomu jsou pracné, destruktivní a drahé. Z tohoto důvodu je vhodné využít screeningové metody pro rychlou analýzu složek jednotlivých genotypů. Spektroskopie v blízké infračervené oblasti s Fourierovou transformací (FT-NIR) je jednou z možností. FT-NIR spektroskopie je nedestruktivní, rychlá metoda, umožňující simultánní stanovení několika parametrů najednou a z hlediska nepoužívání chemikálií je bezpečná pro životní prostředí. FT-NIR technika má také své nevýhody. Je to metoda sekundární a pořizovací cena přístroje bývá relativně vysoká. Přednosti FT-NIR analýzy však výrazně převyšují její nevýhody a na základě výše uvedených vlastností je to optimální analytická technika pro účely efektivního sledování při šlechtění rostlin<sup>9–11</sup>.

Cílem této práce bylo vyvinout kalibrační modely pro FT-NIR analýzu rostlinného materiálu řepky olejky a otestovat potenciál této techniky pro predikci obsahu oleje, sušiny, GSL a hlavních mastných kyselin (MK) ve vzorcích semen řepky olejky během šlechtění. Vyvinutí robustních, přesných a spolehlivých modelů by umožnilo analy-

zu řepkových semen v krátkém časovém úseku ihned po sklizni. Pro následný zásev ještě v témže roce by na základě analýz proběhla selekce perspektivních šlechtitelských materiálů. Neperspektivní materiály s nevyhovující kvalitou by byly ze šlechtitelského procesu vyřazeny, což by vedlo k jeho značnému odlehčení a zefektivnění.

## Experimentální část

### Vzorky

K experimentálním účelům a pro tvorbu FT-NIR kalibračních modelů byly použity vzorky semen řepky olejky ozimé i jarní formy. Rostlinný materiál pocházel ze šlechtitelského programu VÚO a kolekce genových zdrojů (GZ) olejnin kolekce Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity. Rostlinný materiál pro tvorbu modelů byl během let 2012–2015 získán z polních maloparcelních odrůdových pokusů a pro všechny vzorky byla získána spektra v blízké infračervené oblasti. Po nasnímání vzorků spektrometrem byly následně vzorky analyzovány referenčními metodami (HPLC, GC, extrakce v Soxhletově extraktoru a gravimetrie). Celkový počet vzorků a rozsahy nalezených koncentrací jednotlivých složek jsou uvedeny v tab. I.

### FT-NIR spektroskopie

Měření vzorků pro tvorbu kalibračních modelů a validaci metody probíhalo na spektrometru FT-NIR Antaris II (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) na integrační sféře v režimu reflektance ve spektrálním rozsahu 10 000 až 4000  $\text{cm}^{-1}$  pomocí softwaru Omnic for Antaris. Vzorky celých semen byly proměřovány v rotačních kruhových

kyvetách o průměru 30 a 50 mm a výšce 15 a 25 mm, které jsou opatřeny křemenným dnem propustným pro NIR záření. Kyvety byly naplněny 5 a 20 g semen řepky. Výsledné spektrum každého vzorku bylo získáno zprůměrováním ze 128 scanů s rozlišením 2  $\text{cm}^{-1}$ . Příklady FT-NIR spekter vybraných vzorků řepky olejky jsou uvedeny na obr. 1.

### Referenční metody

Stanovení obsahu oleje bylo provedeno extrakční metodou podle normy ČSN EN ISO 659 (cit.<sup>12</sup>), která definuje vážkové stanovení obsahu oleje po extrakci petroletherem, oddestilování rozpouštědla a vysušení vyextrahovaného tuku vzorku. Obsah sušiny byl stanoven gravimetrickou metodou podle normy ČSN EN ISO 665 (cit.<sup>13</sup>) po 4 hodinách sušení při 103 °C. Pro zjištění obsahu GSL byla použita metoda HPLC/UV-VIS podle normy ČSN EN ISO 9167-1 (cit.<sup>14</sup>), která definuje stanovení GSL ve formě desulfoglukosinolatů. Zastoupení jednotlivých MK ve formě methylesterů MK bylo zjištěno metodou GC/FID podle interní metodiky VÚO. Všechny použité metody jsou validované a rutinně používané.

### Vývoj a validace FT-NIR kalibračních modelů

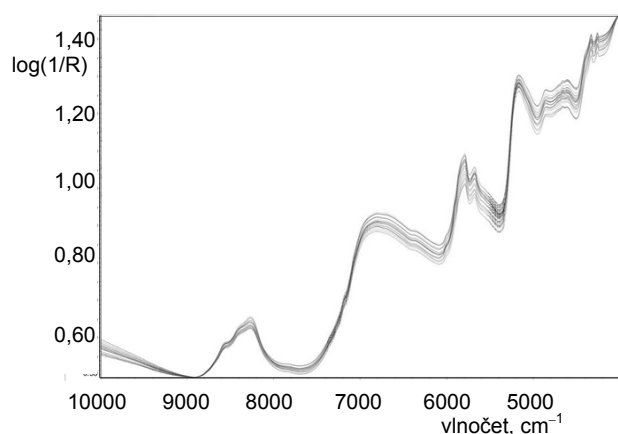
Kalibrační modely pro kvantitativní analýzu příslušných analytů byly vyvinuty pomocí chemometrického programu Thermo Scientific TQ Analyst (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Na základě získané závislosti mezi spektrální informací a složením vzorku byly vytvořeny pro každou kvantitativní analýzu zvlášť kalibrační modely pomocí algoritmu Partial Least Squares (PLS) bez derivace. Pouze u modelu pro stanovení obsahu kyseliny erukové (<11 %) byla spektra upravena 1. derivací a vyhlazením za

Tabulka I

Charakteristika souborů řepky olejky pro tvorbu kalibračních modelů

Složka	Jednotky	Metoda	$n^a$	Rozsah	Průměr
Sušina	%	Gravimetrie	917	79,82–95,85	93,00
Olej	% při 8% vlhkosti	Extrakce	727	28,03–51,38	43,55
GSL	$\mu\text{mol g}^{-1}$ při 9% vlhkosti	HPLC/UV-VIS	741	4,93–30,00	13,56
GSL (GZ)	$\mu\text{mol g}^{-1}$ při 9% vlhkosti	HPLC/UV-VIS	686	4,93–129,96	67,73
C16:0 <sup>b</sup>	%	GC/FID	323	3,40–5,60	4,55
C18:0 <sup>c</sup>	%	GC/FID	312	1,30–2,70	1,70
C18:1 <sup>d</sup>	%	GC/FID	1195	51,90–77,90	62,50
C18:2 <sup>e</sup>	%	GC/FID	1189	6,60–20,90	19,50
C18:3 <sup>f</sup>	%	GC/FID	1316	7,80–10,30	9,75
C22:1 <sup>g</sup> (< 11, %)	%	GC/FID	1051	0–11,00	0,12
C22:1 (> 11, %)	%	GC/FID	67	11,00–59,60	51,65

<sup>a</sup> Počet vzorků, <sup>b</sup> kyselina palmitová, <sup>c</sup> kyselina stearová, <sup>d</sup> kyselina olejová, <sup>e</sup> kyselina linolová, <sup>f</sup> kyselina linolenová, <sup>g</sup> kyselina eruková



Obr. 1. FT-NIR spektra vybraných 20 vzorků řepky olejky

použití Norrisova derivačního filtru. K vývoji kalibračních modelů pro jednotlivé analyty byly využity rozdílné spektrální intervaly. Pokud vzorky vykazovaly velkou odchylku mezi naměřenými a predikovanými hodnotami nebo objevila-li se spektrální odchylka ve změřeném spektru, byly ze souboru vyloučeny pomocí diagnostik Spectrum Outlier, Leverage a Principal Component Scores. Byla vyjádřena standardní chyba kalibrace (RMSEC) a korelační koeficient kalibrace (R). Pro ověření spolehlivosti, robustnosti a přesnosti kalibračních modelů byla použita úplná křížová a externí validace. Při křížové validaci se vycházelo ze stejné sady vzorků jako při kalibraci, byla

vyjádřena chyba křížové validace (RMSECV) a hodnota korelačního koeficientu křížové validace ( $R_{CV}$ ). Externí validace byly provedeny softwarově, automatickým výběrem validačních standardů z kalibračního souboru. Při výpočtu chyby predikce byly validační standardy z kalibračního souboru vyloučeny. Jejich počet byl vždy roven přibližně 10 % z celkového počtu standardů zadáných a rovnoměrně pokrývaly kalibrační intervaly. Byla vyjádřena chyba predikce (RMSEP) a hodnota korelačního koeficientu predikce ( $R_p$ ).

## Výsledky a diskuse

### Výsledky kalibrace

Pro 9 jakostních znaků řepky olejky byly vytvořeny kalibrační modely ze spekter získaných na FT-NIR spektrometru Antaris II. Přehled výsledků kalibrace vybraných jakostních znaků a charakteristiky modelů jsou uvedeny v tab. II a budou okomentovány v následujících kapitolách.

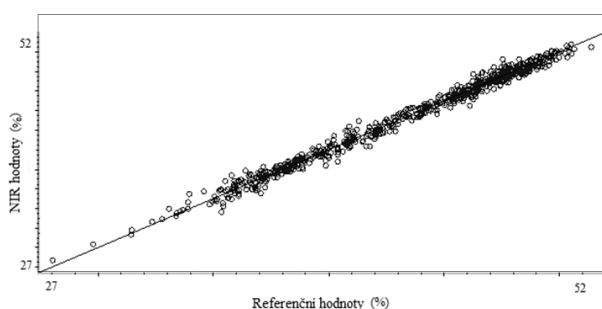
Posouzení možnosti využití FT-NIR spektrometrie k hodnocení obsahu oleje a sušiny v semeni řepky olejky

Výnos semene, obsah oleje v semeni, obsah GSL a kyseliny erukové patří mezi nejdůležitější hodnocené parametry odrůd řepky olejné. Významným ukazatelem je také plošný výnos oleje, který je odvozen od výnosu semen a jejich olejnatosti<sup>15</sup>. V mnoha zemích jsou již běžné

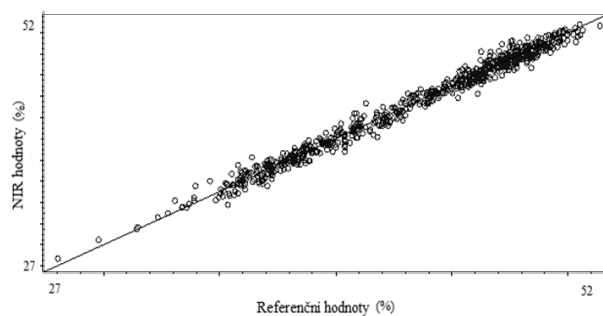
Tabulka II  
Parametry kalibračních modelů

Složka	$n^a$	$n$ ign.	Počet faktorů	Derivace	RMSEC <sup>b</sup>	$R^c$	RMSECV <sup>d</sup>	$R_{CV}^e$	RMSEP <sup>f</sup>	$R_p^g$
Sušina, %	917	20	15	bez derivace	0,29	0,99	0,37	0,99	0,39	0,99
Olej, %	727	20	15	bez derivace	0,49	0,99	0,58	0,99	0,53	0,99
GSL, $\mu\text{mol g}^{-1}$	741	40	15	bez derivace	1,14	0,96	1,30	0,94	1,16	0,96
GSL, $\mu\text{mol g}^{-1}$ , GZ <sup>h</sup>	686	29	15	bez derivace	2,65	0,99	3,32	0,99	5,08	0,99
C16:0 <sup>ch</sup> , %	323	5	7	bez derivace	0,23	0,70	0,26	0,62	0,27	0,65
C18:0 <sup>i</sup> , %	312	11	13	bez derivace	0,13	0,81	0,16	0,72	0,22	0,65
C18:1 <sup>j</sup> , %	1195	48	12	bez derivace	1,72	0,90	1,96	0,86	1,94	0,89
C18:2 <sup>k</sup> , %	1189	14	14	bez derivace	1,01	0,94	1,32	0,90	1,53	0,90
C18:3 <sup>l</sup> , %	1316	20	15	bez derivace	0,54	0,92	0,66	0,88	0,63	0,89
C22:1 <sup>m</sup> , < 11 %	1051	10	15	první	0,56	0,90	0,72	0,83	1,33	0,77
C22:1, > 11 %	67	4	11	bez derivace	1,93	0,99	2,99	0,97	2,99	0,97

<sup>a</sup> Počet vzorků, <sup>b</sup> chyba kalibrace, <sup>c</sup> korelační koeficient kalibrace, <sup>d</sup> chyba křížové validace, <sup>e</sup> korelační koeficient křížové validace, <sup>f</sup> chyba predikce, <sup>g</sup> korelační koeficient predikce, <sup>h</sup> genové zdroje, <sup>ch</sup> kyselina palmitová, <sup>i</sup> kyselina stearová, <sup>j</sup> kyselina olejová, <sup>k</sup> kyselina linolová, <sup>l</sup> kyselina linolenová, <sup>m</sup> kyselina eruková



Obr. 2. PLS kalibrační model pro stanovení obsahu oleje; RMSEC = 0,49, R = 0,99



Obr. 3. Křížová validace modelu pro stanovení obsahu oleje; RMSECV = 0,58,  $R_{CV}$  = 0,99

příplatky zpracovatelů za vyšší olejnatost<sup>16</sup>. Pro sestavení kalibračních modelů je vždy potřeba shromáždit dostatečný počet vzorků s přijatelným rozpětím hodnot. Zároveň by četnost hodnot jednotlivých složek měla být rovnoměrně rozložena, což je v případě biologického materiálu, jako jsou řepková semena, značně obtížné.

Kalibrační model pro obsah oleje (obr. 2 a 3) a sušiny byl vytvořen metodou PLS ze 727, resp. 917 spekter vzorků. Přehled vybraných optimálních spektrálních oblastí všech vyvinutých modelů je uveden v tab. III. Optimální spektrální oblasti byly vybrány na základě diagnostiky „Statistical Spectra“, která generuje sérii syntetických spekter, jež ilustrují variabilitu prezentovanou v kalibračních standardech. Na základě výsledků diagnostik (Spectrum Outlier, Leverage a Principal Component Scores) bylo při tvorbě modelů vyloučeno 20 vzorků s ohledem na nekonzistenci s ostatními daty. Kalibrační

modely vykázaly hodnotu korelačního koeficientu kalibrace 0,99, což ukazuje na silnou regresní závislost. Standardní chyba kalibrace byla pro olej 0,49, chyba křížové validace 0,58 a chyba predikce 0,53. Standardní chyba kalibrace byla pro sušinu 0,29, chyba křížové validace 0,37 a chyba predikce 0,39. Chybami RMSEC, RMSECV a RMSEP je ověřována použitelnost kalibračních modelů. Malý rozptyl hodnot všech tří chyb u obou modelů svědčí o jejich vhodnosti k praktickému použití. Hodnoty chyb predikce byly srovnatelné s referenčními metodami.

Pro výpočet kalibračních modelů bylo použito 15 faktorů (principal components, PC). Do těchto proměnných jsou během kalibrace metody algoritmem PLS kondenzovány všechny důležité spektrální informace analyzované oblasti, nebo oblastí. Každý faktor PC reprezentuje nezávislý zdroj spektrální proměnlivosti v kalibračních datech. Faktory jsou seřazeny podle množství variability,

Tabulka III

Použité spektrální intervaly pro tvorbu kalibračních modelů nejvýznamnějších složek sledovaných během šlechtění řepky olejky

Složka	Spektrální intervaly [ $\text{cm}^{-1}$ ]
Sušina, %	5384–4683; 8063–5955
Olej, %	4852–4227; 6060–5330; 7430–6860; 8765–7991
GSL, $\mu\text{mol g}^{-1}$	5975–4066; 8600–8225
GSL, $\mu\text{mol g}^{-1}$ , GZ <sup>a</sup>	7212–4086; 7943–7518; 8380–8220
C16:0 <sup>b</sup> , %	8906–4080
C18:0 <sup>c</sup> , %	5321–4700; 7154–6016
C18:1 <sup>d</sup> , %	6593–5950; 8000–7283; 8900–8536
C18:2 <sup>e</sup> , %	4613–4485; 6040–5550; 7850–7606; 8869–8600
C18:3 <sup>f</sup> , %	5540–5350; 6109–5883; 8145–7473; 8650–8520
C22:1 <sup>g</sup> , < 11 %	8550–6000
C22:1, > 11 %	5975–4066; 8600–8225

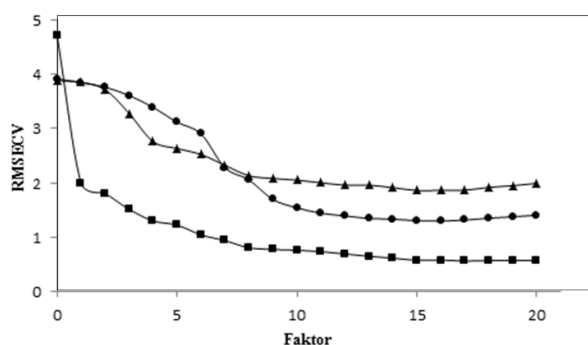
<sup>a</sup> Genové zdroje, <sup>b</sup> kyselina palmitová, <sup>c</sup> kyselina stearová, <sup>d</sup> kyselina olejová, <sup>e</sup> kyselina linolová, <sup>f</sup> kyselina linolenová, <sup>g</sup> kyselina eruková

kerou reprezentují. První faktor popisuje nejvíce z variability kalibračních spekter a většinou je nejdůležitějším parametrem kalibrace. Každý další faktor popisuje většinu ze zbývající variability. Nicméně první faktor obsahuje většinu společné informace obsažené v datech. Zbytek faktorů popisuje spíše specifitější informace, reprezentující malé změny ve spektrech, které však jsou pro analýzu často velmi důležité. Optimální počet PLS faktorů je spojen s minimální hodnotou funkce PRESS, což je diagnostika zobrazující, jak se mění hodnota sumy čtverců predikované zbytkové chyby (predicted residua error sum of squares – PRESS) s počtem faktorů použitých ke kalibraci. Pokud funkce PRESS ostře klesá k prvnímu lokálnímu minimu, lze kalibrační model považovat za dostatečně robustní. Vyšší počet použitých PLS faktorů pravděpodobně souvisí s komplikovanou maticí přírodního materiálu a měřením celých zrn řepky metodou difúzní reflexe. Z chyb získaných kalibračních modelů a tvaru funkce PRESS je možné vyvodit, že jsou dostatečně robustní k predikci oleje a sušiny, důležitých parametrů řepky pro potřeby šlechtění (obr. 4).

Posouzení možnosti využití FT-NIR metody k hodnocení skladby hlavních mastných kyselin v semeni řepky olejky

Jeden z hlavních ukazatelů kvality rostlinných olejů z hlediska lidské výživy je složení MK. Dominantní kyselinou řepkového oleje je kyselina olejová (u „klasických“ odrůd 57–68 %). Řepkový olej obsahuje v porovnání s ostatními oleji používanými v potravinářství nejméně nasycených MK a naopak významné množství polynenasycených MK včetně esenciálních omega 3 a omega 6 mastných kyselin (17–21 % kyseliny linolové a 7,8–10 % kyseliny linolenové). Kvalita oleje může být dále zvýšena redukcí obsahu polynenasycených MK a zvýšením obsahu kyseliny olejové (odrůdy typu „High Oleic“ obsahují až 80 % kyseliny olejové)<sup>17,18</sup>.

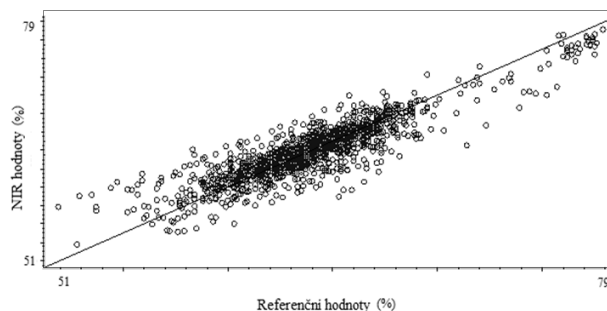
Chybami RMSEC, RMSECV a RMSEP byla ověřena použitelnost kalibračních modelů pro stanovení obsahu



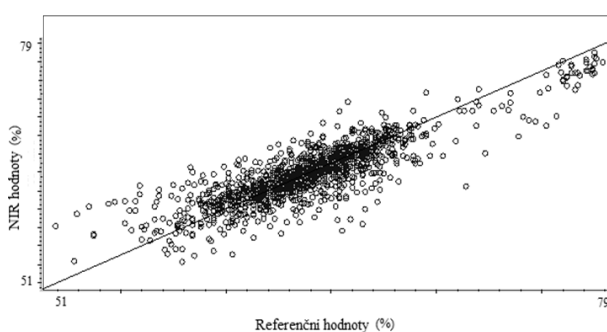
Obr. 4. PRESS diagnostika kalibračních modelů pro stanovení obsahu oleje, GSL a kyseliny olejové; ■ olej, ● GSL, ▲ kyselina olejová

kyseliny olejové, linolenové a linolové. Byl nalezen malý rozptyl hodnot všech tří chyb a je evidentní, že z praktického hlediska poskytuje NIR metoda dostatečně spolehlivé výsledky pro stanovení obsahu těchto parametrů (obr. 5, 6). Modely pro stanovení obsahu kyseliny palmitové a stearové vykazovaly sice malý rozptyl chyb, avšak nižší hodnoty korelačních koeficientů. Ty byly způsobeny užším koncentračním rozsahem těchto kalibrací (viz tab. I). Pro predikci obsahu kyseliny erukové byly vytvořeny dva kalibrační modely. První model (do 11 % KE) pro potřeby analýzy nízkoerukových vzorků řepky olejky a druhý model (11–60 % KE) pro GZ, kde jsou také zastoupeny vysokoerukové vzorky řepky olejky.

U PLS modelů vyvinutých pro kyselinu erukovou byl dosažený rozptyl chyb vyšší. Může to být způsobeno nerovnoměrným rozložením koncentračního zastoupení kalibračních standardů, menší přesností vstupních dat, horší odezvou spektrální informace na koncentrační změny KE ve vzorku apod. Zpřesnění modelů by bylo možné dosáhnout zařazením méně početně zastoupených znaků a dále průběžnou aktualizací modelů, která je nutná k zajištění dostatečné robustnosti modelů při změně matrice vzorků vlivem sklizňového ročníku. Je potřeba zohlednit průběh klimaticko-půdních podmínek dané vegetační sezóny, neboť každý ročník vykazuje v tomto ohledu odchylky od



Obr. 5. PLS kalibrační model pro stanovení obsahu kyseliny olejové; RMSEC = 1,72, R = 0,90



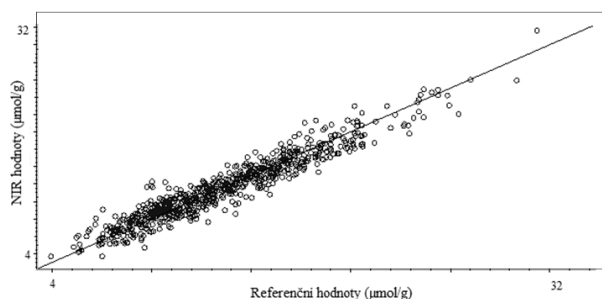
Obr. 6. Křížová validace modelu pro stanovení obsahu kyseliny olejové; RMSECV = 1,96, R<sub>CV</sub> = 0,86

ročníků jiných, což se v důsledku promítá do drobných posunů kvalitativních ukazatelů.

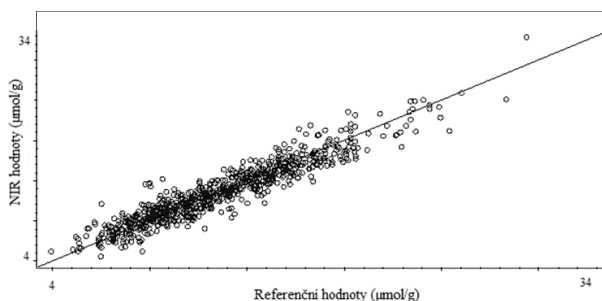
Posouzení možnosti využití metody FT-NIR k hodnocení obsahu glukosinolátů v semeni řepky olejky

GSL jsou antinutriční látky, jejichž rozkladné produkty jsou zodpovědné za štiplavý pach a hořkou chuť semen. Obsah GSL v semeni se šlechtitelé snaží snížit a neměl by překročit  $15 \mu\text{mol g}^{-1}$ , jelikož u mláďat hospodářských zvířat mohou způsobit koliku a velmi nebezpečný je jejich strumigenní účinek<sup>1,8</sup>.

Byly vytvořeny dva kalibrační modely pro predikci obsahu GSL. První model (do  $30 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) pro potřeby šlechtění řepky a druhý model pro GZ, kde mají vzorky větší variabilitu v obsahu GSL. Model pro potřeby šlechtění (obr. 7 a 8) byl vytvořen ze 741 spekter vzorků a pomocí diagnostických metod bylo vyloučeno 40 vzorků. Kalibrační model vykázal hodnotu korelačního koeficientu kalibrace 0,96 za použití 15 faktorů. RMSEC byla 1,14, RMSECV 1,30 a RMSEP 1,16. Malý rozptyl hodnot všech tří chyb tohoto modelu svědčí o vhodnosti kalibračního modelu pro potřeby šlechtění. Model pro GZ byl vytvořen ze širokého souboru vzorků (686) a pomocí diagnostik bylo vyloučeno 29 vzorků. Kalibrační model vykázal hodnotu korelačního koeficientu kalibrace 0,99 za použití 15 faktorů. RMSEC byla 2,65, RMSECV 3,32 a RMSEP



Obr. 7. PLS kalibrační model pro stanovení obsahu GSL; RMSEC = 1,14, R = 0,96



Obr. 8. Křížová validace modelu pro stanovení obsahu GSL; RMSECV = 1,30,  $R_{CV}$  = 0,94

5,08. Větší rozptyl hodnot chyb je možné vysvětlit tím, že kalibrační soubor není v celém rozsahu znaku optimálně vyvážený. Model bude postupně v problematických oblastech doplňován o standardy, čímž by bylo možné snížit míru predikční nejistoty.

Shluková analýza kalibračních standardů

K tvorbě modelů byly použity vzorky jarní i ozimé formy řepky olejky, které by mohly mít potencionálně odlišnou matici vzorku. Oprávněnost postupu použití spekter těchto obou forem při vývoji NIR modelů současně byla potvrzena pomocí diagnostiky základních komponent. V 3D grafu diagnostiky základních komponent, který umožňuje sledovat kalibrační standardy po rozřídění do tříd jako barevné shluky, nebyl pozorován rozdíl ve spektech řepky jarní a ozimé formy.

## Závěr

Byly vyvinuty a validovány kalibrační FT-NIR modely pro stanovení hlavních parametrů kvality řepky olejky. Sklizňový rok, zejména pokud se průběh počasí významně liší od ročníků, ve kterých byly shromážděny kalibrační standardy, může mít na spektra, a tím i na přesnost analýz, vliv. Proto budou vytvořené kalibrační modely kontinuálně doplňovány nejen o vzorky s malou četností, ale i o vzorky běžné. Modely zůstanou průběžnou aktualizací robustní a částečně se eliminuje vliv proměnné matrice přírodního materiálu. Práce prokázala vhodnost použití metody FT-NIR pro předběžné hodnocení genotypů ve šlechtění řepky olejky a v evidenci GZ. Použití této metody je velmi efektivní z hlediska úspory času, vysokého množství stanovených vzorků a nenáročnosti na obsluhu. Vzorky řepkových semen také není třeba před analýzou nijak upravovat, čímž nedochází k jejich destrukci a ztrátě klíčivosti. Tato skutečnost umožňuje zpracování vybraných vzorků rostlinného materiálu ihned po sklizni, vyhodnocení a následný výsev genotypů vybraných na základě kritérií kvality v témže roce.

*Výsledky byly získány v souvislosti s řešením projektu č. QJ 1510172 „Využití nekonvenčních výchozích materiálů, biotechnologických metod a efektivních postupů v liniovém a hybridním šlechtění ozimé řepky“ (2015–2018), který byl realizován za finanční spoluúčasti MZe ČR - NAZV.*

## LITERATURA

1. Prugar J.: *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha 2008.
2. Gromadzka J., Wardencki W.: *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 61, 33 (2011).
3. Petisco C., García-Criado B., Vázquez-de-Aldana B. R., Haro A., García-Ciudad A.: *Ind. Crops Prod.* 32,

- 139 (2010).
4. Zhang C., Kong W., Liu F., He Y.: *Heliyon* 2, 1 (2015).
  5. Míka V., Tillmann P., Koprna R., Nerušil P., Kučera V.: *Plant Soil Environ.* 49, 141 (2003).
  6. Font R., Rio-Celestino M., Carrea E., Haro-Bailon A.: *Phytochemistry* 66, 175 (2005).
  7. Font R., Rio-Celestino M., Haro-Bailon A.: *Ind. Crops Prod.* 24, 307 (2006).
  8. Vrbovský V., Endlová L.: *Úroda* 8, 54 (2014).
  9. Velasco L., Becker H.: *Euphytica* 101, 221 (1998).
  10. Nosenko T., Hutsalo I., Nosenko V., Levchuk I., Litvynchuk S.: *Nat. Univ. Food Technol.* 1, 94 (2013).
  11. Endlová L., Rychlá A., Vrbovský V., Navrátilová Z.: *Úroda* 12, 30 (2015).
  12. ČSN EN ISO 659: *Olejnata semena. Stanovení obsahu oleje* (leden 2009).
  13. ČSN EN ISO 665: *Olejnata semena. Stanovení vlhkosti* (září 2001).
  14. ČSN EN ISO 9167-1: *Olejnata semena. Stanovení obsahu glukosinolatů* (prosinec 1998).
  15. Zehnálek P.: *Seznam doporučených odrůd řepky olejky 2016*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Národní odrůdový úřad, Brno 2016.
  16. Baranyak P., Fábry A.: *Řepka, pěstování, využití, ekonomika*. Profi Press s. r. o., Praha 2007.
  17. Mba O., Adewale P., Dumont M. J., Ngadi M.: *Ind. Crops Prod.* 61, 472 (2014).
  18. Koprna R., Nerušil P., Kolovrat O., Kučera V., Koutek A.: *Czech J. Genet. Plant Breed.* 42, 4 (2006).

**L. Endlová<sup>a,b,c</sup>, V. Vrbovský<sup>a,c</sup>, Z. Navrátilová<sup>b</sup>, and L. Tenkl<sup>d</sup>** (<sup>a</sup> *Oseva Development and Research Ltd., Zubří*, <sup>b</sup> *Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Ostrava, Ostrava*, <sup>c</sup> *Oseva pro Ltd.*, <sup>d</sup> *Nicolet CZ Ltd.*): **The Use of Near-Infrared Spectroscopy in Rapeseed Breeding Programs**

In order to determine qualitative traits of rapeseed, FT-NIR calibration models were developed, based on the data from routine reference methods. The correlation of the obtained FT-NIR spectra and the analytical data was implemented using PLS regression algorithm. The models were subsequently verified using the root mean square error of calibration, the root mean square error of cross validation, the root mean square error of prediction factors and the correlation coefficients. The applicability of the calibration models (dry matter, oil, oleic, linoleic, linolenic, and palmitic acid, glucosinolates) for the routine assessment of samples was verified. The predicted contents of erucic acid, stearic acid, and glucosinolates (genetic resources) exhibit the root mean square errors of prediction which are higher in comparison with the root mean square error of calibration, the root mean square error of cross validation values; nevertheless, all developed models are acceptable for the preliminary screening at the breeding programs of oilseed rapeseed.