



**Stanovení kvality semen hořčice bílé,
sareptské a černé
metodou spektroskopie
v blízké infračervené oblasti**



Opava 2021



OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Stanovení kvality semen hořčice bílé,
sareptské a černé
metodou spektroskopie
v blízké infračervené oblasti**

2021



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Stanovení kvality semen hořčice bílé, sareptské a černé metodou spektroskopie v blízké infračervené oblasti

Dedikace: Certifikovaná metodika vznikla za podpory MZe jako součást řešení projektu NAZV QK1910225 „Zavedení a využití komplexních biotechnologických postupů k charakterizaci a tvorbě genových zdrojů a dalších výchozích materiálů hořčic pro potravinářské a pícní účely“ (2019 – 2023) a institucionální podpory MZe-RO1818.

Autorský kolektiv a podíl práce jednotlivých autorů na tvorbě metodiky:

Mgr. Lenka Endlová, Ph.D., zástupce autorského kolektivu (OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.):
40 %

Ing. Andrea Rychlá, zástupce autorského kolektivu (OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.): 20 %

Ing. Veronika Gališová, zástupce autorského kolektivu (OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.): 20 %

Mgr. Viktor Vrbovský, zástupce autorského kolektivu (OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.): 20 %

Oponentní posudky vypracovali:

Ing. Tereza Šindelková (Ministerstvo zemědělství, Sekce zemědělských komodit a ekologického zemědělství, Odbor rostlinných komodit, Oddělení polních plodin)

Mgr. Michal Haluzík, Ph.D. (Ostravská univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra chemie)

Vydal:

OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.,

Provozovna Opava

Purkyňova 10

764 01 Opava

1. vydání, 2021

© OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

ISBN 978-80-908008-2-3

OBSAH

1	Cíl metodiky	1
2	Vlastní popis metodiky	4
2.1	Úvodní část	4
2.2	Vývoj a validace kalibračních modelů	4
2.3	Zhodnocení vyvinutých kalibračních modelů a metody spektroskopie v blízké infračervené oblasti pro predikci kvality semen hořčice bílé, sareptské a černé	12
2.4	Stanovení kvality semen hořčic metodou spektroskopie v blízké infračervené oblasti	15
3	Srovnání novosti postupů	17
4	Popis uplatnění metodiky	17
5	Ekonomické aspekty	18
6	Seznam použité související literatury	20
7	Seznam výsledků, které předcházely vydání metodiky	21

1 Cíl metodiky

Pod pojmem hořčice se rozumí rostliny z čeledi *Brassicaceae* (brukvovité), jejichž části se vyznačují ostře palčivou chutí a semena po navlhčení vodou uvolňují velké množství silic po štěpení glukosinolátů a často slizovatí [1]. Řadíme zde tyto druhy: *Sinapis alba* L. – hořčice bílá, *Brassica juncea* L. – hořčice sarepská, *Brassica nigra* L. – hořčice černá, *Brassica carinata* A. Braun – hořčice hnědá (habešská), *Sinapis arvensis* L. – hořčice rolní, *Eruca sativa* Lam. – roketa setá. První zmínky o pěstování hořčice pocházejí z dob 2000 let před Kristem a uplatnění této plodiny jako pochutiny, koření, je potvrzeno již před 3000 lety [1]. Kromě minoritního použití mladých listů do salátů se převážně využívají semena těchto druhů pro výrobu různých stolních hořčic, jako koření, ale také ve farmakologii. Šlechtěním se podařilo vytvořit odrůdy se sníženým obsahem nežádoucí kyseliny erukové v oleji. Opomenout nelze ani jejich sekundární využití v zemědělství, jakožto meziplodiny - nejčastěji hořčici bílou- pro produkci píce, zelené hnojení s antinematodními účinky proti háďátku řepnému, k zakládání vymrzajícího mulče pro výsev širokosponových kultur [2]. Oceňovaná je také jejich odplevelovací schopnost a ochrana půdy před vodní a větrnou erozí [1]. Nejvyšších osevních ploch v ČR dosáhla hořčice bílá v roce 2003, a to celkem 67 500 ha [3]. Nyní se pěstební plocha pohybuje okolo 15 000 ha [4] s průměrným výnosem semen cca 1 t/ha.

Hořčici sarepskou lze díky její suchovzdornosti uplatnit tam, kde jsou pro jiné plodiny nepříznivé podmínky. Také tato plodina byla šlechtěna na specifické vlastnosti – podařilo se u některých odrůd snížit obsah glukosinolátů a kyseliny erukové. Olej se pak hodí pro potravinářské využití, šroty po extrakci jsou vhodné ke krmivářským účelům. Rozkladné produkty glukosinolátů mají, zvláště u tohoto druhu hořčice, pozitivní vliv na mykorhizu, zvyšující předplodinovou hodnotu. Hojně se hořčice sarepská pěstuje v Rusku, Indii, Kanadě, Austrálii, Argentíně a Kazachstánu [5]. V naší republice je pěstování této komodity pouze okrajové - na několika stovkách hektarů. Výnos málokdy přesáhne 1 t/ha [3].

Hořčice černá nemá v České republice ani okolních státech výrazné využití, proto se, až na pár výjimek (domácí farmaceutické účely), nepěstuje [4]. Je zde však potenciál využívat tuto rostlinu nejen jako meziplodinu a plodinu do biopásů, ale také tam, kde by mohla být přínosem pro svou přirozenou suchovzdornost, jako jsou písčité půdy, oblasti se srážkovým stínem a jiné plochy, potýkající se s problémy nedostatku půdní vláhy.

Cílem této certifikované metodiky je rozšíření spektra vyšetřovacích metod pro účely hodnocení hlavních kvalitativních parametrů semen hořčice bílé, sarepské a černé. Doposud byly tyto parametry ve f. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. sledovány pomocí přesných



laboratorních referenčních metod, což je velmi náročné časově i finančně. Proto jsou klasické metody, jakými jsou např. plynová chromatografie (GC), extrakce nebo gravimetrie, v provozní praxi nahrazovány modernějšími, levnějšími a rychlejšími metodami hodnocení, především v případě nutnosti hodnocení většího množství vzorků v omezeném čase. Typickým příkladem takové metody je spektroskopie v blízké infračervené oblasti.

V předložené metodice je uveden postup hodnocení kvality semen hořčice bílé, sareptské a černé (stanovení olejnatosti a skladby hlavních mastných kyselin v oleji) pomocí spektroskopie v blízké infračervené oblasti. Metoda spektroskopie v blízké infračervené oblasti s Fourierovou instrumentací (FT-NIRS) je v současné době, pro svoji časovou nenáročnost, nedestruktivnost a nižší náklady na analýzu, běžně používanou metodou v celé řadě výzkumných i kontrolních laboratoří. Metoda FT-NIRS je pro svou predikční schopnost používána nejen v zemědělství, ale hlavně v oblasti potravinářského, chemického či farmaceutického průmyslu. FT-NIRS má také své nevýhody. Je to metoda sekundární a pořizovací cena přístroje je relativně vysoká [6, 7].

Konkrétním cílem vlastní certifikované metodiky je:

- vyvinutí FT-NIR kalibračních modelů pro stanovení hlavních kvalitativních znaků;
- optimalizace využití metody FT-NIRS pro stanovení obsahu oleje, skladby mastných kyselin v semenech hořčice bílé, sareptské a černé;
- popsání a vyhodnocení kalibrace a věrohodnosti výsledků stanovení olejnatosti semen, skladby mastných kyselin v semenech hořčice bílé, sareptské a černé.

Zavedením hodnocení kvalitativních parametrů hořčice pomocí spektroskopie v blízké infračervené oblasti dojde k výraznému zefektivnění práce v těchto oblastech:

(1) zefektivnění **šlechtitelského procesu** - zavedení rychlé a levné metody stanovení kvalitativních parametrů hořčičného semene umožní efektivnější selekci šlechtitelských materiálů (při srovnatelných nákladech bude možno realizovat analýzu mnohem větší kolekce materiálů než s využitím přesných metod). Stejně jako u řady jiných plodin, je také u daných druhů hořčic hlavním faktorem rozhodujícím o kvalitě výsledného produktu genetický základ materiálů. Šlechtění, tedy tvorba nových odrůd, se tak nabízí jako vhodný prostředek pro ovlivňování kvalitativních parametrů a sledování požadovaných užitkových směrů. Sleduje se obsah oleje, možnosti jeho využití; podíl mastných kyselin – zvláště pak nežádoucí kyseliny erukové.

(2) při **hodnocení genetických zdrojů** v rámci Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity (NP). NP je zaměřen na shromažďování



a uchovávání cenných genetických zdrojů hospodářsky významných zemědělských plodin, mezi které patří i hořčice bílá, hořčice sarepská a hořčice černá. Nově získaný materiál od dárců je nejprve zařazen do kolekce pracovní, kde jsou shromažďována jeho dostupná pasportní a popisná data. Dále je vzorek regenerován, aby se získalo dostatečné množství osiva pro uložení do Genové banky a pro realizaci maloparcelních pokusů k získání návazných popisných dat, základní morfologické a fenologické znaky, výnosové parametry a kvalitativní ukazatele produkce. Mezi ně patří jak olejnatost semen, skladba mastných kyselin v oleji, tak obsah glukosinolátů (v případě hořčice bílé). Data, hodnotící kvalitativní parametry produkce, jsou v mnoha případech pro koncového uživatele genových zdrojů jedním z nejvýznamnějších parametrů, podle kterých může objektivně realizovat výběr položek. Kurátor kolekce je zodpovědný za realizaci velkého objemu analýz, v běžném roce se testuje kolem 350 materiálů a to v mnoha parametrech. V případě využití klasických laboratorních metod jde o činnost velmi výrazně časově i finančně náročnou. S ohledem na nutnost opakovat stanovení ve víceletých cyklech, se jeví zavedení a použití screeningových metod, jako je např. FT-NIR, jako velmi přínosné.

2 Vlastní popis metodiky

2.1 Úvodní část

Metoda FT-NIRS patří obecně mezi metody molekulové spektroskopie založené na principu absorpce části infračerveného záření jednotlivými molekulami analyzovaného vzorku. Infračervená spektra zaznamenávají změny ve vibračních a rotačně vibračních pohybech molekul. Infračervené záření je část elektromagnetického spektra v rozsahu vlnových délek 780 nm až 1000 nm (v přepočtu na vlnčet $12\,821 - 10\text{ cm}^{-1}$). Z praktických důvodů se podle vlnčetů rozlišuje oblast vzdálená, střední a blízká. Blízká oblast (near infrared, NIR) je charakteristická rozmezím vlnčetů $12\,821 - 4000\text{ cm}^{-1}$. Při porovnání s běžně používanými postupy nabízí tato metoda mnoho výhod: NIR spektrum může být zaznamenáno v několika málo sekundách, charakter analýzy je nedestruktivní, nevyžaduje obvykle žádnou úpravu vzorku a v mnoha případech připouští, že vzorky mohou být po měření znovu použity. FT-NIRS je velmi vhodná pro rychlou a souběžnou analýzu většího rozsahu kvalitativních znaků testovaných vzorků [6, 7].

2.2 Vývoj a validace kalibračních modelů

Vývoj NIR metody pro stanovení sledovaného parametru v požadovaných maticích je založen na vytvoření kalibrační rovnice (modelu) z dostatečně rozsáhlého souboru měřených vzorků, která kvantifikuje vztah mezi informací NIR absorpce a hodnotu stanovenou laboratorní referenční metodou. Kalibrační model pro určitý parametr vyjadřuje míru korelace mezi výsledky získanými NIR metodou a laboratorní referenční metodou a pro jeho spolehlivé vytvoření je potřeba získat dostatečně obsáhlý soubor analyzovaných vzorků. Pro sestavení kalibračních modelů je vždy potřeba shromáždit dostatečný počet vzorků s přijatelným rozpětím hodnot z hlediska dostatečné robustnosti celé metody. Zároveň by měla četnost hodnot jednotlivých složek být rovnoměrně rozložena, což je v případě biologického materiálu značně obtížné [6, 7].

Ve f. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. byly postupně vytvořeny kalibrační modely pro stanovení obsahu oleje, hlavních mastných kyselin (kyseliny olejové, linolové, linolenové a erukové) v semeni hořčice bílé, sareptské a černé. K experimentálním účelům a pro realizaci přesných analýz za účelem tvorby kalibračních modelů byly použity vzorky semen hořčic. Rostlinný materiál pocházel ze šlechtitelského programu f. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. a kolekce NP. Tyto vzorky byly během let 2017 – 2020 získány z polních maloparcelních



odrůdových pokusů v Opavě. U všech sklizených položek byla získána spektra v blízké infračervené oblasti. Po nasnímání vzorků spektrometrem byly následně vzorky analyzovány pomocí laboratorních referenčních metod. Stanovení obsahu oleje bylo provedeno extrakční metodou podle normy ČSN EN ISO 659, 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 po 4 hodinách sušení při 103 °C. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve formě methylesterů mastných kyselin bylo zjištěno pomocí GC/FID podle normy ČSN EN ISO 12966-1, 12966-2. Všechny použité metody jsou validované a rutinně na pracovišti používané [8, 9, 10]. Celkový počet vzorků a rozsahy nalezených koncentrací jednotlivých složek jsou uvedeny v tabulce I - III.

Tabulka I

Charakteristika souborů hořčice bílé pro tvorbu kalibračních modelů

Složka	Jednotky	Metoda	n ^a	Rozsah
Olej	% při 8 % vlhkosti	Extrakce	153	19,9 – 34,8
C18:1 ^b	%	GC/FID	151	12,0 – 50,0
C18:2 ^c	%	GC/FID	155	6,4 – 13,3
C18:3 ^d	%	GC/FID	155	5,6 – 13,3
C22:1 ^e	%	GC/FID	151	12,4 – 63,0

^a Počet vzorků, ^b kyselina olejová, ^c kyselina linolová, ^d kyselina linolenová, ^e kyselina eruková

Tabulka II

Charakteristika souborů hořčice sarepské pro tvorbu kalibračních modelů

Složka	Jednotky	Metoda	n ^a	Rozsah
Olej	% při 8 % vlhkosti	Extrakce	71	24,0 - 43,5
C18:1 ^b	%	GC/FID	72	8,6 - 35,0
C18:2 ^c	%	GC/FID	71	13,0 - 32,0
C18:3 ^d	%	GC/FID	71	6,2 - 16,6
C22:1 ^e	%	GC/FID	72	16,4 - 51,1

^a Počet vzorků, ^b kyselina olejová, ^c kyselina linolová, ^d kyselina linolenová, ^e kyselina eruková

Tabulka III

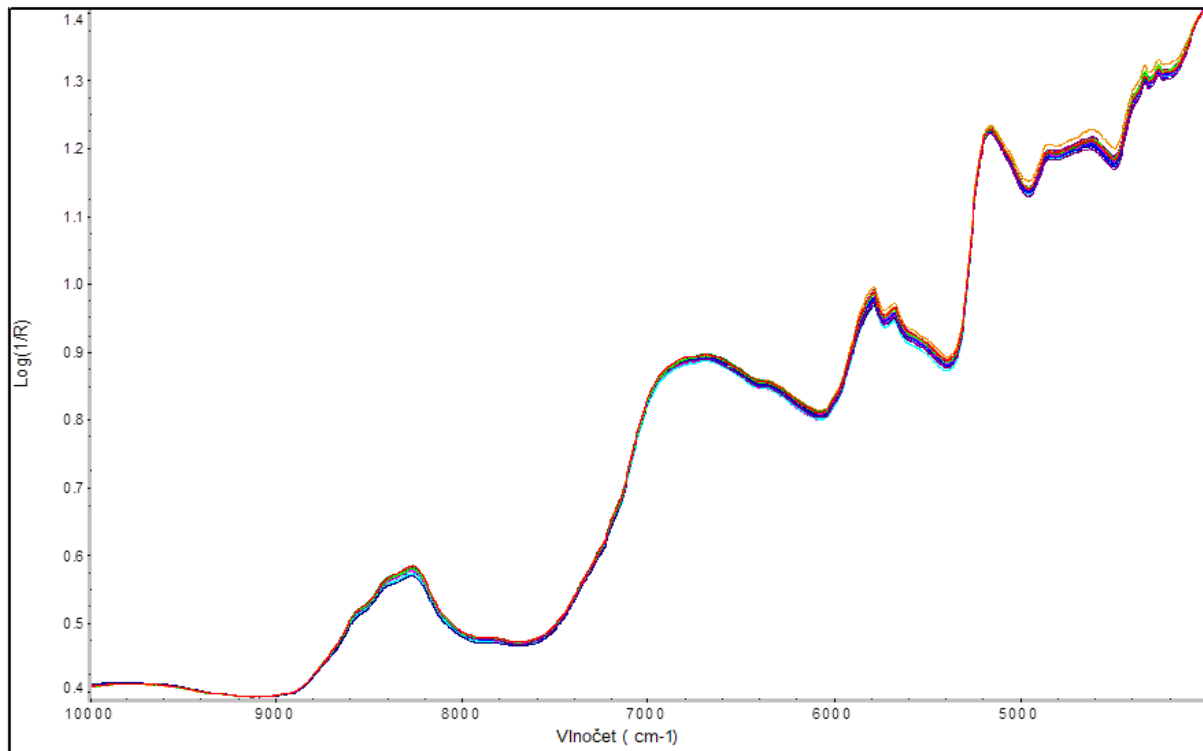
Charakteristika souborů hořčice černé pro tvorbu kalibračních modelů

Složka	Jednotky	Metoda	n ^a	Rozsah
Olej	% při 8 % vlhkosti	Extrakce	89	22,8 - 34,5
C18:1 ^b	%	GC/FID	97	7,1 - 25,9
C18:2 ^c	%	GC/FID	97	12,2 - 24,5
C18:3 ^d	%	GC/FID	97	10,7 - 17,7
C22:1 ^e	%	GC/FID	94	21,1 - 50,5

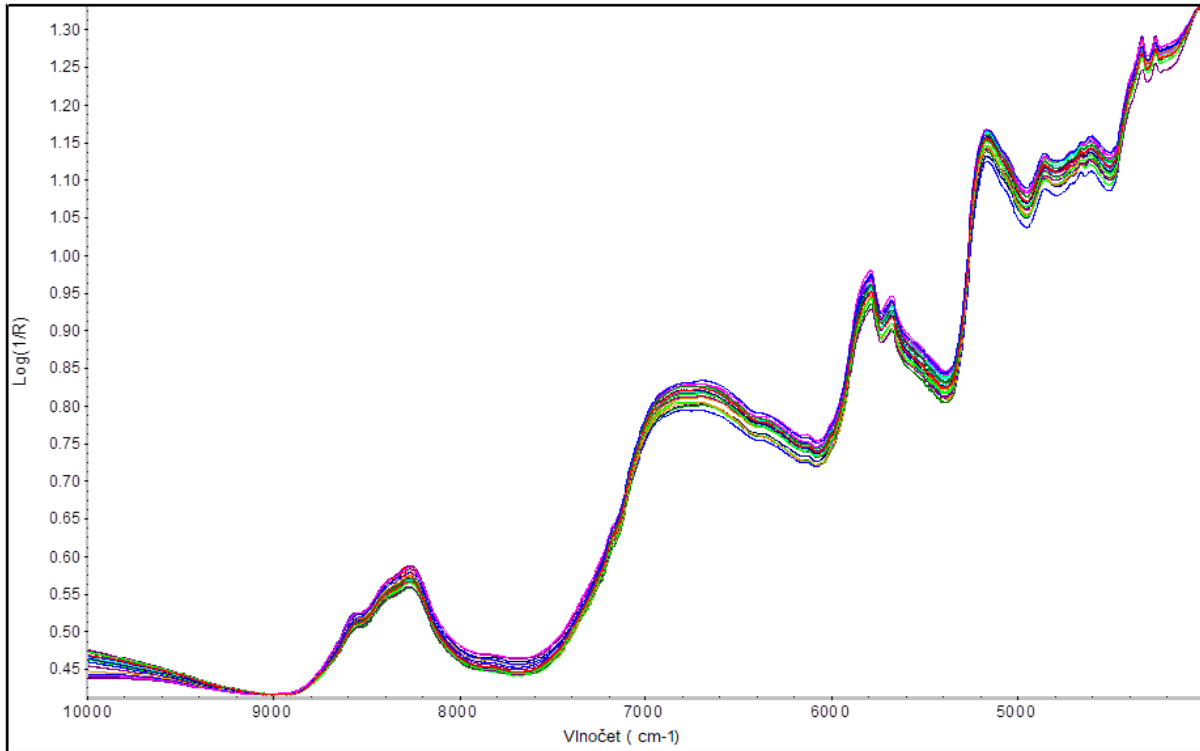
^a Počet vzorků, ^b kyselina olejová, ^c kyselina linolová, ^d kyselina linolenová, ^e kyselina eruková

Při vývoji jednotlivých kalibračních modelů byly vzorky semen hořčice proměřovány v rotačních kruhových kyvetách, které jsou opatřeny křemenným dnem propustným pro NIR záření na spektrometru FT-NIR Antaris II (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) vybaveným interferometrem a integrační sférou pracující technikou difusní reflektance. Spektra byla získána v rozsahu 10 000 – 4000 cm⁻¹ při rozlišení 2 cm⁻¹, počtem scanů 128 a pomocí softwaru Omnic for Antaris. Výsledný signál záření byl zaznamenáván na detektoru z InGaAs. Každý vzorek byl měřen dvakrát a pro výpočet bylo použito průměrné spektrum. Kalibrační modely pro kvantitativní analýzu příslušných analytů byly vyvinuty vhodnou

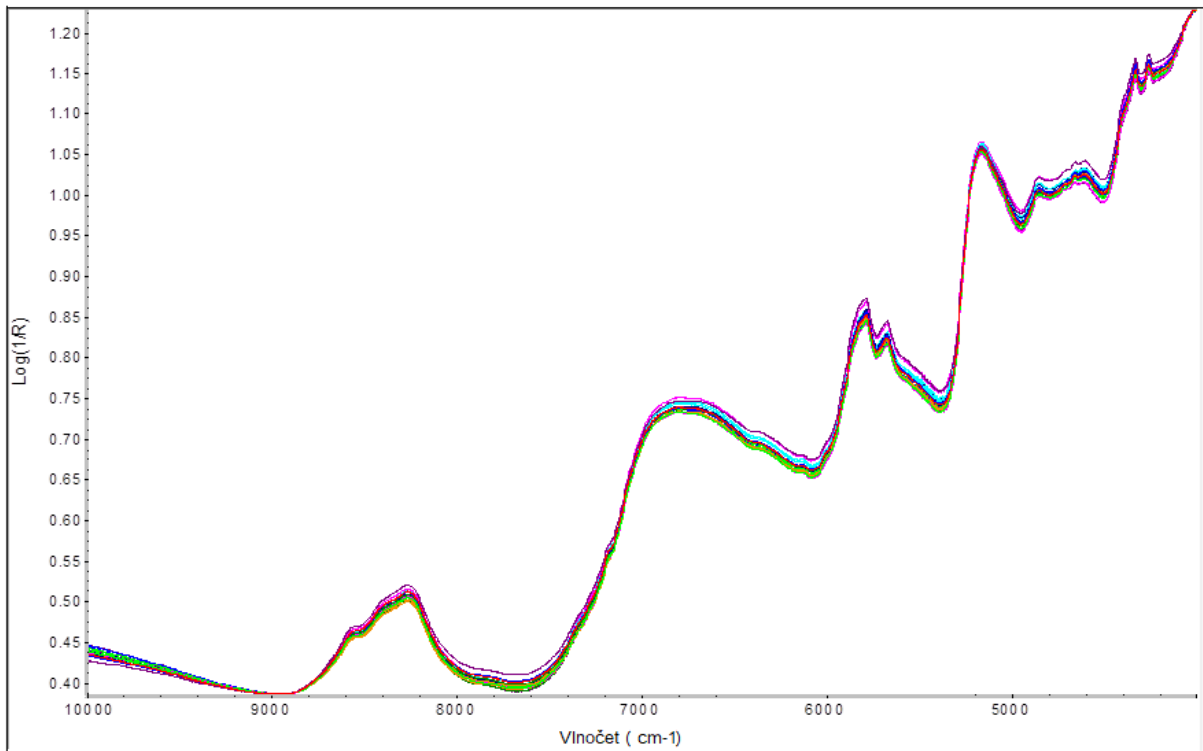
regresní metodou s využitím chemometrického programu Thermo Scientific TQ Analyst (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Na základě získané závislosti mezi spektrální informací a složením vzorku byl vytvořen pro každou kvantitativní analýzu zvlášť kalibrační model pomocí algoritmu Partial Least Squares (PLS, metoda částečných nejmenších čtverců) bez derivace (obrázek 1 - 3 příklady FT-NIR spekter semen hořčice bílé, sarepské a černé).



Obrázek 1 FT-NIR spektra vybraných 20 vzorků semen hořčice bílé



Obrázek 2 FT-NIR spektra vybraných 20 vzorků semen hořčice sareptské



Obrázek 3 FT-NIR spektra vybraných 20 vzorků semen hořčice černé



Optimální spektrální oblasti byly vybrány na základě diagnostiky „Statistical Spectra“, která generuje sérii syntetických spekter, jež ilustrují variabilitu prezentovanou v kalibračních standardech. 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. Křížová validace poskytuje optimální počet latentních proměnných (hlavních komponent). 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. Byla vyjádřena chyba predikce (RMSEP) a hodnota korelačního koeficientu predikce (R_P). Predikční schopnosti vytvořených kalibračních modelů byly ověřeny porovnáním laboratorních referenčních metod a NIR metody na testovaných vzorcích, které nebyly zahrnuty do vývoje kalibračního modelu. Mezi průměry predikovaných a referenčních hodnot nezávislého souboru vzorků nebyl zjištěn statistický významný rozdíl.

Vytvořené kalibrační modely budou kontinuálně doplňovány nejen o vzorky s malou četností, ale i o vzorky běžné, protože 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. Modely zůstanou průběžnou aktualizací robustní a částečně se eliminuje vliv proměnné matrice přírodního materiálu. V tabulce IV - VI a na obrázku 4A - C, 5A - C jsou uvedeny výsledky kalibrace vybraných jakostních znaků, charakteristiky NIR modelů hořčice bílé, sarepské a černé.

Tabulka IV

Parametry kalibračních modelů hořčice bílé

Složka	Počet vzorků	Počet ignor. vzorků	Počet faktorů	RMSEC ^a	R ^b	RMSECV ^c	R _{CV} ^d	RMSEP ^e	R _P ^f
Olej									
(% při 8 % vlhk.)	153	4	10	0,477	0,989	0,560	0,934	0,634	0,978
C18:1 ^g									
(%)	151	4	11	0,832	0,992	1,530	0,960	1,740	0,904
C18:2 ^h									
(%)	155	0	9	0,502	0,922	0,612	0,884	0,668	0,884
C18:3 ^{ch}									
(%)	155	1	11	0,458	0,957	0,616	0,921	0,653	0,906
C22:1 ⁱ									
(%)	151	4	15	1,550	0,985	2,080	0,973	2,360	0,936

^a chyba kalibrace, ^b korelační koeficient kalibrace, ^c chyba křížové validace, ^d korelační koeficient křížové validace, ^e chyba predikce, ^f korelační koeficient predikce, ^g kyselina olejová, ^h kyselina linolová, ^{ch} kyselina linolenová, ⁱ kyselina eruková

Tabulka V

Parametry kalibračních modelů hořčice sareptské

Složka	Počet vzorků	Počet ignor. vzorků	Počet faktorů	RMSEC ^a	R ^b	RMSECV ^c	R _{CV} ^d	RMSEP ^e	R _P ^f
Olej									
(% při 8 % vlhk.)	71	3	9	0,500	0,993	0,610	0,990	0,537	0,998
C18:1 ^g									
(%)	72	2	9	1,290	0,972	1,790	0,945	1,790	0,937
C18:2 ^h									
(%)	71	2	7	1,360	0,936	1,530	0,912	1,600	0,903
C18:3 ^{ch}									
(%)	71	4	11	0,405	0,982	0,708	0,942	0,711	0,951
C22:1 ⁱ									
(%)	72	5	9	2,040	0,979	2,680	0,963	2,760	0,965

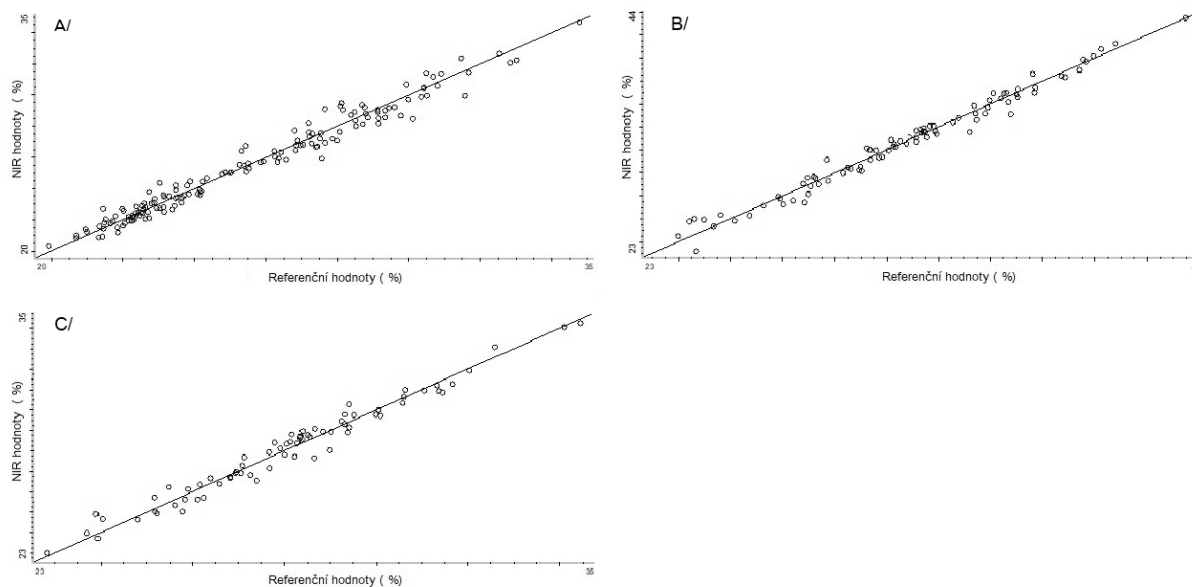
^a chyba kalibrace, ^b korelační koeficient kalibrace, ^c chyba křížové validace, ^d korelační koeficient křížové validace, ^e chyba predikce, ^f korelační koeficient predikce, ^g kyselina olejová, ^h kyselina linolová, ^{ch} kyselina linolenová, ⁱ kyselina eruková

Tabulka VI

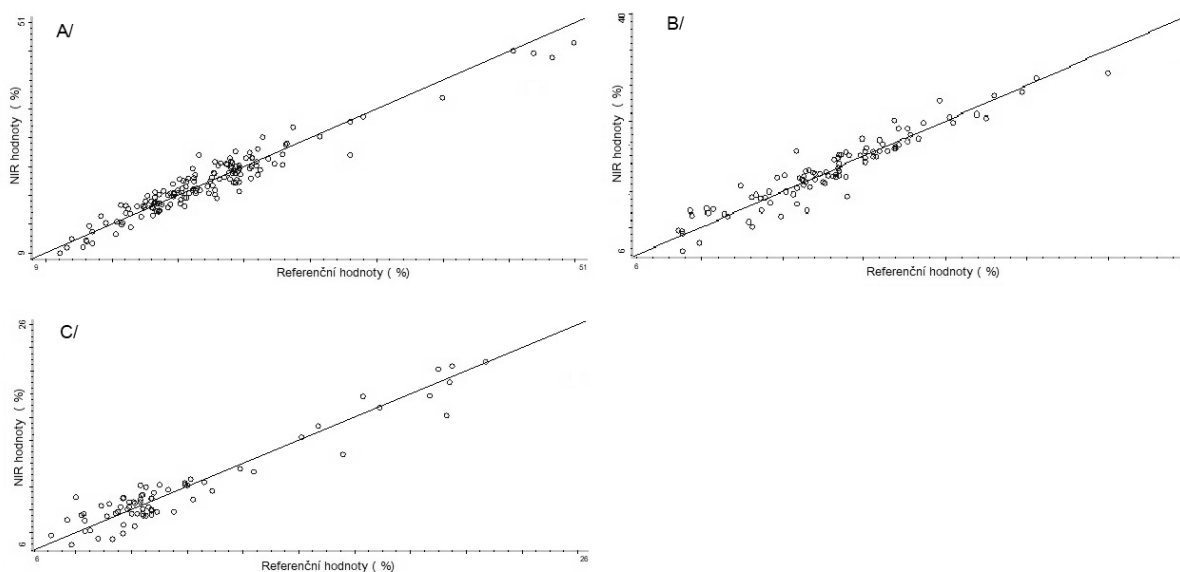
Parametry kalibračních modelů hořčice černé

Složka	Počet vzorků	Počet ignor. vzorků	Počet faktorů	RMSEC ^a	R ^b	RMSECV ^c	R _{CV} ^d	RMSEP ^e	R _P ^f
Olej									
(% při 8 % vlhk.)	89	3	7	0,340	0,990	0,417	0,985	0,457	0,990
C18:1 ^g	97	2	13	0,420	0,995	1,010	0,955	1,040	0,968
(%)									
C18:2 ^h	97	3	9	0,688	0,967	1,050	0,921	1,180	0,935
(%)									
C18:3 ^{ch}	97	4	12	0,264	0,988	0,445	0,947	0,432	0,985
(%)									
C22:1 ⁱ	94	2	12	1,300	0,979	2,260	0,937	2,480	0,926
(%)									

^a chyba kalibrace, ^b korelační koeficient kalibrace, ^c chyba křížové validace, ^d korelační koeficient křížové validace, ^e chyba predikce, ^f korelační koeficient predikce, ^g kyselina olejová, ^h kyselina linolová, ^{ch} kyselina linolenová, ⁱ kyselina eruková



Obrázek 4 A - C Křížová validace modelu pro stanovení obsahu oleje (RMSECV = 0,560, R_{CV} = 0,934 hořčice bílá, RMSECV = 0,610, R_{CV} = 0,990 hořčice sarepská, RMSECV = 0,417, R_{CV} = 0,985 hořčice černá)



Obrázek 5 A - C Křížová validace modelu pro stanovení obsahu kyseliny olejové (RMSECV = 1,530, R_{CV} = 0,960 hořčice bílá, RMSECV = 1,790, R_{CV} = 0,945 hořčice sareptská, RMSECV = 1,010, R_{CV} = 0,955 hořčice černá)

2.3 Zhodnocení vyvinutých kalibračních modelů a metody spektroskopie v blízké infračervené oblasti pro predikci kvality semen hořčice bílé, sareptské a černé

Hořčice bílá

Kalibrační model pro predikci obsahu oleje vykazuje široký rozsah znaku (19,9 – 34,8 %) a vysokou úroveň korelačních koeficientů (0,934 – 0,989). Standardní chyba kalibrace byla pro olej 0,477, chyba křížové validace 0,560 a chyba predikce 0,634. Chybami RMSEC, RMSECV a RMSEP je ověřována použitelnost kalibračních modelů. Malý rozptyl hodnot všech tří chyb u modelů svědčí o jejich vhodnosti k praktickému použití. Hodnota chyby predikce je srovnatelná s laboratorní referenční metodou. Singht (2013) udává hodnotu chyby křížové validace 1,01 a korelační koeficient kalibrace 0,907 [11].

Kalibrační model pro predikci obsahu kyseliny olejové vykázal hodnotu korelačního koeficientu kalibrace 0,992, což opět ukazuje na velmi silnou regresní závislost. Model se vyznačuje velkým kalibračním rozsahem daného znaku (12,0 – 50,0 %) a dobrou úrovní korelačních koeficientů. RMSEC byla 0,832, RMSECV 1,530 a RMSEP 1,740. 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 bude možné snížit míru predikční nejistoty.



Kalibrační modely pro predikci obsahu kyseliny linolové a linolenové vykazují běžnou šíři znaku (6,4 – 13,3 % a 5,6 – 13,3 %) a dostatečný počet standardů (155). Hodnoty korelačních koeficientů kalibrace byly 0,922 a 0,957 (silná závislost). RMSEC byla 0,502, RMSECV 0,612 a RMSEP 0,668 v případě kyseliny linolové a RMSEC byla 0,458, RMSECV 0,616 a RMSEP 0,653 v případě kyseliny linolenové. Standardní chyby kalibrace, křížové validace i predikce dosáhly vyrovnaných hodnot a modely je možné používat pro rutinní hodnocení vzorků.

Kalibrační model pro predikci obsahu kyseliny erukové byl vytvořen ze 151 vzorků standardů a je charakterizovaný velkým kalibračním rozsahem znaku (12,4 – 63,0 %). Korelační koeficienty dosáhly 0,936 – 0,985, počet vysvětlujících faktorů byl vyšší, vykázal hodnotu 15. RMSEC byla 1,550, RMSECV 2,080 a RMSEP 2,360. Byl nalezen větší rozptyl hodnot všech tří chyb, který může být způsoben nerovnoměrným rozložením koncentračního zastoupení kalibračních standardů v důsledku širokého rozsahu znaku. Rozptyl hodnot všech tří chyb je akceptovatelný a z praktického hlediska poskytuje NIR metoda dostatečně spolehlivé výsledky pro stanovení obsahu těchto parametrů. Hodnota chyby predikce je srovnatelná s publikovanými hodnotami, např. Kumar (2010) udává RMSECV 2,70 a korelační koeficient kalibrace 0,972 [12].

Hořčice sareptská

Kalibrační model pro predikci obsahu oleje vykazuje stejně jako model pro predikci obsahu oleje u hořčice bílé široký rozsah znaku (24,0 – 43,5 %) a vysokou úroveň korelačních koeficientů (0,990 – 0,998). Standardní chyba kalibrace byla pro olej 0,500, chyba křížové validace 0,610 a chyba predikce 0,537. Malý rozptyl hodnot všech tří chyb u modelů svědčí o jejich vhodnosti k praktickému použití.

Kalibrační model pro predikci obsahu kyseliny olejové vykázal hodnotu korelačního koeficientu kalibrace 0,972 (silná závislost) za použití 9 faktorů. Model se vyznačuje poměrně vysokou robustností a velkým kalibračním rozsahem (8,6 – 35,0 %). Standardní chyba kalibrace pro obsah kyseliny olejové byla 1,360, chyba křížové validace 1,530 a chyba predikce 1,600.

Kalibrační modely pro predikci obsahu kyseliny linolové a linolenové vykazují běžnou šíři znaku (13,0 – 32,0 % a 6,2 – 16,6 %) a počet standardů byl 71. Hodnoty korelačních koeficientů kalibrace byly 0,936 a 0,982 (silná závislost). RMSEC byla 1,360, RMSECV 1,530 a RMSEP 1,600 v případě kyseliny linolové a RMSEC byla 0,405, RMSECV 0,708 a RMSEP 0,711 v případě kyseliny linolenové. Standardní chyby kalibrace, křížové validace



i predikce dosáhly vyrovnaných hodnot a modely je možné používat pro rutinní hodnocení vzorků.

Kalibrační model pro predikci obsahu kyseliny erukové byl vytvořen ze 72 vzorků standardů a je charakterizovaný velkým kalibračním rozsahem znaku (16,4 – 51,1 %). Korelační koeficienty dosáhly 0,963 – 0,979 a RMSEC byla 2,040, RMSECV 2,680 a RMSEP 2,760. 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.

Hořčice černá

Kalibrační model pro predikci obsahu oleje vykazuje běžnou šíři znaku (22,8 – 34,5 %) a dostatečný počet standardů. Hodnota korelačního koeficientu kalibrace byla 0,990 (silná závislost). RMSEC byla 0,340, RMSECV 0,417 a RMSEP 0,457. Standardní chyby kalibrace, křížové validace i predikce dosáhly vyrovnaných hodnot modelu a svědčí o vhodnosti použití kalibračního modelu pro potřeby hodnocení testovaných vzorků.

Kalibrační model pro predikci obsahu kyseliny olejové a linolové vykázal hodnoty korelačního koeficientů 0,955 - 0,995 a pro predikci obsahu kyseliny linolové 0,921 – 0,967. RMSEC byla 0,420, RMSECV 1,010 a RMSEP 1,040 v případě kyseliny olejové a RMSEC byla 0,688, RMSECV 1,050 a RMSEP 1,180 v případě kyseliny linolové.

Kalibrační model pro predikci obsahu kyseliny linolenové vykázal hodnotu korelačního koeficientu kalibrace 0,988 (velmi silná závislost). RMSEC byla 0,264, RMSECV 0,445 a RMSEP 0,432. Byl nalezen akceptovatelný rozptyl hodnot všech tří chyb u obou modelů a z praktického hlediska poskytuje NIR metoda dostatečně spolehlivé výsledky pro stanovení obsahu těchto parametrů.

Kalibrační model pro predikci obsahu kyseliny erukové má rozptyl korelačních koeficientů 0,926 – 0,979, počet vysvětlujících faktorů je vyšší, vykázal hodnotu 12. RMSEC byla 1,300, RMSECV 2,260 a RMSEP 2,480. Byl nalezen větší rozptyl hodnot všech tří chyb, který může být způsoben nerovnoměrným rozložením koncentračního zastoupení kalibračních standardů v důsledku širokého rozsahu znaku (21,1 – 50,5 %).

Uvedené příklady patnácti kalibračních modelů pokrývají parametry posuzující kvalitu hořčicového semene. Na základě výsledků kalibrace byla ověřena použitelnost kalibračních modelů (olej, kyselina olejová, linolová, linolenová). Získané výsledky ukázaly, že FT-NIR metodu lze využívat k rutinnímu hodnocení vzorků v rámci šlechtění hořčic a hodnocení



genových zdrojů v rámci NP. Výsledky také prokázaly, že predikce obsahu kyseliny erukové je zatížena vyšší chybou RMSEP. Nicméně i přesto mohou být všechny vyvinuté modely považovány za využitelné pro potřeby předběžného screeningu testovaných materiálů. Vyvinuté modely je možné použít za definovaných podmínek např. pro potřeby řady šlechtitelských aktivit, kde je smyslem, v rámci posuzovaného znaku, nedestruktivně odlišit kontrastní genotypy.

2.4 Stanovení kvality semen hořčic metodou spektroskopie v blízké infračervené oblasti

Princip

Vzorky semen hořčice bílé, sarepské a černé se proměřují metodou FT-NIRS v oblasti 4 000 - 10 000 cm^{-1} , resp. 1 000 – 2 500 nm s reflektanční detekcí. Vyhodnocení daného parametru se provádí matematickými statistickými postupy z kalibračního modelu. Měření probíhá v pevném, nepomletém vzorku semen hořčic.

Přístroje a pomůcky

- FT-NIR spektrometr (např. typ ANTARIS II, firma Thermo Scientific).
- Drobné laboratorní pomůcky – lžička, utěrka, štětce, pinzeta, kádinka.
- Křemenná měřicí kyveta – o vhodném průměru 10, 30 a 50 mm a výšce 12, 15 a 25 mm.

Postup analýzy

Úprava vzorku

Metoda FT-NIRS nevyžaduje ve většině případů speciální přípravu vzorků, ale musejí být dodrženy přesné postupy pro sušení a homogenizaci vzorků. Je důležité, aby laboratoř připravila skutečně reprezentativní vzorek s homogenní jakostí. K rozboru se vždy použije vzorek bez příměsí a nečistot (zbytky slámy, půda, kamínky, aj.). Způsob úpravy vzorků před analýzou musí být totožný s postupy, které byly použity při tvorbě kalibračních modelů.

Sušení vzorku

V případě, že je potřeba vzorek před analýzou sušit, teplota v sušárně nebo sterilizátoru nesmí přesáhnout 50 °C.



Homogenizace vzorku

Vzorky vyžadují před vlastním měřením důkladné promíchání, aby bylo dosaženo maximální homogenity vzorků. Pokud vzorky nejsou homogenní, může být významně ovlivněna přesnost a správnost analýzy.

Měření vzorků na FT-NIR spektrometru

Před měřením vzorků se přístroj nastaví podle doporučení výrobce. NIR spektra upravených vzorků se snímají v křemenných kyvetách. Nadávkované vzorky se umístí do měřicí části přístroje a nasnímá se jeho NIR spektrum. Všechna měření se provádějí v režimu reflektance a každý vzorek se měří paralelně.

Plnění kyvet vzorky

Vyčištěný a dokonale promíchaný vzorek se rovnoměrně nadávkuje do měřicí kyvety v takovém množství, aby bylo možné kyvetu uzavřít (v případě kompresní kyvety). Jestliže se použije nekompresní kyveta, vzorek se dávkuje v max. množství odpovídajícímu objemu kyvety. Vzorek se musí nadávkovat tak, aby pokrýval celou kyvetu a aby se eliminovaly vzduchové mezery mezi částmi vzorku, které by mohly negativně ovlivnit správnost měření.

Vyjádření výsledků

Vyhodnocení výsledků měření pro danou matici a parametr se provádí softwarově s použitím matematických a statistických postupů aplikovaných na vytvořené příslušné kalibrační modely. K vyhodnocení získaných spektrálních dat se používá vhodný vyhodnocovací software (např. Omnic for Antaris). Naměřená NIR spektra jsou v tomto programu uložena a následně je možné k jednotlivým vzorkům přiřadit laboratorní referenční hodnoty. Výsledky analýz vzorků se uvádějí jako průměr ze dvou paralelních stanovení. Uvádí se v % a jsou vyjádřeny s přesností na dvě desetinná místa.

3 Srovnání novosti postupů

Navržený postup analýzy umožní sledovat kvantitativní a kvalitativní parametry semen testovaných druhů, odrůd a novošlechtění hořčic během procesu šlechtění a vybírat potencionálně vhodné materiály s ohledem na kvalitu produkce. Neperspektivní potomstvo s nevyhovující kvalitou tak může být ze šlechtitelského procesu vyřazeno dříve, což povede k jeho značnému odlehčení a zefektivnění. Vytvořené kalibrační modely najdou využití nejen ve šlechtění hořčice bílé, sarepské a černé, ale také při standardním hodnocení genových zdrojů kolekce hořčic Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity.

Zaváděním metodiky do šlechtitelské praxe se významně zefektivní výběr genotypů s požadovanou kvalitou. Analýzy rozsáhlých kolekcí šlechtitelských materiálů umožní výběr pouze perspektivních genotypů, eliminuje se nutnost dalšího pěstování ostatních materiálů, což povede v konečném důsledku k významnému snížení časové náročnosti, úspoře personálních i materiálních nákladů a možnosti rozšíření šlechtitelské kolekce o nové perspektivní materiály.

4 Popis uplatnění metodiky

Budoucí uživatelé metodiky mohou být šlechtitelská a výzkumná pracoviště a univerzity, která ji mohou využít ve svých šlechtitelských programech při hodnocení rozpracovaných materiálů a k urychlení selekčního procesu tvorby nových odrůd. Vyvinuté kalibrační modely budou ve společnostech OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. a OSEVA PRO s.r.o. použity pro předběžné hodnocení genotypů ve šlechtění hořčice bílé, sarepské a při hodnocení genových zdrojů kolekce olejin.

Metoda FT-NIRS bude pro šlechtitele účinným nástrojem k selekci šlechtitelských materiálů hořčic s ohledem na kvalitu produkce. Rychle a s dostatečnou přesností charakterizuje nejdůležitější parametry oleje. Šlechtitel na základě výsledků může vybrat šlechtitelský materiál s odpovídající kvalitou pro použití k potravinářským účelům. Pokud ale některé materiály vykazují vysoké obsahy nežádoucích látek (např. celkový obsah kyseliny erukové), je potřebné přehodnotit účel jejich koncového využití. U materiálů, využívaných k potravinářským účelům, je kvalita oleje a obsahy nežádoucích složek limitující, v případě využití hořčic pro produkci biomasy ale nehrají roli a materiál je hodnocen podle zcela jiných kritérií. Úkolem následných selekcí a stabilizací genotypů je pak cílená fixace požadovaných vlastností. V případě potravinářské semenné hořčice se pozitivní výběr provádí na základě vyššího obsahu

oleje v semeni nebo na základě specifického složení mastných kyselin. Za tímto účelem je nezbytné realizovat velký počet analýz, který je prakticky proveditelný pouze s využitím uvedené metody FT-NIRS. Z hlediska šlechtění je velkým přínosem metody její nedestruktivnost. Vzorky semen, jakožto základ příští generace, není třeba nijak před analýzou upravovat, čímž nedochází k jejich poškozování a ztrátě klíčivosti. Mohou být použita k zásevu další šlechtitelské generace.

Uvedená metoda bude mít rovněž značný význam při hodnocení genetických zdrojů hořčice bílé, černé a sarepské v rámci řešení NP, který pomáhá shromáždit velké množství dat o kvantitativních a kvalitativních parametrech produkce, a to ve víceletých cyklech hodnocení. Kolekce hořčic z NP patří k jedné z největších plodinových kolekcí olejnin (hned po brukvi řepce olejce a máku setém) a každoročně uspokojuje požadavky širokého spektra domácích i zahraničních uživatelů. Šlechtitelé i ostatní uživatelé genetických zdrojů hořčic v následujících letech ocení přístup k informacím o chemickém složení oleje. Každoročně se hodnotí přes 350 genových zdrojů a pomocí metody FT-NIRS bude možné současně vyhodnotit až 6 kvalitativních parametrů. Díky FT-NIRS se tak podaří získat kolem 2100 zhodnocených popisných znaků za rok, charakterizujících materiály i z pohledu zdravotního přínosu pro konzumenty. Tento objem by v žádném případě nebylo možno realizovat běžnými přesnými laboratorními metodami, a to jak z pohledu časové náročnosti, tak neúnosných finančních nákladů. Získaná data, a to z minimálně tří let hodnocení, budou zpracována a uložena do Informačního systému GRIN Czech, který je přístupný na webu všem zájemcům a uživatelům (např. z řad šlechtitelů, výzkumných pracovníků aj.).

5 Ekonomické aspekty

Použití FT-NIR metody je velmi efektivní z hlediska úspory času, nedestruktivnosti, vysokého množství rozborovaných vzorků, možnosti získání většího počtu zhodnocených kvalitativních znaků z jednoho měření, ale hlavně kvůli výrazně nižším nákladům na vlastní analýzu. Z pohledu vstupních nákladů je v případě používání spektroskopie v blízké infračervené oblasti nejvýznamnější položkou pořizovací cena přístroje (cca 1,5 mil Kč), dále je nutné počítat s náklady na tvorbu predikčních kalibračních modelů. Naopak přímé provozní náklady, pracovní a časová náročnost na obsluhu jsou nízké, a tak jsou vstupní náklady v poměrně krátkém časovém období kompenzovány. Příklad konkrétního ekonomického přínosu pro f. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. je uveden v Tabulce VII, která srovnává výši přibližných nákladů na analýzu 400 vzorků (novošlechtění, genové zdroje), což je počet řádově



odpovídající roční potřebě analýz. Klasickými metodami je tento objem, především z důvodů nákladovosti, v současné době nerealizovatelný. V případě analýz semen hořčic se podle uvedeného vyčíslení úspora provozních nákladů za využití metody FT-NIRS pohybuje okolo 700 tis. Kč ročně.

Tabulka VII

Příklad ekonomického přínosu metody FT-NIRS pro soubor 400 analyzovaných vzorků hořčice bílé

Typ analýzy	Cena analýzy (Kč)
Mastné kyseliny (GC) - 1200 Kč/vzorek	480 000
Olej (extrakčně) - 550 Kč/vzorek	220 000
Vlhkost (gravimetricky) - 110 Kč/vzorek	44 000
FT-NIRS - 110 Kč/vzorek	44 000

Zefektivnění šlechtitelského procesu zavedením metody FT-NIRS lze spatřovat především v možnosti rozsáhlejší kvalitativní charakterizace širšího spektra šlechtitelských materiálů a cílené selekci genotypů s požadovanou kvalitou. Šlechtitelský proces tak nemusí být zatěžován vedením a testováním neperspektivních materiálů. Při předpokladu ročních nákladů na vedení jedné linie cca 1200 Kč, bude úspora při včasné eliminaci odhadem 50 nevhodných materiálů ročně 60 tis. Kč.



6 Seznam použité související literatury

- [1] Fábry, A. a kol. (1990): Jarní olejniný. České Budějovice: Ministerstvo zemědělství a výživy ČR. ISBN 80-7084-026-9.
- [2] Zehnálek, P. (2021): Olejniný 2021: seznam doporučených odrůd, přehled odrůd. Brno: GILL. ISBN 978-80-7401-196-2.
- [3] Baranyk, P. a kol. (2010): Olejniný. Praha: Profi Press. ISBN 978-80-86726-38-0.
- [4] Mikšík, V. Hořčice: Pěstitelský rádce. České Budějovice: Kurent, 2007. ISBN 978-80-87111-01-7.
- [5] Soupis ploch osevů. Český statistický úřad [online]. Praha, 02.07.2021 [cit. 2021-11-10]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/soupis-ploch-osevu-k-31-5-2021>
- [6] Musílek J. (2012): Aplikace blízké infračervené spektroskopie ve farmaceutické analýze. *Chemické listy* roč. 106, s. 10 –15. ISSN 0009-2770.
- [7] Endlová, L., Vrbovský, V., Navrátilová, Z., Tenkl, L. (2017): Využití spektroskopie v blízké infračervené oblasti ve šlechtění řepky olejky. *Chemické listy*. č. 111, s. 524-530. ISSN 1213-7103.
- [8] ČSN EN ISO 659 Olejnatá semena – Stanovení obsahu oleje (Referenční metoda).
- [9] ČSN EN ISO 12966-1 Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 1: Směrnice pro moderní plynovou chromatografii methylesterů mastných kyselin.
- [10] ČSN EN ISO 12966-2 Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin.
- [11] Kumar, S. a kol. (2010): Screening for erucic acid and glucosinolate content in rapeseed-mustard seeds using near infrared reflectance spectroscopy. *J. Food Sci Technol* n. 47 (6), p. 690 – 692. ISSN 0022-1155.
- [12] Singh, J. a kol. (2013): Standardization of the fourier transform near-infrared reflectance spectroscopy for estimation of some oil quality parameters in mustard (*Brassica* spp.). *Plant Soil Environ* n. 59, p. 478 – 483. ISSN 1214-1178.



7 Seznam výsledků, které předcházely vydání metodiky

- [1] Rychlá, A., Plachká, E., Gališová, V. (2021): Vhodné pěstitelské technologie nosných odrůd hořčice bílé. Farmář č. 1, s. 8 - 12. ISSN 1210-9789.
- [2] Rychlá, A., Plachká E., Gališová V. (2021): Rozdíly v meziodrůdové citlivosti hořčice bílé k napadení semen houbovými patogeny. Úroda č. 12, roč. LXIX, vědecká příloha. ISSN 0139-6013.
- [3] Brant, V. a kol. (2021): Biologická variabilita brukvovitých meziplodin. Úroda č. 11, roč. LXIX, s. 57 - 62. ISSN 0139-6013.
- [4] Rychlá, A., Plachká, E. (2020): Vliv technologie pěstování a odrůdy na výnos hořčice bílé. Úroda č. 4, s. 60 - 64. ISSN 0139-6013.
- [5] Rychlá, A. (2020): Nedoceněná exotická kráska - hořčice sarepská. Úroda č. 2, s. 50 - 52. ISSN 0139-6013.



Tato publikace neprošla jazykovou úpravou.
Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři.

OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

Provozovna Opava

Purkyňova 10

764 01 Opava

1. vydání, 2020

Tel: +420 553 624 160

e-mail: opava@oseva.cz

www.oseva-vav.cz