



**Minimalizační metoda stanovení  
obsahu mastných kyselin pro včasnou  
selekcí šlechtitelských materiálů  
řepky olejně (*Brassica napus* L.)**



Opava 2019



**OSEVA PRO s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejin Opava**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Minimalizační metoda stanovení  
obsahu mastných kyselin pro včasnou  
selekcí šlechtitelských materiálů  
řepky olejné (*Brassica napus* L.)**

**2019**



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

---

## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

### **Minimalizační metoda stanovení obsahu mastných kyselin pro včasnou selekci šlechtitelských materiálů řepky olejné (*Brassica napus* L.)**

**Dedikace:** Certifikovaná metodika vznikla za podpory MZe jako součást řešení projektu NAZV

QJ1510172 „Využití nekonvenčních výchozích materiálů, biotechnologických metod a efektivních postupů v liniovém a hybridním šlechtění ozimé řepky“ (2015 – 2018) a institucionální podpory MZe-RO1818.

#### **Autorský kolektiv a podíl práce jednotlivých autorů na tvorbě metodiky:**

Mgr. Lenka Endlová Ph.D., zástupce autorského kolektivu (OSEVA PRO s.r.o.): 70 %

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

Ing. Miroslav Klíma Ph.D., zástupce autorského kolektivu (VÚRV, v.v.i.): 10 %

#### **Oponentní posudky vypracovali:**

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

Mgr. Michal Haluzík Ph.D. (Ostravská univerzita)

#### **Vydal:**

OSEVA PRO s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejin v Opavě,  
Purkyňova 10, 764 01 Opava

1. vydání, 2019

© OSEVA PRO s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejin Opava

ISBN 978-80-905808-6-2

## OBSAH

1	Cíl metodiky .....	6
2	Vlastní popis metodiky .....	7
2.1	Úvodní část.....	7
2.2	Stanovení obsahu mastných kyselin v jednom semeni, segmentu semene, děložce mikrosporových embryí řepky olejné ( <i>Brassica napus</i> L.) metodou plynové chromatografie.....	9
2.2.1	Příprava vzorků k analýze.....	10
2.2.2	Příprava methylesterů mastných kyselin .....	12
2.2.3	Dělení methylesterů MK metodou GC.....	12
2.3	Validace vyvinuté metody.....	15
3	Novost postupů.....	23
4	Popis uplatnění metodiky.....	23
5	Ekonomické aspekty .....	23
6	Seznam použité související literatury .....	24
7	Seznam výsledků, které předcházely vydání metodiky .....	25

## 1 Cíl metodiky

V předložené metodice je uveden postup stanovení methylesterů mastných kyselin (MK) v semenech, segmentech semen a dělohách mikrosporových embryí dihaploidních regenerantů řepky olejné (*Brassica napus* L.). Její uplatnění ve šlechtitelské praxi má za cíl zefektivnění šlechtitelského procesu při tvorbě odrůd se specifickým složením MK v oleji. Metoda plynové chromatografie je rutinně využívanou metodou při stanovování spektra MK během šlechtění. Modifikace pomocí této metodiky účelně rozšiřuje její uplatnění i v takových fázích šlechtitelského procesu, ve kterých doposud uplatněna nebyla. Zásadní přínos uvedené metodiky spočívá především ve dvou aspektech – (1) umožňuje provést analýzu spektra MK z velmi malého výchozího vzorku rostlinného materiálu a (2) oděr vzorku nezpůsobí destrukci daného rostlinného jedince, je s ním tedy možno nadále šlechtitelsky pracovat.

Analýza MK z jednoho semene: ve šlechtění je často nutné pracovat s velmi omezeným množstvím rozmnožovacího materiálu. Ten se získává z rostlin izolovaných proti cizosprašení zpravidla v technických izolátorech a zisk osiva bývá řádově v jednotkách, maximálně desítkách gramů. Z tohoto důvodu je pro identifikaci obsahu MK možnost analýzy jednotlivých jedinců semen přínosná z důvodu úspory cenného rozmnožovacího materiálu. Tato metoda bude využívána při hodnocení geneticky dostatečně stabilních genotypů vyšších generací.

Analýza MK ze segmentu semene: použití této metody najde uplatnění v raných fázích šlechtitelského procesu, v generacích kdy je každý jedinec genetickým unikátem (štěpící generace F2). Jelikož metoda umožňuje odebrat vzorek – segment semene - na analýzu a současně je toto semeno možno dopěstovat do dospělé rostliny, získáváme tak velmi včasné údaje o složení MK daného jedince a máme možnost provést efektivní selekci bez nutnosti přemnožovat všechny jedince dané generace, jak tomu bylo doposud.

Analýza MK v dělohách mikrosporových embryí dihaploidních regenerantů: kombinace modifikované analytické metody plynové chromatografie s biotechnologickou metodou tvorby dihaploidních linií řepky představuje perspektivní postup produkce odrůd řepky se změněným složením MK. Dihaploidizace je v současnosti v případě šlechtění ozimé řepky již rutinně využívanou metodou. V rámci spolupráce sdružení výzkumných a šlechtitelských organizací „Česká řepka“ došlo k její významné optimalizaci a celý proces včetně všech vylepšení byl publikován v roce 2008 (Miroslava Vyvadilová a kol. 2008: Metodika produkce dihaploidních linií pro šlechtění řepky ozimé. Metodika pro praxi, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha - Ruzyně. ISBN 978-80-87011-80-5). Tato metoda umožňuje tvorbu zcela

homozygotních, tj. geneticky stabilních, linií řepky s významnou časovou úsporou oproti konvenčním metodám založených na opakovaném inbreedingu. Dihaploidizace spočívá v in vitro kultivaci pylových zrn za vzniku embryí regenerantů a zdvojení jejich chromozomové sádky. Během tohoto procesu jsou za účelem lepší regenerace ořezávány děložní lístky embryí. Představovaná metodika účelně využívá produkce těchto segmentů jako vzorků pro analýzu obsahu MK, takže je možno stanovit kvalitativní parametry oleje dihaploidních genotypů ještě ve fázi in vitro kultivace a umožňuje provést efektivní selekci a dopěstovat pouze vybrané genotypy s požadovaným složením MK.

Uplatnění metodiky do šlechtitelské praxe má za cíl významné zefektivnění tvorby odrůd se specifickým obsahem MK v oleji tím, že umožní včasnou identifikaci spektra MK v takových fázích šlechtitelského procesu, ve kterých to nebylo dříve proveditelné. Na základě včasné selekce tak budou vybrány pouze perspektivní genotypy, eliminuje se nutnost kultivace neperspektivních materiálů, což povede k významu snížení časové náročnosti, úspore personálních i materiálních prostředků a možnosti rozšíření šlechtitelské kolekce o nové perspektivní materiály.

## **2 Vlastní popis metodiky**

### **2.1 Úvodní část**

Význam olejnin v českém, ale i evropském zemědělství, v zemědělsko-potravinářském komplexu a tudíž i hospodářství jako celku, je dán několika významnými aspekty. Pro zemědělce jsou olejninu ekonomicky zajímavou skupinou plodin se zpravidla vysokou rentabilitou výroby. Olejninu jsou důležitou surovinou pro výrobu oleje, jenž zabezpečuje jednu ze základních složek lidské výživy, rovněž jsou technickou surovinou a složkou jaderných krmiv [1, 2]. Nárůst osevních ploch olejnin koreluje s nárůstem světové produkce rostlinných olejů. Za posledních 15 let (resp. v letech 2002 - 2017) se světová produkce rostlinných olejů zvýšila z 95,8 mil. t na přibližně 198,46 mil. t. Důvod dynamického růstu pěstování olejnin je zejména růst světové ekonomiky, životní úrovně v rozvojových zemích a zvýšená zdravotní uvědomělost, s kterou souvisí změna stravovacích návyků. Dochází tak k celkovému nárůstu spotřeb olejů především v zemích „třetího“ světa [2, 3]. V produkci rostlinného oleje je již několik let na prvním místě palmový olej (35 %), následuje olej sójový (28 %), řepkový (14 %) a slunečnicový (9 %). Rostlinné oleje se používají převážně pro produkci jedlých olejů a margarínů, ale čím dál více také pro nepotravinářské účely v oleoprůmyslu [2, 3]. Další

uplatnění našly jako surovina zpracovatelských technologií, např. výroba paliv (bionafta), maziv, laků, barev, detergentů a kosmetických přípravků [3, 4].

V marketingovém roce 2017/18 bylo v ČR sklizeno podle Českého statistického úřadu 489,3 tis. ha olejnin a jejich produkce dosáhla 1,2 mil. t. Na celkové výši sklizňových ploch se již tradičně nejvíce podílela řepka olejka (*Brassica napus* L.) se sklizňovou plochou 411,8 tis. ha. Mezi další významné olejninu v ČR patří mák setý (*Papaver somniferum* L.) se sklizňovou plochou v uvedeném roce 26,6 tis. ha, slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) 20,2 tis. ha, hořčice na semeno 12,9 tis. ha, sója luštinatá (*Glycine max* (L.) Merrill.) 15,2 tis. ha a len setý olejný (*Linum usitatissimum* L.) 1,2 tis. ha [4, 5].

V ČR má pěstování řepky dlouholetou tradici. Po roce 1990 došlo k významnému rozvoji pěstování této plodiny. Vzrostla osévaná plocha, která se v průběhu posledních 25 let více než ztrojnásobila [6]. Mnohaleté pěstitelské zkušenosti, pokroky ve šlechtění řepky i intenzivní výzkum technologií pěstování přispěly k optimalizaci využití tuzemských agroekologických podmínek, které umožňují dosažení rentabilních výnosů. V letech 1975 - 1985 došlo díky šlechtění k výrazné změně v odrůdové skladbě vlivem šlechtění. Postupně se podařilo dosáhnout pokroku ve složení mastných kyselin (především snížení obsahu nežádoucí kyseliny erukové) v řepkovém oleji při výrazném snížení glukosinolátů ve šrotech. Také došlo ke zlepšení základních produkčních charakteristik jako výnos semene a oleje, zimovzdornost, rezistence apod. Současný program šlechtění se mimo jiné zaměřuje na sledování kvalitativních znaků, jako je zvyšování olejnatosti, skladba mastných kyselin (MK) a další snižování obsahu antinutričních látek. V tomto kontextu se jeví jako vysoce žádoucí výběr genotypů s optimální nebo specifickou skladbou MK [7, 8].

O kvalitě tuků rozhoduje složení MK. Vysoká nutriční kvalita řepkového oleje je dána nízkým obsahem nasycených MK (6 - 8 %), bohatým obsahem mononenasyčené kyseliny olejové (C18:1) přibližně na úrovni olivového oleje (50 - 60 %), vysokým obsahem polynenasycených MK (kyseliny linolové 20 - 22 % a  $\alpha$ -linolenové 9 -10 %) a také přijatelným obsahem fytoosterolů a tokoferolů. Kyselina olejová je nejvýznamnější MK v oleji dvounulových řepok. Vzhledem k charakteru a obsahu této MK snáší řepkový olej vysoké tepelné namáhání při fritování. Řepkový olej patří rovněž k nejlepším zdrojům  $\omega$ -3 MK, kterých máme ve stravě nedostatek. V řepkovém oleji jsou  $\omega$ -3 MK zastoupeny kyselinou  $\alpha$ -linolenovou (C18:3), která je důležitá pro prevenci onemocnění krevního oběhu, nervového systému a onemocnění oční sítnice. Hlavním zástupcem  $\omega$ -6 MK v řepkovém oleji je kyselina linolová (C18:2), která je důležitá pro stavbu buněk, pro posílení imunitního systému a pro



krevní oběh. Řepkový olej obsahuje preferovaný poměr mezi  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3 MK (2,5:1) a pomáhá optimalizovat nevhodný způsob stravování, kdy je aktuálně tento poměr spíše 15:1 [9, 10].

Současným trendem v „kvalitativním“ šlechtění řepky jsou snahy o změnu zastoupení jednotlivých MK. Existuje několik speciálních odrůd řepky s různě změněným podílem MK. Např. vysokoerukové odrůdy „EO“ (kyseliny eruková 50 - 60 %) jsou výhradně určeny pro nepotravinářský průmysl k výrobě tenzidů, odpěňovačů a aditiv. Odrůdy se zvýšeným obsahem kyseliny olejové (HO – High Oleic, např. odrůda Sidney – okolo 75 % kyseliny olejové) jsou naopak vhodné k potravinářskému využití pro svou termickou stabilitu. Dokonce se začínají objevovat materiály s podílem této kyseliny nad 80 %. Tyto odrůdy se pak označují jako HOLL „High Oleic Low Linolenic“. U těchto typů dochází k redukci linolenové kyseliny, která je sice z hlediska výživy prospěšná, způsobuje ale sníženou trvanlivost oleje na základě snadného sklonu k oxidovatelnosti neboli žluknutí tuků. Na druhou stranu je ale žádoucí, aby další šlechtitelské směry byly vedeny právě s cílem zvyšování obsahu esenciální kyseliny linolové a především linolenové pro příznivou úlohu v aterogenezi. Okrajovými směry jsou pak zvýšení obsahu kyseliny laurové (kosmetika, detergenty), palmitové (výroba margarínů, cukrovinek) a stearové (výroba margarínů a kakaového másla) [7, 8, 9].

## **2.2 Stanovení obsahu mastných kyselin v jednom semeni, segmentu semene, děložce mikrosporových embryí řepky olejné (*Brassica napus* L.) metodou plynové chromatografie**

### **Princip**

Mastné kyseliny nacházející se v jednom semeni, segmentu semene nebo děložce mikrosporových embryí řepky se převedou na methylestery mastných kyselin a jejich skladba se stanoví metodou plynové chromatografie (GC) za použití plamenově-ionizačního detektoru (FID). Jednotlivé MK se identifikují pomocí standardního vzorku o známém složení a pro kvantifikaci se použije metoda vnitřní normalizace.

### **Chemikálie a pomůcky**

- Isooktan (p. a.), isopropanol (p.a.), methanol (p.a.), 0,5M methanolát sodný, směs isooktanu a isopropanol 9:1, standard FAME MIX např. GLC-96 nebo Supelco 37 FAMES Standard Mixture.

- Exikátor, chladnička, GC kolona vhodná pro separaci methylesterů mastných kyselin např. FAME Wax (Restek) 30 m . 0,32 mm . 0,25  $\mu$ m, koncentrátor vzorků LabEva, láhev tlaková se

stlačeným N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> a vzduchem, papír filtrační, Petriho misky, pinzeta, plynový chromatograf (Dani Instrument S.p.A.) typ MASTER GC s FID detektorem, mikrodávkovače Hamilton o objemu 5, 100 µl, mikropipeta o objemu 10 – 200 µl, skalpel laboratorní, sterilizátor horkovzdušný nebo sušárna s nucenou cirkulací vzduchu, stereomikroskop (VWR) typ STBL 100, stojany laboratorní a polystyrenové vlastní výroby, tyčinka skleněná, váhy analytické, vialky o objemu 2 ml, vložka do vialky o objemu 200 µl.

## 2.2.1 Příprava vzorků k analýze

### Semeno řepky olejné

Semeno řepky se vyloupne z osemení pomocí skalpelu zmáčknutím semene na Petriho misce, vzorek (jádro semene bez osemení) se zváží a vloží do vialky o objemu 2 ml.

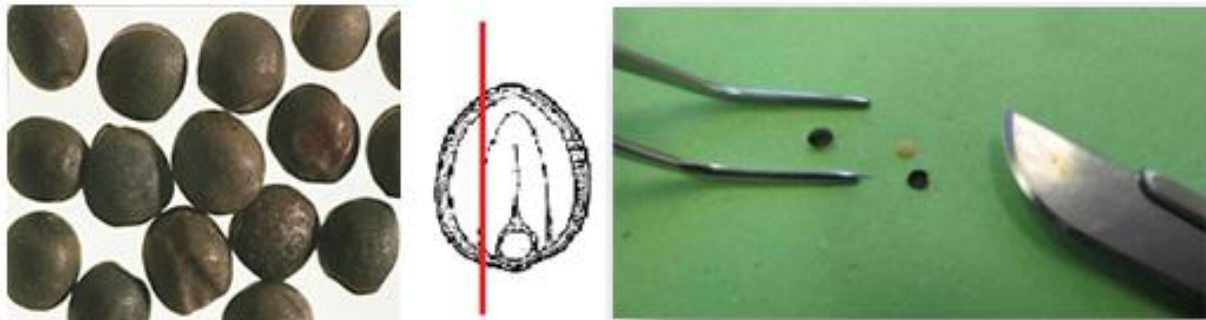
### Segment semene řepky olejné

Při odběru vzorku pro analýzu MK je nutné respektovat anatomicko-morfologickou stavbu řepkového semene z důvodu možnosti zachování klíčivé schopnosti zbylé části pro jeho následné vyšetření a dopěstování rostliny. Tato možnost je předpokladem významného zefektivnění výběru a následného vedení perspektivních linií řepky. Byly provedeny pokusy s rozdělením semene na část pro chemickou analýzu a na část dopěstování rostliny. Za tímto účelem bylo potřebné stanovit správný postup rozdělení semene na příslušné segmenty. Praktickým zkoušením bylo otestováno šest způsobů vedení řezu. Řez byl veden skalpelem pod binokulární lupou za pomoci pinzety. Odběr segmentu semene byl zvolen tak, aby nebyly poškozeny zárodečné orgány semene. Přes osemení je patrná dělicí rýha, na které je v její dolní části pod drobnou vypouklinou ukryt kořínek. Kořínek je pro následný vývoj rostliny nezbytný. Odběrový řez byl proto veden v místech děloh. Ztráta jedné z děloh, nebo některé z jejich částí, není pro vývoj rostliny fatální. Především v dělohách je uloženo největší množství zásobních látek, a proto je tato část vhodná pro analýzu obsahu MK. Část semene se zárodkem byla následně podrobena zkoušce klíčivosti na Petriho misce s filtračním papírem navlhčeným destilovanou vodou. Segmenty byly vyšetřeny také přímo do zahradnického substrátu a bylo zjištěno, že vhodně vedeným řezem nebylo vzcházení rostlin významně ovlivněno. Upravená semena byla také uskladněna v podmínkách běžných skladovacích prostor po dobu pěti měsíců a po zkoušce klíčivosti bylo zjištěno, že i takováto doba po řezu nemá vliv na životaschopnost semene. Nejvhodnější řez semene řepky s možností dopěstování dospělé rostliny ze zbylého segmentu je uveden na obrázku č. 1.

Vlastní příprava segmentu semene řepky je následující: semeno řepky se pomocí skalpelu pod mikroskopem a podle obrázku č. 1 na dva segmenty. Zmáčknutím segmentu semene na Petriho misce se jádro vyloupne z osemení, vzorek se zváží a vloží do vialky o objemu 2 ml.

Obrázek č. 1.

Ukázka optimálního řezu řepkového semene pro odběr segmentu pro analýzu methylesterů MK



### **Děloha mikrosporových embryí dihaploidních regenerantů řepky olejné**

Pro tvorbu dihaploidních linií řepky olejné jsou zakládány mikrosporové kultury, jejichž součástí je zdvojení chromozómové sádky v *in vitro* prostředí, regenerace kotyledonárních embryí a celistvých rostlin podle optimalizované metodiky [12]. Kotyledonární embrya o délce 5–7 mm byla kultivována 3 týdny na tekutém NLN médiu s kyselinou abscisovou (koncentrace 15  $\mu$ M, obrázek č. 2A). Poté byly cca  $\frac{3}{4}$  délky obou děloh embryí odříznuty skalpelem a zamrazeny při  $-20$  °C v mikrozkuvkách. Ořezaná embrya (obrázek č. 2B) byla dále kultivována na pevných živných médiích.

Odřezané segmenty děloh jsou výchozí vzorky pro analýzu MK (obrázek č. 2C). Dělohy (mikrosporových embryí) se vloží do vialky. V otevřené vialce se vzorek vysuší ve sterilizátoru nebo sušárně při teplotě 40 °C po dobu 48 hodin do konstantní hmotnosti.

Obrázek č. 2.

Mikrosporové embryo před ořezáním děloh (A); část embrya s apikálním meristémem po odřezání děloh, pro dopěstování celistvé rostliny (B); vzorky děloh pro analýzy, před zamrazením (C). Délka embrya 7 mm.



### 2.2.2 Příprava methylesterů mastných kyselin

Ke vzorku semene, segmentu semene nebo dělohy mikrosporových embryí ve vialce se přidá mikropipetou 50  $\mu$ l směsi isooktanu a isopropanolu (9:1), suspenze se dobře rozmělní skleněnou tyčinkou. Vialka se upevní zešíkma do koncentrátoru vzorků a pomocí proudu dusíku se vzorek velmi jemně odpaří do sucha. Přidá se 50  $\mu$ l methanolátu sodného a vialka se uzavře víčkem s teflonovým těsněním, obsah se protřepe. Vzorek se nechá stát 20 minut při laboratorní teplotě. Vialka se vzorkem se otevře, přidá se mikropipetou 150  $\mu$ l isooktanu, uzavře se víčkem a obsah dobře protřepe. Vzorek se nechá stát dalších 20 minut při laboratorní teplotě, po té se vialka se vzorkem protřepe a obsah vialky se nechá rozdělit obě fáze. Horní isooktanová fáze se převede mikrodávkačem do vialky s vložkou. Takto připravený extrakt se analyzuje na obsah methylesterů mastných kyselin. V případě pozdější analýzy se vzorek uskladní v chladničce po dobu maximálně dvou týdnů.

### 2.2.3 Dělení methylesterů MK metodou GC

Methylestery MK se rozdělí pomocí plynové chromatografie za použití FID.

#### Podmínky chromatografické analýzy

Parametry kolony, teplota injektoru, detektoru, pece, teplotní program termostatu, průtoky používaných plynů a další parametry např. pro kolonu FAME Wax jsou uvedeny v tabulce č. 1. Pro nástřik vzorku se používá technika split s objemem nástřiku 1 – 3,5  $\mu$ l vzorku.

Hodnota splitu a objemu nástřiku je závislá na hmotnosti vzorku semene, segmentu semene nebo dělohy a rovněž na obsahu oleje ve výchozím vzorku.

Tabulka č. 1. Podmínky chromatografické analýzy

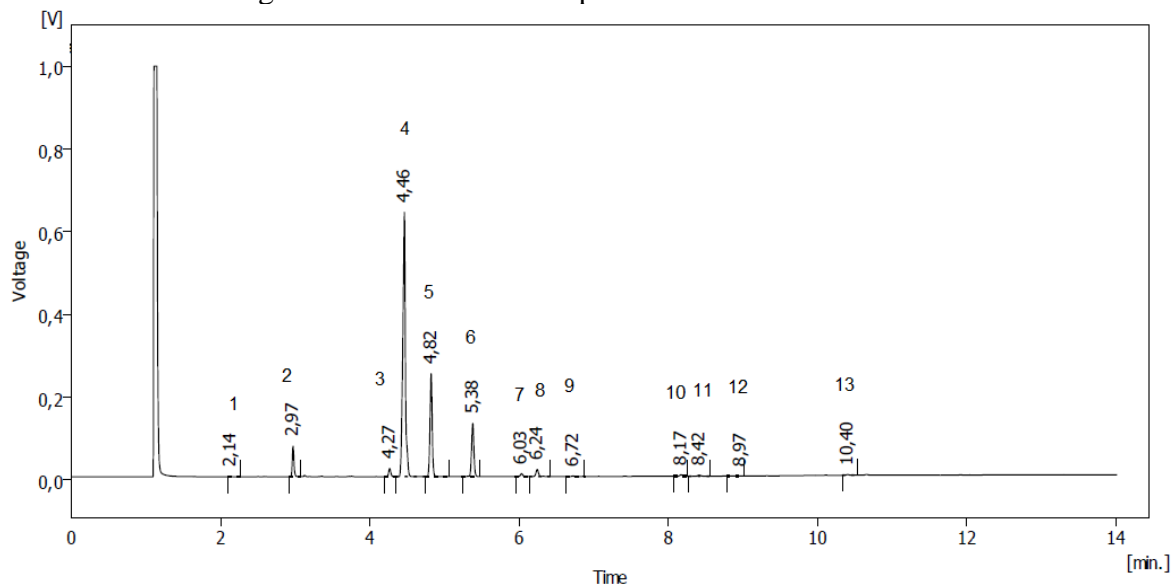
Kapilární kolona	FAME Wax, 30 m . 0,32 mm . 0,25 $\mu$ m
Teplota injektoru	240 °C
Teplota detektoru	250 °C
Teplota pece	195 °C
Teplotní program	195 °C (5 °C/min.) – 240 °C(10 °C/min.) – 250 °C
Délka analýzy	14 min.
Průtok vzduch	280 ml/min.
Průtok vodík	40 ml/min.
Průtok dusík	25 ml/min.

### Vyhodnocení chromatogramů

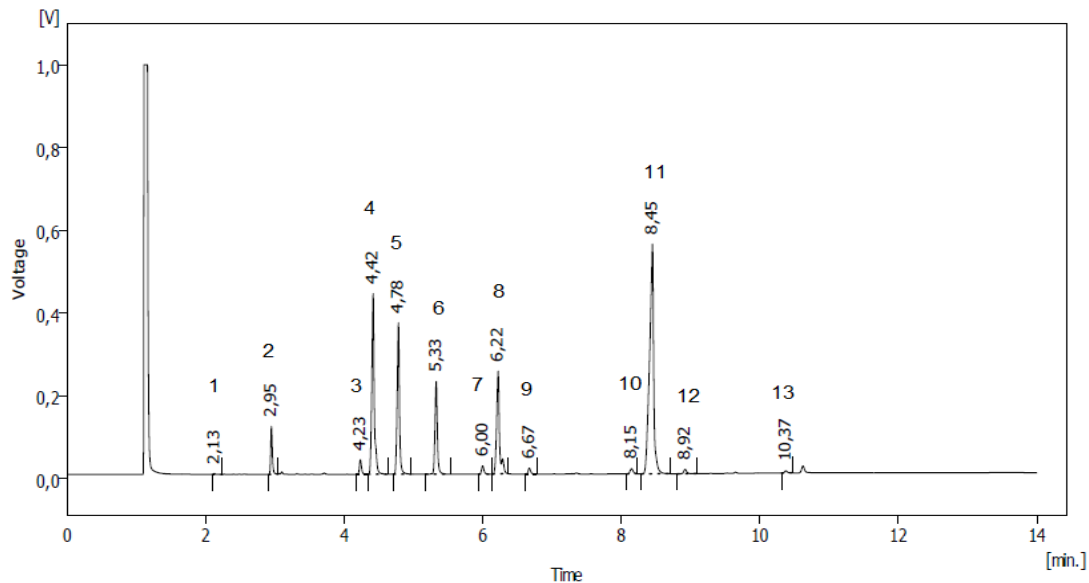
Příklady chromatogramů a pořadí píků jednotlivých methylesterů mastných kyselin na koloně FAME Wax při vhodném teplotním gradientu jsou uvedeny na obrázku č. 3 a 4. V tabulce č. 2 jsou uvedeny názvy příslušných MK.

Obrázek č. 3

Příklad chromatogramu – nízkoeruková řepka



Obrázek č. 4  
Příklad chromatogramu – vysokoeruková řepka



Tabulka č. 2. Názvy mastných kyselin

Číslo píku	Mastná kyselina	Číslo píku	Mastná kyselina
1	myristová	8	eikosenová
2	palmitová	9	eikosadienová
3	stearová	10	behenová
4	olejová	11	eruková
5	linolová	12	dokosadienová
6	$\alpha$ -linolenová	13	dokosaheptaenová
7	arachová		

## Vyjádření výsledků

### Kvalitativní analýza

Kvalitativní vyhodnocení se provádí na základě analýzy standardního vzorku FAME MIX provedené za stejných operačních podmínek, které byly použity při analýze reálného zkušební vzorku. Píky methylesterů MK ve zkušebním vzorku se identifikují na základě jejich retenčních časů, porovnáním s retenčními časy známých MK ve standardním vzorku.

### Kvantitativní analýza

Kvantitativní vyhodnocení se provádí metodou vnitřní normalizace, tzn. za předpokladu, že všechny složky vzorku jsou zaznamenány na chromatogramu, představuje celková plocha

100 %. Obsah jednotlivých MK  $i$  vyjádřený v hmotnostních procentech se vypočítá podle vztahu:

$$(\%)i = (A_i / \Sigma A) \cdot 100,$$

přičemž platí:

$A_i$  = plocha píku odpovídající složce  $i$ ,

$\Sigma A$  = součet ploch všech píků mastných kyselin.

Uvedený výpočet je založen na předpokladu, že plocha píku představuje hmotnostní procenta. V případě, že toto neplatí, použijí se korekční faktory.

## 2.3 Validace vyvinuté metody

### Validační parametry

#### 1/ Správnost

Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídavku s použitím testu výtěžnosti. Výtěžnost (správnost) metody byla stanovena pro 60, 80, 100, 120 a 140 % obsahu mastných kyselin. Koncentrační hladina na 100 % byla považována za referenční hodnoty. Na každé hladině byly připraveny vzorky ve 3 opakováních (tabulka č. 3)

Tabulka č. 3. Správnost metody

Validační parametr	Akceptační kritérium	Mastná kyselina	Výsledky
Správnost	Výtěžnost 91,0 – 110,0 %	myristová kys.	100,3
		palmitová	98,8
		stearová	100,1
		olejová	100,0
		linolová	100,3
		linolenová	100,3
		arachová	93,8
		eikosenová	96,7
		eikodienová	91,7
		behenová	106,7
		eruková	100,0
		lignocerová	100,0

Závěr: analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

## 2/ Přesnost

Přesnost metody pro jednotlivé MK byla vyjádřena směrodatnou odchylkou (RSD) z měření výtěžnosti metody (tabulka č. 4, 5, 6).

Tabulka č. 4. Přesnost metody

	<b>Mastná kyselina</b>					
<b>Koncentrace (%)</b>	<b>myristová</b>	<b>palmitová</b>	<b>stearová</b>	<b>olejová</b>	<b>linolová</b>	<b>linolenová</b>
60	0,10	5,23	2,01	69,23	16,03	4,93
80	0,10	5,27	2,00	68,93	16,10	5,17
120	0,10	5,30	2,00	68,90	16,13	5,20
140	0,10	5,27	2,00	68,97	16,07	5,17
Očekávaný obsah %:	0,10	5,33	2,00	69,03	16,03	5,10
Průměr %:	0,10	5,27	2,00	69,01	16,08	5,12
<b>Interval spolehlivosti</b>	0,00	0,04	0,01	0,21	0,06	0,17
<b>RSD (%)</b>	0,50	0,52	0,25	0,22	0,27	2,41
<b>Výtěžnost (%)</b>	100,25	98,75	100,13	99,96	100,31	100,33

Tabulka č. 5. Přesnost metody

	<b>Mastná kyselina</b>					
<b>Koncentrace (%)</b>	<b>arachová</b>	<b>eikose- nová</b>	<b>eikodie- nová</b>	<b>behe- nová</b>	<b>eru- ková</b>	<b>lignocerová</b>
60	0,60	1,20	0,10	0,29	0,30	0,30
80	0,60	1,20	0,10	0,30	0,30	0,30
120	0,63	1,23	0,10	0,30	0,30	0,30
140	0,67	1,27	0,07	0,31	0,30	0,30
Očekávaný obsah %:	0,67	1,27	0,10	0,28	0,30	0,30
Průměr %:	0,63	1,23	0,09	0,30	0,30	0,30
<b>Interval spolehlivosti</b>	0,04	0,04	0,02	0,01	0,00	0,00
<b>RSD (%)</b>	5,11	2,61	18,18	2,11	0,03	0
<b>Výtěžnost (%)</b>	93,75	96,71	91,67	106,70	100,02	100,00



Tabulka č. 6. Přesnost metody

Validační parametr	Akceptační kritérium	Mastná kyselina	Výsledky
Přesnost	pro obsah > 1 % RSD ≤ 5,0 %	palmitová	0,52
		pro obsah < 1 % RSD ≤ 20,0 %	myristová
		stearová	0,25
		olejová	0,22
		linolová	0,27
		linolenová	2,41
		arachová	5,11
		eikosenová	2,61
		eikodienová	18,18
		behenová	2,11
		eruková	0,03
		lignocerová	0

Závěr: analytická metoda poskytuje statisticky přesné výsledky.

### 3/ Opakovatelnost

Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti (podmínky, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týž pracovníkem za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí) (tabulka č. 7).

Ukazatel opakovatelnosti  $r$  je pak definován rovnicí:

$$R_{\max} = q, s_x$$

přičemž platí:

$q$  = je tabelovaný koeficient pro dvě měření a hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$ , jehož hodnota je 2,8,

$s_x$  = směrodatná odchylka z vícenásobného měření vzorku.

Tabulka č. 7. Opakovatelnost metody

Mastná kyselina	Opakovatelnost r	Relativní r (%)
myristová	0,0014	1,4000
palmitová	0,0762	1,4289
stearová	0,0140	0,7000
olejová	0,4269	0,6183
linolová	0,1205	0,7515
linolenová	0,3450	6,7655
arachová	0,0894	13,4040
eikosenová	0,0894	7,0547
eikodienová	0,0467	46,6667
behenová	0,0176	6,2915
eruková	0,0003	0,0933

Závěr: Povolený rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními byl stanoven na hodnotu 0,2 % abs. u obsahu MK < 5 % a 0,4 % abs. pro obsahy MK ≥ 5 % ve vzorku.

#### 4/ Linearita

Linearita byla ověřena pro split 1/50 a nástřik 0,5 µl standardu FAME MIX a split 1/100 a nástřik 1 µl tzn. pro stejné absolutní nástřikové koncentrace MK (tabulka č. 8, 9).

Směrnice obou kalibračních křivek byly porovnány studentovým t-testem:

$$t = \frac{[b' - b]}{s_b}$$

Pokud je  $t < t(P=0,95; f=m-1)$ , nejsou dokazatelné žádné odchylky od původně určené hodnoty regresního koeficientu b.

Tabulka č. 8. Linearita

Mastná kyselina	Split 1/50, Nástrík 0,5 $\mu$ L			Split 1/100, Nástrík 1,0 $\mu$ L		
	r	a	b	r	a	b
myristová	0,9965	0,49	1,01	0,9981	0,28	0,97
palmitová	0,9980	2,87	3,97	0,9987	1,24	3,92
stearová	0,9988	2,35	2,80	0,9994	0,99	2,82
olejová	0,9989	47,10	55,79	0,9993	22,31	55,94
linolová	0,9988	8,91	11,31	0,9993	4,09	11,31
linolenová	0,9988	3,78	4,69	0,9993	1,72	4,69
arachová	0,9993	2,19	2,72	0,9998	0,84	2,77
eikosenová	0,9993	0,76	0,92	0,9998	0,35	0,93
behenová	0,9996	1,81	2,68	0,9999	0,49	2,75
eruková	0,9995	3,15	4,50	0,9999	0,91	4,62
lignocerová	0,9997	1,41	2,74	0,9999	0,24	2,83

Tabulka č. 9. Linearita

Mastná kyselina	t	$t_{tab}$	Závěr
myristová	1,0964	2,3646	OK
palmitová	0,5224		OK
stearová	0,3273		OK
olejová	0,1380		OK
linolová	0,0024		OK
linolenová	0,0260		OK
arachová	1,1701		OK
eikosenová	0,8347		OK
behenová	2,2630		OK
eruková	1,8924		OK
lignocerová	3,1086		NOT OK

Závěr: Obě kalibrační křivky jsou shodné, pouze u kyseliny lignocerové byl prokázán statisticky významný rozdíl ve směrnících křivek a je nutné vždy pro vyhodnocení použít danou kalibrační křivku.

## 5/ Mez detekce a mez stanovitelnosti

a/ Mez detekce je definována rovnicí:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma \cdot c}{H}$$

přičemž platí:

H = je výška píku,

$\sigma$  = je šum,

c = je koncentrace (0,5 mg/ml).

b/ Mez stanovitelnosti je definována rovnicí:

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma \cdot c}{H}$$

přičemž platí:

H = je výška píku,

$\sigma$  = je šum,

c = je koncentrace (0,5 mg/ml).

Hodnota šumu byla vypočtena z nástřiku blanku (rozpouštědla) ve třech časových oknech chromatogramu (tabulka č. 10).

Tabulka č. 10. Šum

Split	Objem nástřiku ( $\mu$ L)	Šum [mV]			Průměr (mV)
		3-4 min	5-6 min	8-9 min	
1/50	0,5	0,0199	0,0196	0,0266	0,0262
		0,0219	0,0160	0,0279	
		0,0284	0,0357	0,0399	
1/100	1	0,0213	0,0186	0,0368	0,0267
		0,0301	0,0215	0,0353	
		0,0235	0,0149	0,0383	

Průměrná hodnota šumu  $\sigma = 0,0265$  mV

Tabulka č. 11. LOD, LOQ

Mastná kyselina	Výška píku (mV)		LOD			LOQ		
	Split 1/50	Split 1/100	Split 1/50	Split 1/100	průměr	Split 1/50	Split 1/100	průměr
myristová	0,4820	0,4120	0,0907	0,1061	0,0984	0,2749	0,3216	0,2982
palmitová	1,7770	1,4810	0,0246	0,0295	0,0271	0,0746	0,0895	0,0820
stearová	1,0840	0,9020	0,0403	0,0485	0,0444	0,1222	0,1469	0,1346
olejová	20,9280	17,6500	0,0021	0,0025	0,0023	0,0063	0,0075	0,0069
linolová	4,0440	3,3970	0,0108	0,0129	0,0118	0,0328	0,0390	0,0359
linolenová	1,6150	1,3390	0,0271	0,0327	0,0299	0,0820	0,0990	0,0905
arachová	0,8930	0,7430	0,0490	0,0588	0,0539	0,1484	0,1783	0,1634
eikosenová	0,2990	0,2520	0,1462	0,1735	0,1599	0,4431	0,5258	0,4845
behenová	0,7480	0,6280	0,0585	0,0696	0,0640	0,1771	0,2110	0,1941
eruková	1,2130	1,0520	0,0360	0,0416	0,0388	0,1092	0,1260	0,1176
lignocerová	0,7320	0,5920	0,0597	0,0739	0,0668	0,1810	0,2238	0,2024

Tabulka č. 12. LOD, LOQ

Validační parametr	Akceptační kritérium	Výsledky	
LOD (mg/ml)	LOD > 0,2	myristová	0,0984
		palmitová	0,0271
		stearová	0,0444
		olejová	0,0023
		linolová	0,0118
		linolenová	0,0299
		arachová	0,0539
		eikosenová	0,1599
		behenová	0,0640
		eruková	0,0388
		lignocerová	0,0668

Tabulka č. 13. LOD, LOQ

Validační parametr	Akceptační kritérium	Výsledky	
LOQ (mg/ml)	LOQ > 0,5	myristová	0,2982
		palmitová	0,0820
		stearová	0,1346
		olejová	0,0069
		linolová	0,0359
		linolenová	0,0905
		arachová	0,1634
		eikosenová	0,4845
		behenová	0,1941
		eruková	0,1176
		lignocerová	0,2024

Závěr: Metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je vhodná k zamýšlenému použití.

## 6/ Nejistota měření

Při výpočtu nejistot měření se vycházelo ze vztahu:

$$u_C = \sqrt{u_R^2 + u_{ref}^2 + \Delta^2}$$

přičemž platí:

$u_{ref}$  je nejistota referenčního materiálu (certifikovaný nebo interní),

$u_R$  je opakovatelnost měření referenčního materiálu (certifikovaný nebo interní),

$\Delta$  je rozdíl mezi naměřenou a deklarovanou hodnotou referenčního materiálu (certifikovaný nebo interní).

V případě, že není k dispozici certifikovaný nebo interní referenční materiál, výsledky se přejímají z validace dané metody, přičemž  $u_{ref}$  se zanedbává,  $u_R$  je opakovatelnost měření materiálu, na kterém se prováděla validace a  $\Delta$  (odchylka (bias)  $a$ ) je rozdíl mezi naměřenou a danou hodnotou materiálu.

Závěr: Nejistota byla stanovena na hodnotu 2,5 % rel. u obsahu MK < 5 % a 5 % rel. pro obsahy MK  $\geq$  5 % ve vzorku.

### 3 Novost postupů

Novost postupů představuje možnost analýzy obsahu MK z minimálního výchozího vzorku (např. segment semene nebo děloha mikrosporových embryí dihaploidních regenerantů) a také zrychlení procesu šlechtění řepky olejné. Tato metodika má pomoci šlechtitelům k cílenému výběru perspektivních genotypů řepky s vhodným složením MK. Unikátní je zejména analýza obsahu MK v dělohách mikrosporových embryí, doposud v podmínkách ČR nevyužívaná, umožňující skrínig genotypů s perspektivním profilem MK v časných fázích vývoje mikrosporových embryí dihaploidních regenerantů, cca do 2 měsíců od založení mikrosporových kultur.

### 4 Popis uplatnění metodiky

Možnost analýzy obsahu MK v segmentech semen, semenech a dělohách mikrosporových embryí dihaploidních regenerantů pomocí této metodiky se jeví z praktického hlediska jako velice přínosné pro včasnou selekci požadovaných genotypů řepky během šlechtitelského procesu s ohledem na kvalitu vyprodukovaného oleje. Metodika je určena pro organizace zabývající se šlechtěním řepky olejné.

### 5 Ekonomické aspekty

Aplikace metodiky do šlechtitelské praxe přinese značné zefektivnění tohoto procesu při tvorbě odrůd řepky se specifickým složením MK, což je významným a perspektivním směrem šlechtění. Toto zefektivnění je možné z ekonomického pohledu vyjádřit jako úsporu nákladů. Ta vznikne tím, že se již ve velmi rané fázi šlechtitelského procesu identifikuje a následně ze šlechtitelského procesu vyřadí materiály s neperspektivním složením MK. Odpadnou tak náklady spojené s dalším vedením těchto materiálů, tj. přesévání v následných generacích, výroba osiva, s tím spojená nutnost izolace proti cizosprašení, sklizňové práce, analýza kvality apod.

Předpokládají se roční náklady na vedení jednoho genotypu v polních podmínkách 1500 Kč, přinese raná selekce na základě předložené metodiky díky vyřazení neperspektivních materiálů úsporu cca 75 až 150 tis. Kč ročně (v závislosti na počtu vyřazených materiálů) (1500 Kč × 50 až 100 vyřazených materiálů). Také díky identifikaci obsahu MK již v dělohách mikrosporových kultur a eliminaci neperspektivních regenerantů odpadne nutnost jejich dalšího náročného *in vitro* dopěstování. Při předpokládané produkci 1000 ks dihaploidních regenerantů

za účelem selekce na obsah MK a nákladech 1400-1800 Kč na dopěstování a přemnožení 1 ks rostliny, a při použití analýz profilu MK v dělohách mikrosporových embryí a výběru cca 10 % perspektivních materiálů, dojde k úspoře cca 70 – 80 % celkových nákladů, tj. 980 tis. Kč – 1,4 mil. Kč. Další úspora je dána využitím systému dihaploidních regenerantů, kdy je možné zkrátit šlechtitelský proces tvorby nové odrůdy s požadovaným profilem MK v oleji o 2 – 3 roky. Ve šlechtitelské praxi se však zřejmě nebude jednat o prvoplánovou úsporu nákladu, ta bude spíše promítnuta do významného navýšení tvorby a rozšíření výběrové kolekce materiálů se specifickým složením MK, což za současného uplatnění metodiky značně zvýší šance úspěšné registrace nové odrůdy řepky s jedinečnou kvalitou oleje.

## 6 Seznam použité související literatury

- [1] Urban J, Vašák J (2104) Zemědělské systémy II. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. 2014. ISBN: 978-80-213-2464-0.
- [2] Kovalčík A. (1987) Tvorba výnosu a kvality ozimé řepky. Praha: Vysoká škola zemědělská, Praha. Tirážní číslo: 60/854/86.
- [3] Foreign Agricultural Service/USDA, Office of Global Analysis, červenec 2018 [online]. [cit. 2018-09-20]. Dostupné z: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/oilseed-trade/oilseed-trade-07-12-2018.pdf>
- [4] Liška M (2017) Situační a výhledová zpráva olejnin. Praha: Ministerstvo zemědělství. ISBN 978-80-7434-446-6.
- [5] Český statistický úřad, Praha, 2018. Veřejná databáze [online]. [cit. 2018-09-10]. Dostupné z: [https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&pvo=ZEM02A&f=TABULKA&z=T&skupId=346&katalog=30840&pvo=ZEM02A&evo=v527\\_!\\_ZEM02A-2018\\_1](https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&pvo=ZEM02A&f=TABULKA&z=T&skupId=346&katalog=30840&pvo=ZEM02A&evo=v527_!_ZEM02A-2018_1)
- [6] Bečka D a kol. (2007) Řepka ozimá. Pěstitelský rádce. Uplatněná metodika. Praha: Česká zemědělská univerzita. ISBN: 978-80-87111-05-5.
- [7] Prugar J a kol. (2008) Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. ISBN:978-80-86576-28-2.
- [8] Baranyk P. a kol. (2010) Olejnin. Praha: ProfiPress. ISBN: 978-80-86726-38-0.
- [9] Alpmann L a kol. (2009) Řepka – plodina budoucnosti. Praha: BASF.
- [10] Baranyk P a kol. (2005) Řepka olejka. Praha: SPZO. ISBN: 80-903464-3-X.
- [11] Brát J (2018) Vyhodnocení projektu Řepkový olej – olej nad zlato. Úroda, odborná příloha 4: 26-29. ISSN 0139-6013.



- [12] Vyvadilová M, Klíma M, Kučera V. (2008) Metodika produkce dihaploidních linií pro šlechtění řepky ozimé. Certifikovaná metodika, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 28 pp. ISBN 978-80-87011-80-5.

## 7 Seznam výsledků, které předcházely vydání metodiky

- [1] Endlová L., Vrbovský V., Pastrňák J. (2013): Minimalizační postupy stanovení mastných kyselin v řepce. *Úroda* 12/2013, vědecká příloha s. 380–383. ISSN 0139-6013.
- [2] Vrbovský V., Endlová L. (2014): Kvalitativní parametry sledované při šlechtění řepky olejky. *Úroda* 8/2014. s. 54 – 57. ISSN 0139-6013.
- [3] Endlová L., Vrbovský V., Klíma M., Navrátilová Z. (2014): Hodnocení skladby mastných kyselin v dělohách mikrosporových embryí řepky olejky (*Brassica Napus*). *Úroda* 12/2014, vědecká příloha s. 461–464. ISSN 0139-6013.
- [4] Endlová L., Vrbovský V., Pastrňák J. (2014): Minimalizační postupy stanovení mastných kyselin v řepce. In *Studentská vědecká konference 2014 Přírodovědecké fakulty Ostravské univerzity v Ostravě, sborník příspěvků na CD*, 2014. s. 1-4. ISBN: 978-80-7464-359-0.
- [5] Endlová L., Vrbovský V., Navrátilová Z., Klíma M., Rychlá A. (2015): Sledování obsahu mastných kyselin v segmentech semen a dělohách mikrosporových embryí řepky olejky ozimé (*BRASSICA NAPUS*). In *XLIV. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, sborník příspěvků*, s. 96 – 99. ISBN 978-80-86909-11-0. ISSN 1808-1433.
- [6] Klíma, M., Kučera, V., Vyvadilová, M., Hilgert-Delgado, A., Urban, M., Endlová, L., Vrbovský, V., Macháčková, I., Bělská, K., Řičica, M., Šmirous, P., Havlíčková, L., Jozová, E., Čurn, V. (2015): Využití metody dihaploidů ve šlechtění ozimé řepky. In *Sborník Osivo a sadba. XII. odborný a vědecký seminář*. 1. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. s. 227-233. ISBN: 978-80-213-2544-9.
- [7] Endlová L., Vrbovský V., Tvrdík J., Navrátilová Z. (2015): Využití plynové chromatografie pro včasnou selekci genotypů řepky olejné (*BRASSICA NAPUS*) s požadovaným obsahem mastných kyselin v oleji. In *Book of Abstracts - The 22<sup>th</sup> International Scientific Conference*, s. 16. P-ISSN 0551-3677.
- [8] Hilgert-Delgado A., Vrbovský V., Endlová L., Urban M., Klíma M. (2015): Tvorba nových genotypů a hodnocení vybraných parametrů kvality semene resyntetizované řepky. *Úroda* 12/2015, vědecká příloha s. 142–145. ISSN 0139-6013.
- [9] Hilgert-Delgado A., Endlová L., Klíma M., Fernández-Cusimamani E. (2016): Diferenciace profilů mastných kyselin v oleji a dalších parametrů kvality semen kříženců

- resyntetizovaných a konvenčních řepok *Úroda* 12/2016, vědecká příloha s. 141–144. ISSN 0139-6013.
- [10] Hilgert-Delgado, A., Endlová, L., Klíma, M. (2016): Embryogenní schopnost a využití technologie dihaploidů u vybraných kříženců resyntetizované řepky s donorem kvality, *Úroda* 12/2016, vědecká příloha s. 145–148. ISSN 0139-6013.
- [11] Hilgert-Delgado, A., Endlová, L., Rychlá, A., Vrbovský, V., Klíma, M. (2017): Resyntéza řepky olejky, její využití ve šlechtění a rozšíření diverzity. In *Sborník referátů XIII. Národní odborný a vědecký seminář OSIVO A SADBA*, Praha, s. 136-142. ISBN 978-80-213-2732-0.
- [12] Endlová L., Vrbovský V., Klíma M., Navrátilová Z. 2017: Využití modifikované metody plynové chromatografie ke stanovení obsahu mastných kyselin v dělohách mikrosporových embryí řepky olejky. In: Pazderů, K. (ed.). In *Sborník referátů XIII. Národní odborný a vědecký seminář OSIVO A SADBA*, Praha, s. 148-153. ISBN 978-80-213-2732-0.
- [13] Vrbovský V., Endlová L., Klíma M. 2017: Aplikace moderních biotechnologických a analytických metod ve šlechtění řepky olejky se specifickou kvalitou oleje. Česká technologická platforma rostlinných biotechnologií. Česká technologická platforma rostlinných biotechnologií [online]. Dostupné z: <http://rostlinyprobudoucnost.com/?p=new23>.



Tato publikace neprošla jazykovou úpravou.

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři.

OSEVA PRO s.r.o.,  
odštěpný závod Výzkumný ústav olejin v Opavě  
Purkyňova 10  
764 01 Opava  
Tel: +420 553 624 160  
e-mail: [opava@oseva.cz](mailto:opava@oseva.cz)  
[www.oseva.cz](http://www.oseva.cz)