

Biochemické markery tolerancie sucha u rastlín

Metodická príručka s aplikáciou a validáciou na jačmeň siaty

Šarlota Kaňuková

ISBN 978-80-89417-81-0



NÁRODNÉ POĽNOHOSPODÁRSKE
A POTRAVINÁRSKE CENTRUM
VÝSKUMNÝ ÚSTAV RASTLINNEJ
VÝROBY

NÁZOV	Biochemické markery tolerancie sucha u rastlín Metodická príručka s aplikáciou a validáciou na jačmeň siaty
AUTOR	RNDr. Šarlota Kaňuková, PhD.
VYDANIE	prvé
VYDAVATEĽ	Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum Výskumný ústav rastlinnej výroby Bratislavská cesta 122 921 68 Piešťany
ROK VYDANIA	2026
POČET STRÁN	38
ISBN	978-80-89417-81-0

Metodická príručka vznikla za finančnej podpory Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR a je výstupom riešenia úlohy odbornej pomoci č. 27 pre rok 2025 „Výskum tolerancie voči suchu vybraných druhov poľnohospodárskych plodín pre udržateľnosť a adaptáciu ku klimatickým zmenám“, v rámci kontraktu MPRV SR (1131/2024/MPRVSR–930) a NPPC (284/2024/NPPC).

Pri príprave tejto metodickéj príručky boli nástroje umelej inteligencie BioRender.com a Nano Banana Pro použité výhradne na tvorbu grafických ilustrácií a schém. Textová časť dokumentu nebola generovaná pomocou AI; autorka ju spracovala na základe odborných poznatkov a experimentálnych dát.

Obsah

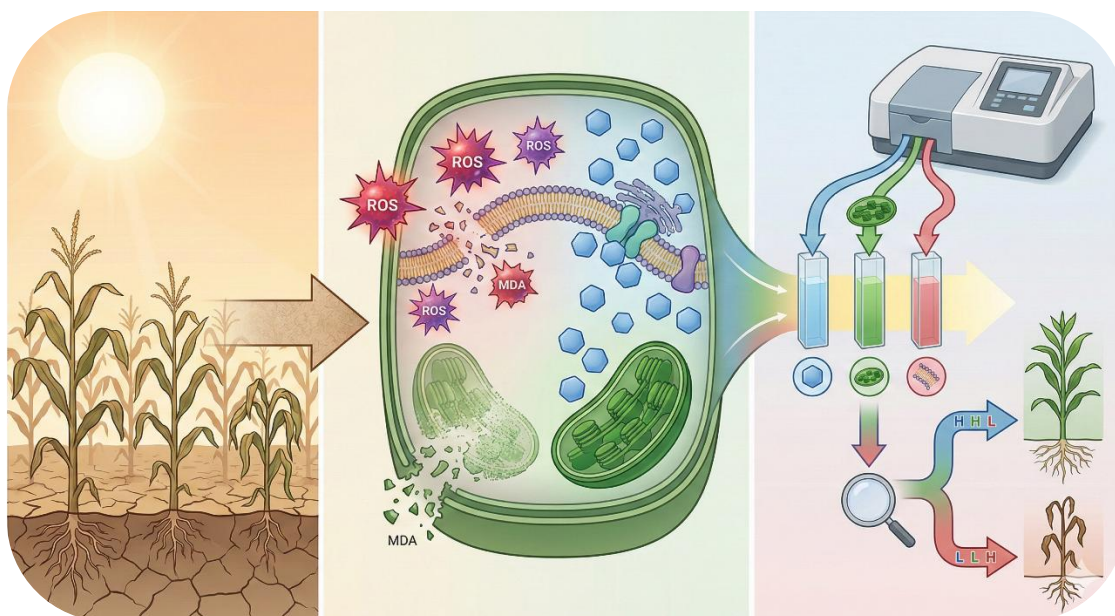
1. Úvod.....	5
2. Potrebný materiál a pomôcky	7
3. Chemikálie a prístrojové vybavenie	8
4. Metodika	9
4.1 Príprava rastlinného materiálu	9
4.1.1 Príprava rastlinného materiálu pre biochemické analýzy	9
4.1.2 Aplikácia stresu suchom	10
4.2 Stanovenie obsahu prolínu v listoch.....	12
4.2.1 Príprava rastlinného extraktu	13
4.2.2 Stanovenie obsahu prolínu	14
4.3 Stanovenie obsahu fotosyntetických pigmentov v listoch	17
4.3.1 Príprava rastlinného extraktu	18
4.3.2 Stanovenie obsahu fotosyntetických pigmentov.....	19
4.4 Stanovenie obsahu malondialdehydu (MDA) - TBARS metódou.....	20
4.4.1 Príprava reagensí pre stanovenie MDA.....	20
4.4.2 Príprava rastlinného extraktu	21
4.4.3 Stanovenie obsahu MDA	22
5. Výsledky a ich vyhodnotenie	24
5.1 Výpočty	24
5.1.1 Stanovenie prolínu - výpočet koncentrácie z kalibračnej krivky	24
5.1.2 Stanovenie fotosyntetických pigmentov - výpočet koncentrácií z absorbancií	25
5.1.3 Stanovenie MDA - výpočet koncentrácie (TBARS metóda).....	26
5.2 Spracovanie a štatistické vyhodnotenie biochemických údajov	27
5.3 Interpretácia biochemických parametrov	29
6. Záver.....	30
7. Použitá literatúra.....	31
8. Príloha	32

1. Úvod

Sucho predstavuje jeden z najvýznamnejších abiotických stresových faktorov, ktorý zásadne obmedzuje rast, fyziologické procesy a produkčný potenciál poľnohospodárskych plodín. Vzniká ako dlhodobý deficit zrážok, ktorý vedie k znižovaniu dostupnosti vody v pôde, narušeniu vodného hospodárenia rastlín a následnému poklesu rastu a úrod (Bandurska a kol., 2017). Predpokladá sa, že klimatická zmena v najbližších desaťročiach spôsobí častejšie a výraznejšie obdobia sucha. To zdôrazňuje potrebu detailne opísať mechanizmy, ktoré rastlinám umožňujú udržať si kľúčové fyziologické funkcie pri nedostatku vody a po ústupe stresu opäť efektívne obnoviť metabolickú aktivitu (Cai a kol., 2020). Reakcia rastlín na vodný deficit je komplexná a zahŕňa viaceré úrovne adaptácie, vrátane skracovania vegetačného cyklu, mechanizmov obmedzujúcich transpiračné straty a modifikácie koreňového systému, ako aj mechanizmov tolerance založených na osmotickej regulácii, úpravách biomechanických vlastností bunkových stien a aktivácii antioxidačných systémov minimalizujúcich oxidačné poškodenie (Kishor a kol., 2014; Sallam a kol., 2019). Keďže sa jednotlivé adaptačné mechanizmy často prekrývajú a ich intenzita závisí od genotypu, je nevyhnutné používať spoľahlivé biochemické ukazovatele na rozlíšenie reakčných typov rastlín a na posúdenie ich adaptačného potenciálu. Jedným z najvýraznejších metabolitov akumulovaných počas vodného stresu je prolín. Tento kompatibilný osmolit prispieva k stabilizácii membrán a proteínov, udržiavaniu redoxnej rovnováhy a podporuje obnovu metabolickej aktivity po ústupe stresu (Szabados a Saviouré, 2009). Zvýšená akumulácia prolínu však nie je jednoznačným indikátorom tolerance, pretože vysoké koncentrácie sa často pozorujú aj u stresovo citlivých genotypov, kde skôr odrážajú rozsah poškodenia než odozvu na adaptáciu (Bandurska a kol., 2017). Naopak, viaceré štúdie na jačmeni preukázali, že akumulácia prolínu môže podporovať stabilitu fotosyntetickej aktivity, metabolické funkcie a tvorbu laterálnych koreňov, čo prispieva k zlepšenej rastovej odozve pri nedostatku vody (Frimpong a kol., 2021). Vodný stres zároveň vedie k nadprodukcii reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré poškodzujú lipidy, proteíny aj fotosyntetické pigmenty a ich akumulácia spôsobuje výrazný oxidačný tlak na bunkové štruktúry (Samanta a kol., 2024). Miera lipidovej peroxidácie sa preto často hodnotí prostredníctvom malondialdehydu (MDA), stabilného produktu oxidácie polynenasýtených mastných kyselín, ktorý predstavuje jeden z markerov oxidačného poškodenia bunkových membrán (Heath a Packer, 1968). Okrem toho sú dôležitým ukazovateľom stresu aj zmeny v obsahu fotosyntetických pigmentov, predovšetkým chlorofylu a, chlorofylu b a karotenoidov, ktorých redukcia odráža narušenie funkčnosti fotosyntetického aparátu a pokles schopnosti rastliny efektívne využívať svetelnú energiu (Lichtenthaler a Wellburn, 1983). Keďže uvedené mechanizmy prebiehajú paralelne a vzájomne sa ovplyvňujú, kombinované hodnotenie prolínu, fotosyntetických pigmentov a MDA poskytuje komplexný a citlivý nástroj na sledovanie reakcie rastlín na vodný deficit a umožňuje spoľahlivo rozlišovať tolerantné a citlivé genotypy (Cai a kol., 2020). Ich spoločné monitorovanie prináša informácie o úrovni osmoregulácie, funkčnom stave fotosyntetického aparátu a rozsahu oxidačného poškodenia, čím vytvára robustný základ pre fyziologické aj šľachtiteľské štúdie zamerané na adaptáciu rastlín na podmienky sucha.

Cieľom tejto metodologickej príručky je poskytnúť jednotný, reprodukovateľný a experimentálne overený súbor laboratórnych postupov na stanovenie uvedených biochemických parametrov

(Obrázok 1). Príručka je založená na spektrofotometrických metódach a doplnená o odporúčania týkajúce sa manipulácie so vzorkami, výpočtov koncentrácií, štatistického spracovania údajov a interpretácie výsledkov. Tento komplexný metodický rámec umožňuje efektívne porovnávať reakcie jednotlivých genotypov v odlišných podmienkach a tým podporuje výskum tolerance rastlín voči suchu, ktoré predstavuje jednu z kľúčových výziev poľnohospodárstva.



Obrázok 1: Vplyv sucha na rastlinu a vznik oxidačného stresu v bunke (vytvorené pomocou Nano Banana Pro).

2. Potrebný materiál a pomôcky

- 1,5 ml mikrocentrifugačné skúmavky (Eppendorf; safe-lock)
- 2 ml mikrocentrifugačné skúmavky
- homogenizačné guľôčky (nerezové alebo keramické)
- stojan na skúmavky do tekutého dusíka
- tekutý dusík
- automatické pipety s objemom 10 μ L; 200 μ L a 1000 μ L
- špičky na automatické pipety (rôzne veľkosti)
- UV-transparentné mikrotitračné platničky (96 jamiek)
- odmerné valce
- odmerné banky
- Erlenmayerová banka
- hnedé laboratórne fľaše alebo alobal v prípade priehľadných fliaš (na reagenty podliehajúce rozkladu na svetle)
- ľad
- chladiaci stojan
- vodný kúpeľ
- centrifúga
- ochranné rukavice
- okuliare
- laboratórny plášť
- nádoba na chemický odpad (osobitne pre roztoky s TCA)
- nádoby na pestovanie rastlín
- pestovateľský substrát
- osivo testovaných plodín/genotypov

3. Chemikálie a prístrojové vybavenie

- **Chemikálie**

- 96 % (v/v) etanol
- ľadová kyselina octová
- ninhydrín
- L-prolín
- destilovaná voda
- 80 % (v/v) acetón
- kyselina trichlóroctová (TCA)
- kyselina thiobarbiturová (TBA)

- **Prístrojové vybavenie**

- TissueLyser (alebo ekvivalentný homogenizátor rastlinných pletív)
- chladená centrifúga (4 °C)
- termoblok alebo vodný kúpeľ (do 95 °C)
- magnetická miešačka s ohrevom (na prípravu TBA reagencie)
- vortex
- analytické váhy (presnosť 0,1 mg)
- NanoDrop spektrofotometer
- mikropelatničkový spektrofotometer
- chladnička (4 °C)
- mraznička (-20 °C)
- hlbokomraziaci box (-80 °C)
- rastová komora/fytotrón
- pôdny vlhkomer, napr. WET-2 Sensor (Delta-T Devices, Cambridge, UK)

4. Metodika

4.1 Príprava rastlinného materiálu

4.1.1 Príprava rastlinného materiálu pre biochemické analýzy

1. Výsev semien

- Semená rastlín sa vysievajú do vegetačných nádob (200 - 500 mL) naplnených pestovateľským substrátom homogénnym pestovateľským substrátom. Do každej nádoby sa vysieva rovnaký počet semien, aby sa zabezpečila porovnateľná hustota porastu (Obrázok 2).

***Poznámka:** Biologické opakovania:* Pre každý experimentálny variant a analyzovanú skupinu rastlín sa pripravujú minimálne tri nezávislé biologické opakovania.



Obrázok 2: Príprava vegetačných nádob a výsev semien ako úvodná fáza experimentu. *Vľavo* sú zobrazené nádoby naplnené homogénnym substrátom, *vpravo* je znázornený rovnomerný výsev semien (autor Š. Kaňuková).

Počiatočné kroky zabezpečujúce štandardizované východiskové podmienky potrebné pre následné fyziologické a biochemické analýzy.

2. Podmienky pestovania:

- Rastliny sa pestujú v kontrolovaných podmienkach rastovej komory (fytotrónu) (Obrázok 3):
 - fotoperiódá: 14 - 16 h svetlo / 8 - 10 h tma,
 - intenzita osvetlenia: 150 - 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fotosynteticky aktívneho žiarenia (PAR)

- teplota: 20 - 25 °C počas dňa, 16 - 20 °C počas noci,
- vlhkosť: 40 - 70 % RH podľa zariadenia.

Poznámka:

- Podmienky musia zostať počas celého experimentu stabilné, aby sa minimalizovala environmentálna variabilita, ktorá by mohla ovplyvniť biochemické analýzy.
- Fotoperiódou a teplotou musia byť upravené podľa požiadaviek konkrétneho rastlinného druhu (vyššie uvedené podmienky sú príkladom pre jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* L.)).



Obrázok 3: Pestovanie rastlín v kontrolovaných podmienkach rastovej komory (autor Š. Kaňuková).

Rastliny sú umiestnené v klimaticky regulovanom priestore s definovanou fotoperiódou, teplotou a intenzitou osvetlenia, čo zabezpečuje homogénne podmienky počas celého experimentu.

4.1.2 Aplikácia stresu suchom

1. Rozdelenie rastlín do experimentálnych variantov

- Rastliny sa po vzídení rozdelia do dvoch základných experimentálnych skupín:
 - kontrola (well-watered, WW)
 - stres suchom (drought stress, DS)
- Pre každý variant sa pripravujú minimálne tri biologické opakovania.

Poznámka: Rovnaký počet rastlín v jednotlivých variantoch je nevyhnutný pre štatistickú porovnateľnosť.

2. Aplikácia stresového faktora suchom

- Experiment sa začína vo vybranom rastovom štádiu rastliny (napr. štádium 1. listu).
- V kontrolnom variante sa substrát udržiava rovnomerne vlhký, bez výkyvov.
- V stresovom variante sa zálievka obmedzí, aby došlo k postupnému zníženiu dostupnosti vody.

Odporúčaná všeobecný postup:

- V prípade kontroly udržiavať optimálnu vlhkosť substrátu (napr. 30 - 50 % VWC - Volumetric Water Content = objemová vlhkosť pôdy/substrátu).
- Pri strese je potrebné ponechať vlhkosť substrátu klesnúť do definovaného stresového rozsahu (napr. 10 - 25 % VWC - Volumetric Water Content = objemová vlhkosť pôdy/substrátu).

Poznámka:

- Kategórie vodného stresu (podľa Brahmi a kol., 2023):
 - mierny stres: okolo 50 % FC (field capacity)
 - stredný stres: 30 - 35 % FC
 - silný stres: pod 20 % FC

Konkrétne hodnoty vlhkosti sa líšia podľa druhu rastliny, typu substrátu, podmienok kultivácie a experimentálnych požiadaviek.

3. Monitorovanie vlhkosti substrátu

- Vlhkosť sa monitoruje denne pomocou:
 - senzorov pôdnej vlhkosti,
 - alebo gravimetrickou metódou (váženie nádob).
- Každý deň sa zaznamená:
 - hodnota VWC (%),
 - množstvo doplnenej vody (ak bolo potrebné),
 - čas merania.
- Zálievka sa prispôsobuje tak, aby bol zachovaný rozdiel medzi kontrolou a stresom.

Poznámka: Gravimetrická metóda je lacná, ale menej presná (zvyšujúca sa hmotnosť rastlín skresľuje skutočnú hodnotu vlhkosti pôdy). Pri biochemických analýzach sa odporúča používať senzorické meranie.

4. Doba trvania stresového podnetu

- Stres sa udržiava počas predom definovaného obdobia (napr. 3 - 14 dní), podľa účelu experimentu.
- Rastliny v jednotlivých variantoch sú rozmiestnené v náhodnom usporiadaní, aby sa minimalizoval vplyv podmienok prostredia (napr. rozdiely v svetelných či teplotných pomeroch).

Poznámka: Dĺžka stresu ovplyvňuje intenzitu akumulácie prolínu, MDA aj degradáciu pigmentov. Musí byť rovnaká pre všetky varianty.

5. Ukončenie experimentu a odber listov pre analýzy

- Odber rastlinného materiálu sa vykonáva, keď rastliny dosiahnu požadovaný stupeň stresovej odozvy (napr. viditeľný pokles turgoru alebo definovanú vlhkosť substrátu), a to aj vo viacerých termínoch, aby bolo možné sledovať dynamiku zmien (Obrázok 4).
 - Odber listov sa vykonáva:
 - v rovnakom dennom čase,
 - z rovnakej pozície na rastline,
 - za rovnakých svetelných podmienok.
- Odobraté listy sa okamžite zmrazia v tekutom dusíku a uskladnia pri -80°C .

Poznámka: Koncentrácia MDA, prolínu aj fotosyntetických pigmentov sa menia v závislosti od teploty, svetla a hydratácie → okamžité zmrazenie je nevyhnutné.

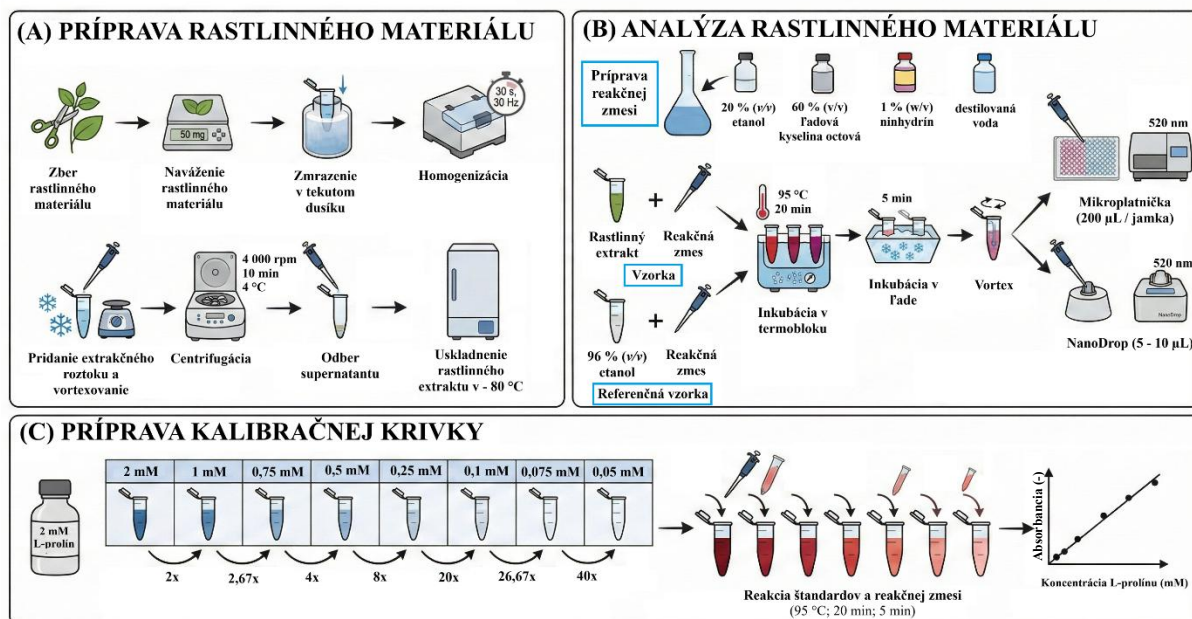


Obrázok 4: Morfológické rozdiely medzi rastlinami pestovanými pri dostatočnej dostupnosti vody a rastlinami vystavenými stresu suchom (autor Š. Kaňuková).

Popis: Vľavo: rastliny pestované pri obmedzenom prísune vody vykazujúce redukovaný rast. Vpravo: rastliny pestované pri pravidelnej a dostatočnej závlahovej dávke (kontrolný variant).

4.2 Stanovenie obsahu prolínu v listoch

Stanovenie voľného prolínu vychádza z kolorimetrickej reakcie prolínu s ninhydrínom v kyslom prostredí podľa Bates a kol. (1973) (Obrázok 5). Pri inkubácii reakčnej zmesi pri 95°C vzniká špecifický červenofialový komplex prolín - ninhydrín, ktorého intenzita je priamo úmerná koncentrácii prolínu v rastlinnom pletive. Po krátkom ochladení sa reakčný produkt meria spektrofotometricky pri 520 nm. Kvantifikácia prebieha pomocou kalibračnej krivky pripravených štandardných roztokov L-prolínu. Metóda je široko používaná na hodnotenie akumulácie prolínu pri abiotických stresoch a umožňuje presné porovnanie medzi genotypmi a experimentálnymi podmienkami.



Obrázok 5: Schematické znázornenie stanovenia prolínu podľa modifikovanej metódy Bates a kol. (1973) (vytvorené pomocou BioRender).

- (A) Príprava rastlinného extraktu: Naváženie čerstvého rastlinného materiálu, kryogénna homogenizácia v tekutom dusíku, extrakcia v 96 % etanole, nasledovaná centrifugáciou za studena na získanie číreho supernatantu obsahujúceho voľný prolín.
- (B) Analýza rastlinného extraktu: Pridanie extraktu k ninhydrínovej reakčnej zmesi v kyslom prostredí, inkubácia pri 95 °C s tvorbou červenofialového komplexu prolín–ninhydrín, následné ochladenie reakcie a meranie absorbancie pri 520 nm na mikroplošnom readeri alebo spektrofotometri NanoDrop.
- (C) Príprava kalibračnej krivky: Príprava štandardných roztokov L-prolínu, inkubácia podľa rovnakého postupu ako pri analyzovaných vzorkách, meranie absorbancií pri 520 nm a príprava kalibračnej krivky na kvantitatívne stanovenie prolínu v analyzovaných extraktoch.

4.2.1 Príprava rastlinného extraktu

1. Z čerstvého rastlinného materiálu sa naváži 50 mg mladých listov (bez hlavnej žilnatiny) do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky.

Poznámka: Na zabezpečenie porovnateľnosti výsledkov sa odporúča odberať listy z plne vyvinutého listu a v rovnakej pozícii na rastline (napr. druhý až tretí list od vrcholu).

2. Skúmavka so vzorkou sa krátkodobo ponorí do tekutého dusíka a následne sa vzorka homogenizuje v prístroji TissueLyser počas 30 s pri maximálnej frekvencii (30 Hz).

Poznámka:

- V prípade nedostatočnej homogenizácie je možné postup zopakovať po opätovnom ochladení vzorky v tekutom dusíku.

- *Homogenizácia pri kryogénnych podmienkach zabezpečuje efektívne rozrušenie rastlinného pletiva a minimalizuje enzymatickú degradáciu nízkomolekulových metabolitov.*
3. K homogenizovanému rastlinnému materiálu sa pridá 500 μL 96 % (v/v) etanolu a vzorka sa dôkladne premieša vortexovaním, aby sa zabezpečil prechod rozpustných zložiek do extrakčného roztoku.
***Poznámka:** Počas celej extrakcie musia byť vzorky uchovávané pri teplote $\leq 4^\circ\text{C}$ alebo na ľade.*
 4. Vzorky sa centrifugujú počas 10 min pri 4 000 rpm a teplote 4°C .
***Poznámka:** Pred začatím centrifugácie musí byť centrifúga vychladená na teplotu 4°C .*
 5. Po centrifugácii sa supernatant opatrne prenesie do novej mikrocentrifugačnej skúmavky pomocou automatickej pipety, pričom sa zabráni nasatiu sedimentu.
 6. Pripravený supernatant sa použije priamo na stanovenie obsahu prolínu alebo sa rozdelí na alikvoty, ktoré sa zmrazia v tekutom dusíku a skladujú pri teplote -80°C .
***Poznámka:** Každý alikvot sa rozmrazuje výlučne raz.*

4.2.2 Stanovenie obsahu prolínu

Príprava reakčnej zmesi pre stanovenie prolínu:

1. Do odmerného valca s objemom 50 ml sa pripraví reakčná zmes postupným odmeraním:
 - 10 ml 96 % (v/v) etanolu - pre dosiahnutie konečnej koncentrácie 20 % (v/v),
 - 30 ml ≥ 99 % (v/v) ľadovej kyseliny octovej - pre dosiahnutie konečnej koncentrácie 60 % (v/v),
 - 0,5 g ninhydrínu - čo zodpovedá konečnej koncentrácii 1 % (w/v) pri celkovom objeme 50 ml.

Upozornenie:

- *Ninhydrín je dráždivá chemikália (H315, H319, H335), ktorá môže spôsobiť podráždenie kože a zafarbenie pokožky. Pri manipulácii je potrebné používať ochranné rukavice, okuliare a pracovať v digestore, najmä počas zahrievania reakčnej zmesi.*
 - *Kyselina octová (≥ 99 %) je horľavá látka a spôsobuje poleptanie kože a očí; pri manipulácii je potrebné používať rukavice, okuliare a pracovať v digestore.*
2. Po pridaní jednotlivých zložiek sa objem doplní destilovanou vodou na 50 ml a zmes sa dôkladne premieša, až kým sa nevytvorí homogénny roztok.

Poznámka:

- *Celkový objem reakčnej zmesi je 50 ml, čo postačuje približne na 50 vzoriek pri použití 1 ml reakčnej zmesi na jednu vzorku.*
- *Všetky roztoky, pokiaľ nie je uvedené inak, sa pripravujú čerstvé v deň analýzy, chránia sa pred priamym svetlom a uchovávajú sa pri laboratórnej teplote.*

Stanovenie prolínu:

1. Do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky sa pomocou automatickej pipety pridá 500 μL rastlinného extraktu a 1 ml pripravenej reakčnej zmesi.
2. V prípade referenčnej vzorky je potrebné pripraviť zmes 500 μL 96 % (v/v) etanolu a 1 ml pripravenej reakčnej zmesi.

Poznámka: Referenčná (slepá) vzorka (blank) sa pripravuje na účely korekcie pozadia reakcie. Obsahuje rovnaké objemy rozpúšťadla a reakčnej zmesi ako analyzovaná vzorka, avšak neobsahuje rastlinný extrakt ani prolín. Meranie absorbie analyzovaných vzoriek oproti referenčnej vzorke umožňuje eliminovať pozadie reagentov (rozpúšťadla) k celkovej absorpcii a zabezpečuje, že nameraná hodnota zodpovedá výlučne reakcii prolínu s ninhydrínom.

3. Skúmavky sa ihneď uzavrujú, zhomogenizujú pomocou vortexu a inkubujú sa vo vriacom vodnom kúpeli alebo v termobloku (95 °C) počas 20 min.

Poznámka: Počas inkubácie prebieha reakcia prolínu s ninhydrínom, ktorá je sprevádzaná vznikom červeného až červenofialového sfarbenia reakčnej zmesi; intenzita sfarbenia je priamo úmerná obsahu prolínu vo vzorke.

4. Po ukončení inkubácie sa skúmavky ihneď vyberú z vodného kúpeľa alebo termobloku a okamžite sa preniesú do nádoby s ľadom, kde sa ochladzujú počas 5 min.

Poznámka:

- Okamžité ochladenie je nevyhnutné na zastavenie reakcie prolínu s ninhydrínom. Oneskorené ochladenie môže viesť k pokračovaniu reakcie a k nadhodnoteniu nameranej absorbie.
- Všetky vzorky musia byť ochladzované rovnaký čas, aby sa zabezpečila porovnateľnosť výsledkov.

5. Po ochladení sa reakčné zmesi krátko premiešajú a z každej skúmavky sa pomocou automatickej pipety odoberie:

- 200 μL reakčnej zmesi do jamiek mikrotitračnej platne v prípade merania na mikroplošničkovom spektrofotometri, alebo
- 5 - 10 μL reakčnej zmesi v prípade merania na NanoDrop spektrofotometri.

Poznámka:

- Pre každú vzorku sa odporúča pripraviť minimálne dve technické opakovania.
- Pri pipetovaní je potrebné zabezpečiť, aby v odoberanom objeme neboli prítomné vzduchové bubliny, ktoré môžu ovplyvniť presnosť merania.

6. Absorbancia reakčných zmesí sa meria pri vlnovej dĺžke 520 nm pomocou spektrofotometra alebo mikroplošničkového reader oproti referenčnej (slepej) vzorke.

Poznámka:

- Pri absorbciiach vyšších ako 1,0 môže dôjsť k narušeniu lineárnej závislosti medzi koncentráciou a absorpciou v dôsledku vplyvu rozptýleného (stray) svetla. Preto je potrebné takéto vzorky zriediť 96 % (v/v) etanolom, aby ich absorbancia bola nižšia než 1,0 (Simonian a Smith, 2006).

- Pred meraním sa odporúča skontrolovať čistotu optickej dráhy a odstrániť prípadné nečistoty.
- Merania sa vykonávajú pri laboratórnej teplote a za rovnakých podmienok pre všetky vzorky.

Príprava kalibračnej krivky štandardov L-prolínu

- Pracovné štandardy uvedené v Tabuľke 1 sa pripravujú riedením 2 mM zásobného roztoku L-prolínu do 1,5 ml mikrocentrifugačných skúmaviek. Ako rozpúšťadlo pre riedenie zásobného roztoku sa používa 96 % (v/v) etanol, ktorý je identický s rozpúšťadlom použitým pri príprave rastlinných extraktov. Celkový objem každého pracovného štandardu je 2 000 μ L (2 ml).

Poznámka: Použitie etanolu pri príprave pracovných štandardov zabezpečuje rovnaké reakčné prostredie pre štandardy aj analyzované vzorky počas reakcie s ninhydrínom.

Tabuľka 1: Príprava štandardných roztokov L-prolínu pre prípravu kalibračnej krivky.

Koncentrácia prolínu (mM)	Riedenie	Objem 2 mM zásobného roztoku (μ L)	Objem rozpúšťadla (μ L)
2	1x	2000	0
1	2x	100	100
0,75	2,67x	750	1250
0,5	4x	500	1500
0,25	8x	250	1750
0,1	20x	100	1900
0,075	26,67x	75	1925
0,05	40x	50	1950

- **Postup prípravy štandardov:**

1. Do každej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky sa pomocou automatickej pipety odoberie príslušný objem z 2 mM zásobného roztoku L-prolínu podľa Tabuľky 1.
2. Následne sa do skúmavky doplní potrebný objem rozpúšťadla (96 % (v/v) etanolu) do konečného objemu 2 ml.
3. Každý pripravený štandard sa dôkladne premieša krátkym vortexovaním.

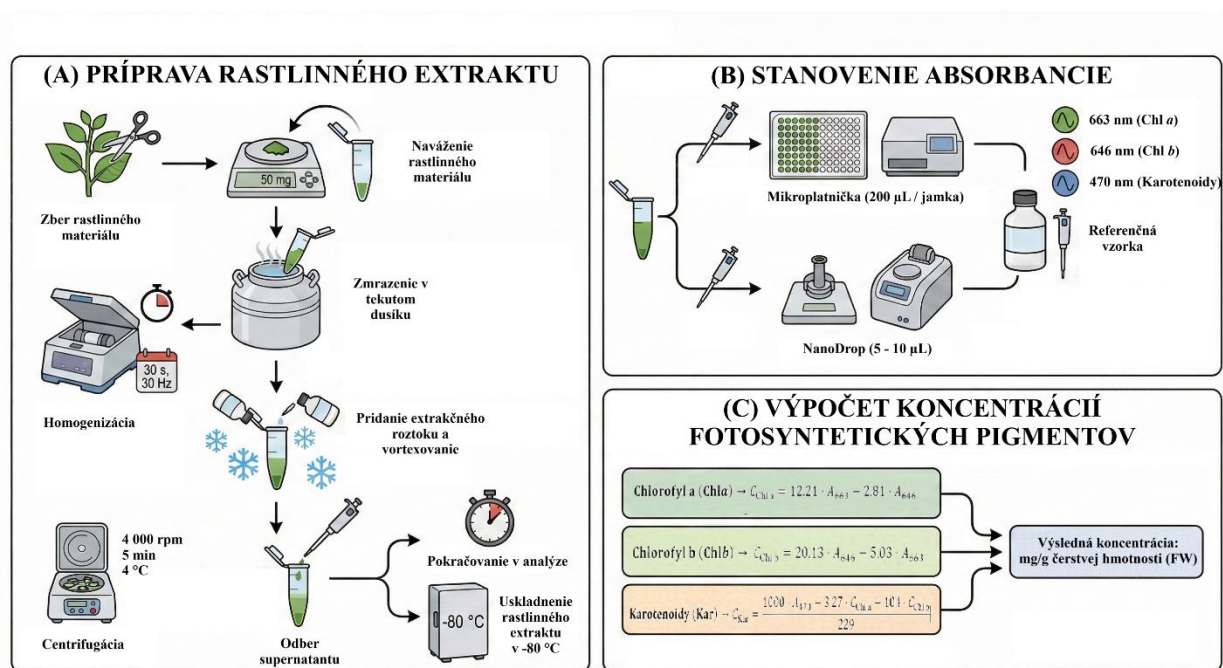
- **Stanovenie absorbancie štandardov:**

1. Do každej skúmavky sa pomocou automatickej pipety odoberie 500 μ L príslušného pracovného štandardu L-prolínu. Následne sa do každej skúmavky pridá 1 ml pripravenej reakčnej zmesi.

2. Skúmavky sa ihneď uzavru a jemne premiešajú krátkym vortexovaním alebo opatrným preklopením.
***Poznámka:** Po pridaní reakčnej zmesi je potrebné postupovať plynulo a v rovnakom poradí, aby sa zabezpečila rovnaká inkubačná doba pre všetky štandardy.*
3. Skúmavky sa umiestnia do vodného kúpeľa alebo termobloku vyhriateho na 95 °C a inkubujú sa počas 20 min.
4. Po ukončení inkubácie sa skúmavky ihneď vyberú a okamžite ochladia na ľade počas 5 min, čím sa reakcia zastaví.
5. Po ochladení sa reakčné zmesi krátko premiešajú a zo štandardov sa následne odoberie:
 - 200 µL reakčnej zmesi do jamiek mikrotitračnej platne v prípade merania na mikropatničkovom spektrofotometri,
 - alebo 5 - 10 µL reakčnej zmesi v prípade merania na NanoDrop spektrofotometri.
6. Absorbancia jednotlivých štandardov sa meria pri 520 nm oproti referenčnej (slepej) vzorke.

4.3 Stanovenie obsahu fotosyntetických pigmentov v listoch

Stanovenie fotosyntetických pigmentov je založené na extrakcii chlorofylu a, chlorofylu b a karotenoidov v 80 % (v/v) acetóne a následnom spektrofotometrickom meraní ich absorbancie pri charakteristických vlnových dĺžkach podľa Lichtenthaler & Wellburn (1983). Chlorofyl *a* vykazuje absorpčné maximum pri 663 nm, chlorofyl *b* pri 646 nm a karotenoidy absorbujú najintenzívnejšie v oblasti 470 nm. Merania sa realizujú voči slepej (referenčnej) vzorke obsahujúcej 80 % (v/v) acetón, pričom absorbancia po odčítaní blanku slúži na výpočet koncentrácie jednotlivých pigmentov. Metóda predstavuje rýchly a spoľahlivý postup na hodnotenie stavu fotosyntetického aparátu a fyziologických reakcií rastlín na environmentálne stresové podmienky. Grafické znázornenie celého postupu, vrátane prípravy rastlinného extraktu, merania absorbancie a výpočtu koncentrácií pigmentov, je uvedené na Obrázku 6.



Obrázok 6: Schéma stanovenia fotosyntetických pigmentov podľa modifikovanej metódy Lichtenthaler & Wellburn (1983) (vytvorené pomocou BioRender).

- (A) Príprava rastlinného extraktu: Homogenizácia listového pletiva, prídanie 80 % (v/v) acetónu, centrifugácia a získanie číreho supernatantu obsahujúceho fotosyntetické pigmenty.
- (B) Stanovenie absorbancie: Prenesenie supernatantu na NanoDrop alebo mikroplošnice a meranie absorbancie pri 663 nm, 646 nm a 470 nm voči 80 % (v/v) acetónu ako blanku.
- (C) Výpočet koncentrácií fotosyntetických pigmentov: Výpočet koncentrácie chlorofylu a, chlorofylu b a karotenoidov pomocou rovníc podľa Lichtenthaler & Wellburn (1983).

4.3.1 Príprava rastlinného extraktu

1. Z čerstvého rastlinného materiálu sa naváži 50 mg mladých listov (bez hlavnej žilnatiny) do 1,5 ml mikrocetifugačnej skúmavky.

Poznámka: Na zabezpečenie porovnateľnosti výsledkov sa odporúča odoberať listy z plne vyvinutého listu a v rovnakej pozícii na rastline (napr. druhý až tretí list od vrcholu).

2. Skúmavka so vzorkou sa krátkodobo ponorí do tekutého dusíka a následne sa vzorka homogenizuje v prístroji TissueLyser počas 30 s pri maximálnej frekvencii (30 Hz).

Poznámka:

- V prípade nedostatočnej homogenizácie je možné postup zopakovať po opätovnom ochladení vzorky v tekutom dusíku.
- Homogenizácia pri kryogénnych podmienkach zabezpečuje efektívne rozrušenie rastlinného pletiva a minimalizuje enzymatickú degradáciu nízkomolekulových metabolitov.

3. K homogenizovanému rastlinnému materiálu sa pridá 1500 μL 80 % (v/v) acetónu a vzorka sa dôkladne premieša vortexovaním, aby sa zabezpečil prechod rozpustných zložiek do extrakčného roztoku.

Poznámka: Počas celej extrakcie musia byť vzorky uchovávané pri teplote $\leq 4^\circ\text{C}$ alebo na ľade.

4. Vzorky sa centrifugujú počas 5 min pri 4 000 rpm a teplote 4°C .

Poznámka: Pred začatím centrifugácie musí byť centrifúga vychladená na teplotu 4°C .

5. Po centrifugácii sa supernatant opatrne preniesie do novej mikrocentrifugačnej skúmavky pomocou automatickej pipety, pričom sa zabráni nasatiu sedimentu.

6. Pripravený supernatant sa použije priamo na stanovenie obsahu fotosyntetických pigmentov alebo sa rozdelí na alikvoty, ktoré sa zmrazia v tekutom dusíku a skladujú pri teplote -80°C .

Poznámka: Každý alikvot sa rozmrazuje výlučne raz.

4.3.2 Stanovenie obsahu fotosyntetických pigmentov

1. Po centrifugácii sa z pripraveného extraktu odoberie:
 - 200 μL reakčnej zmesi do jamiek mikrotitračnej platne v prípade merania na mikroplošničkovom spektrofotometri,
 - alebo 5 - 10 μL reakčnej zmesi v prípade merania na NanoDrop spektrofotometri.
2. Absorbancia sa meria na spektrofotometri pri vlnových dĺžkach charakteristických pre jednotlivé pigmenty:
 - 663 nm - absorpčné maximum chlorofylu *a*,
 - 646 nm - absorpčné maximum chlorofylu *b*,
 - 470 nm - oblasť dominantnej absorpcie karotenoidov.

Pred meraním každej vzorky je potrebné:

- pri meraní na mikroplošničkovom readeri je referenčnou vzorkou samotný 80 % (v/v) acetón v rovnakom objeme ako analyzované vzorky a merania sa vykonávajú voči tejto referencii (blanku).
- Pri meraní na prístroji NanoDrop sa pred meraním vykoná nulovanie absorbancie pomocou 80 % (v/v) acetónu a následne sa merajú analyzované vzorky.

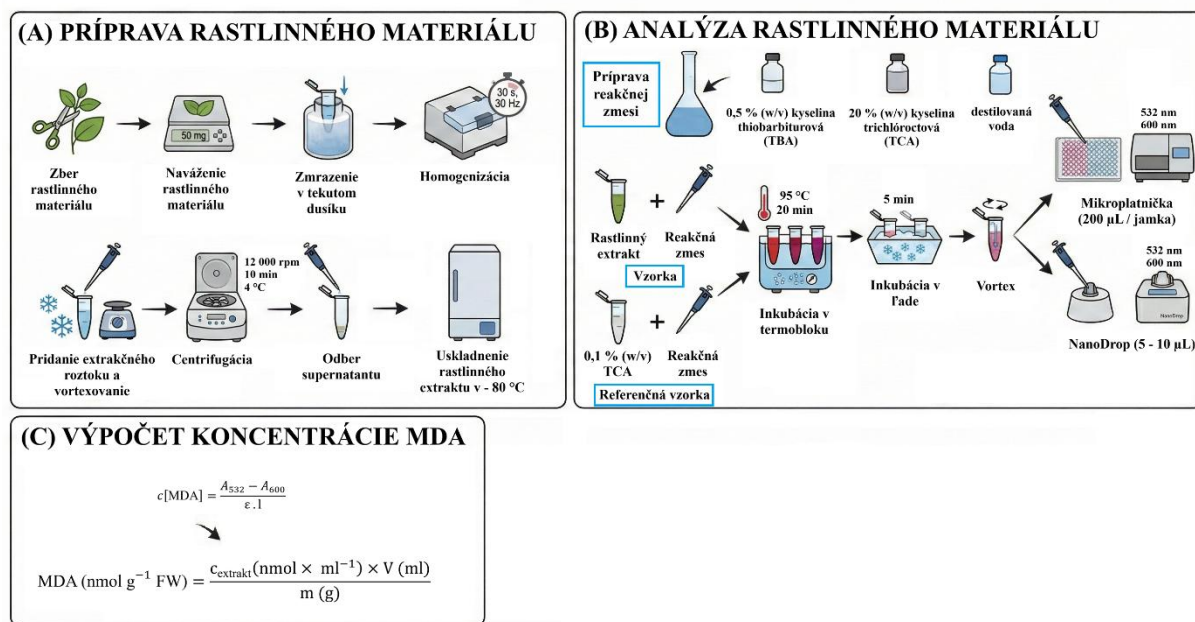
Poznámka:

- Vzorky musia byť počas merania chránené pred svetlom, aby sa zabránilo degradácii pigmentov.
- Pri absorbanciách vyšších ako 1,0 môže dôjsť k narušeniu lineárnej závislosti medzi koncentráciou a absorbanciou v dôsledku vplyvu rozptýleného svetla. Preto je potrebné takéto vzorky zriediť 80 % (v/v) acetónom a meranie

zopakovať. Cieľom je dosiahnuť aby absorbancia meraných vzoriek bola nižšia než 1,0 (Simonian a Smith, 2006).

4.4 Stanovenie obsahu malondialdehydu (MDA) - TBARS metódou

Stanovenie malondialdehydu (MDA) vychádza z TBARS metódy podľa Heath & Packer (1968) používanej na hodnotenie lipidovej peroxidácie v rastlinnom pletive (Obrázok 7). Pri reakcii MDA s kyselinou tiobarbiturovou (TBA) v kyslom prostredí vzniká ružovo-červený MDA-TBA komplex, ktorého intenzita po inkubácii pri 95 °C koreluje s množstvom MDA vo vzorke. Absorbancia sa meria spektrofotometricky pri 532 nm, pričom korekcia zákalu sa vykonáva odčítaním absorbancie pri 600 nm. Koncentrácia MDA sa vypočíta z korigovanej absorbancie pomocou extinkčného koeficientu $155 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Metóda predstavuje štandardný postup hodnotenia oxidačného stresu v listoch rastlín.



Obrázok 7: Schematické znázornenie stanovenia obsahu malondialdehydu (MDA) v rastlinnom pletive (vytvorené pomocou BioRender).

- (A) Príprava rastlinného extraktu: Homogenizácia listového pletiva, pridanie 0,1 % TCA, centrifugácia a získanie číreho supernatantu s obsahom MDA.
- (B) Stanovenie absorbancie: Zmiešanie supernatantu s TBA reagensiou, inkubácia pri 95 °C a meranie absorbancie MDA-TBA komplexu pri 532 nm s odčítaním hodnoty pri 600 nm.
- (C) Výpočet koncentrácie MDA: Výpočet koncentrácie MDA z rozdielu absorbancií A_{532} - A_{600} pomocou extinkčného koeficientu $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.4.1 Príprava reagentov pre stanovenie MDA

- **Príprava 100 ml 0,1 % (w/v) TCA (extrakčný roztok)**

1. Odváži sa 0,1 g TCA (kyselina trichlóroctová).

2. Prenesie sa do 100 ml odmernej banky.
3. Roztok sa doplní destilovanou vodou po značku (100 ml) a premieša.
4. Uchováva sa pri 4 °C maximálne niekoľko dní.

Poznámka: TCA je žieravina preto je nevyhnutné pri manipulácii používať rukavice, ochranné okuliare a pracovať v digestore.

- **Príprava 100 ml TBA reagencie (0,5 % (w/v) TBA v 20 % (w/v) TCA)**

1. Odváži sa 0,5 g TBA (kyselina thiobarbiturová).
2. Odváži sa 20 g TCA (na prípravu 20 % (w/v) roztoku).
3. Obe zložky sa preniesú do 100 ml kadičky.
4. Pridá sa cca 60 - 70 ml destilovanej vody.
5. Zmes sa zahrieva na magnetickej miešačke pri 60 - 70 °C, až kým sa TBA úplne nerozpustí
6. Po rozpustení sa roztok nechá krátko vychladnúť, následne sa preleje do odmernej banky a doplní sa destilovanou vodou po rysku.
7. Roztok sa premieša, označí a uchováva sa v tmavej fľaši v tme (obalený alobalom).

Poznámky:

- Reagencia sa pripravuje čerstvá pred analýzou (skladovanie max. 1 deň v tme pri 4 °C).
- Roztok musí byť slabo žltý až takmer bezfarebný. Silné sfarbenie znamená degradáciu TBA.
- TBA je látka nestabilná na svetle a TCA je žieravina → pri práci sú nevyhnutné rukavice a okuliare.
- Je potrebné úplné rozpustenie TBA; nerozpustené zvyšky spôsobujú zakalenie vzoriek.
- Reagencia sa uchováva v tme, najlepšie v hnedej fľaši, alebo sa počas práce pokrýva alobalom.

4.4.2 Príprava rastlinného extraktu

1. Z čerstvého rastlinného materiálu sa naváži 50 - 200 mg mladých listov (bez hlavnej žilnatiny) do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky.
2. Skúmavka so vzorkou sa krátkodobo ponorí do tekutého dusíka a následne sa vzorka homogenizuje v prístroji TissueLyser počas 30 s pri maximálnej frekvencii (30 Hz).

Poznámka:

Na zabezpečenie porovnateľnosti výsledkov sa odporúča odoberať listy z plne vyvinutého listu a v rovnakej pozícii na rastline (napr. druhý až tretí list od vrcholu), aby sa minimalizovala biologická variabilita.

- V prípade nedostatočnej homogenizácie je možné postup zopakovať po opätovnom ochladení vzorky v tekutom dusíku.
 - Homogenizácia pri kryogénnych podmienkach zabezpečuje efektívne rozrušenie rastlinného pletiva a minimalizuje enzymatickú degradáciu nízkomolekulových metabolitov.
3. K homogenizovanému rastlinnému materiálu sa pridá 1000 μL 0,1 % (w/v) TCA a vzorka sa dôkladne premieša vortexovaním, aby sa zabezpečil prechod rozpustných zložiek do extrakčného roztoku.
Poznámka: Počas celej extrakcie musia byť vzorky uchovávané pri teplote $\leq 4^\circ\text{C}$ alebo na ľade.
 4. Vzorky sa centrifugujú počas 10 min pri 12 000 rpm a teplote 4°C .
Poznámka: Pred začatím centrifugácie musí byť centrifúga vychladená na teplotu 4°C .
 5. Po centrifugácii sa supernatant opatrne preniesie do novej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky pomocou automatickej pipety, pričom sa zabráni nasatiu sedimentu.
 6. Pripravený supernatant sa použije priamo na stanovenie obsahu MDA alebo sa rozdelí na alikvoty, ktoré sa zmrazia v tekutom dusíku a skladujú pri teplote -80°C .
Poznámka: Každý alikvot sa rozmrazuje výlučne raz.

4.4.3 Stanovenie obsahu MDA

Príprava reakčnej zmesi a referenčnej vzorky

1. Do čistej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky sa napipetuje 500 μL supernatantu získaného z extrakcie listového pletiva a 1 ml TBA reagensie pripravenej z 0,5 % (w/v) TBA v 20 % (w/v) TCA.
2. V prípade referenčnej vzorky sa do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky napipetuje 500 μL 0,1 % (w/v) TCA a 1 ml TBA reagensie.
3. Obsah skúmavky sa dôkladne premieša vortexovaním, aby sa dosiahla homogénna zmes supernatantu s TBA.
Poznámka:
 - Referenčná (slepá) vzorka (blank) sa používa na odčítanie pozadia absorbancie reagensii, aby bol meraný signál priradený výhradne MDA-TBA komplexu.
 - Používa sa pri nulovaní spektrofotometra (NanoDrop) alebo sa pipetuje do osobitnej jamky pri meraní na mikroplatničkovom readeri.
 - Blank musí byť pripravený v rovnakých objemoch a rovnakým postupom ako analyzované vzorky.

Stanovenie obsahu MDA

1. Skúmavky sa umiestnia do predhriateho termobloku alebo vodného kúpeľa a inkubujú sa 20 min pri 95°C .

Poznámka:

- Počas inkubácie prebieha reakcia medzi MDA a TBA za vzniku stabilného ružovo-červeného MDA-TBA komplexu.
 - Je dôležité, aby boli skúmavky ponorené rovnomerne, čím sa zabezpečí konzistentný ohrev všetkých vzoriek.
2. Po ukončení inkubácie sa skúmavky okamžite prenesú na ľad alebo do stojanu uloženého v ľade.
 3. Inkubácia prebieha po dobu minimálne 5 minút, s cieľom pozastavenia reakcie medzi MDA a TBA.

Poznámka: Tento krok je kritický, pretože nadmerná post-reakčná inkubácia môže viesť k tvorbe nešpecifických produktov a nadhodnoteniu výsledkov.

4. Meranie absorbancie možno vykonať dvoma spôsobmi:

a) Mikroplatničkový reader

1. Do jamky 96-jamkovej UV-transparentnej platničky sa napipetuje 200 μ L supernatantu z každej vzorky.
2. Do samostatnej jamky sa pipetuje 200 μ L blanku (0,1 % TCA + TBA).

b) NanoDrop spektrofotometer

1. Meranie sa vykonáva v režime absorbancie.
2. Prístroj sa najskôr “vynuluje” pomocou blanku.
3. Na meraciu plochu sa pipetuje vzorka a absorbancia sa odčíta priamo.

• **Merané vlnové dĺžky**

- **532 nm** - maximálna absorbancia MDA-TBA komplexu
- **600 nm** - korekcia zákalu spôsobeného nerozpustnými časticami alebo vlastnou absorbanciou reagensov

Poznámka:

- Ak absorbancia vzorky presiahne hodnotu 1,0, vzorka sa musí zriediť v 0,1 % TCA, pretože pri vysokých hodnotách absorbancie dochádza k porušeniu linearita merania v dôsledku rozptýleného svetla (Simonian & Smith, 2006). Následne je dôležité aby sa pri výpočtoch zohľadnila výsledná hodnota ktorá sa vynásobí riediacim faktorom.
- TBARS metóda nie je špecifická len pre malondialdehyd, pretože kyselina thiobarbiturová môže reagovať aj s ďalšími karbonylovými zlúčeninami a vytvárať nešpecifické TBA-reaktívne produkty. Meranie absorbancie pri 600 nm sa používa na korekciu zákalu a odstránenie interferencií.
- Pre vyššiu špecifitu je možné výsledky TBARS metódy validačne overiť aj pomocou HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).
- Odporúča sa merať vzorky v technických duplikátoch alebo tripplikátoch.

5. Výsledky a ich vyhodnotenie

Pri vyhodnocovaní biochemických analýz je nevyhnutné prepočítať namerané hodnoty absorbancie na zodpovedajúce koncentrácie analyzovaných metabolitov. Absorbancia sama osebe nepredstavuje biologicky interpretovateľnú veličinu, preto sa využívajú špecifické výpočtové postupy pre každú analytickú metódu. V tejto kapitole sú uvedené prepočty pre stanovenie prolínu, fotosyntetických pigmentov a malondialdehydu (MDA), pričom výsledné koncentrácie sú normalizované na jednotku čerstvej hmotnosti (FW), aby boli porovnateľné medzi jednotlivými vzorkami a podmienkami. Výpočty tvoria základ pre následnú štatistickú analýzu a interpretáciu stresovej odozvy rastlín.

5.1 Výpočty

5.1.1 Stanovenie prolínu - výpočet koncentrácie z kalibračnej krivky

Koncentrácia prolínu v rastlinných vzorkách sa stanovuje na základe kalibračnej krivky pripravenej zo štandardných roztokov L-prolínu. Kalibračné body (absorbancia štandardov pri 520 nm voči referenčnej vzorke) sa spracujú v programe MS Excel, kde sa zostrojí graf závislosti absorbancie od koncentrácie prolínu. Na namerané dáta sa následne aplikuje lineárna regresia so zobrazením rovnice priamky a koeficientu determinácie R^2 . Príklad kalibračnej krivky získanej týmto postupom je uvedený na Obrázok 8. V uvedenom príklade je regresná rovnica kalibračnej krivky:

$$y = ax + b$$

$$y = 0,4003x - 0,0049; R^2 = 0,9997$$

kde:

- y predstavuje absorbanciu meranú pri 520 nm (bezrozmerná veličina),
- x predstavuje koncentráciu prolínu v štandarde (mM),
- **0,4003** je smernica regresnej priamky (zmena absorbancie na jednotku koncentrácie),
- **- 0,0049** je intercept (odhadovaná absorbancia pri nulovej koncentrácii; odchýlka súvisiaca s pozadím merania).

Koncentrácia prolínu v neznámej vzorke sa následne vypočíta dosadením nameranej absorbancie analyzovanej vzorky A_{520} do regresnej rovnice a algebraickým vyjadrením x :

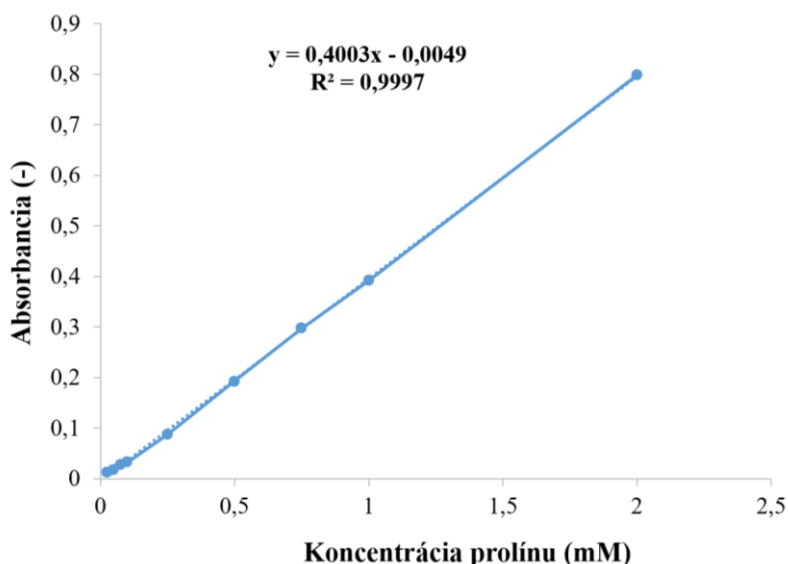
$$c_{\text{vzorka}} = \frac{A_{520} - b}{a}$$

kde:

- c_{vzorka} je koncentrácia prolínu vo vzorke (mM),
- A_{520} je absorbancia analyzovanej vzorky pri 520 nm korigovaná o blank,
- a je smernica kalibračnej priamky (v príklade $a = 0,4003$)
- b je intercept (v príklade $b = - 0,0049$).

Ak bola vzorka pred meraním riedená, výsledná koncentrácia sa upraví o riediaci faktor DF :

$$c_{\text{neriedenej vzorky}} = c_{\text{riedenej vzorky}} \times DF$$



Obrázok 8: Kalibračná krivka L-prolínu zostrojená v programe MS Excel na základe merania absorbancie pri 520 nm.

Zobrazená je lineárna regresia so smernicou a interceptom regresnej rovnice a koeficientom determinácie R^2 . Regresná rovnica sa používa na výpočet koncentrácie prolínu v analyzovaných vzorkách z nameranej absorbancie.

5.1.2 Stanovenie fotosyntetických pigmentov - výpočet koncentrácií z absorbancií

Koncentrácia fotosyntetických pigmentov (chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a karotenoidy) sa stanovuje spektrofotometricky na základe merania absorbancie acetónového extraktu pri troch vlnových dĺžkach 663 nm, 646 nm a 470 nm. Absorbancie sa do výpočtu vždy dosadzujú po odčítaní referenčnej (blank) vzorky, ktorá obsahuje iba 80 % (v/v) acetón. Výpočet pigmentov sa vykonáva pomocou rovníc podľa Lichtenthaler & Wellburn (1983), ktoré umožňujú simultánne stanovenie chlorofylov a karotenoidov z jedného extraktu.

$$\text{Chlorofyl a (Chl } a) \rightarrow C_{\text{Chl } a} = 12.21 \cdot A_{663} - 2.81 \cdot A_{646}$$

$$\text{Chlorofyl b (Chl } b) \rightarrow C_{\text{Chl } b} = 20.13 \cdot A_{646} - 5.03 \cdot A_{663}$$

$$\text{Karotenoidy (Kar)} \rightarrow C_{\text{Kar}} = \frac{1000 \cdot A_{470} - 3.27 \cdot C_{\text{Chl } a} - 104 \cdot C_{\text{Chl } b}}{229}$$

kde:

- A_{663} , A_{646} , A_{470} - absorbancia extraktu pri príslušnej vlnovej dĺžke, korigovaná o blank
- $C_{\text{Chl } a}$ - koncentrácia chlorofylu *a* ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ čerstvej hmotnosti)
- $C_{\text{Chl } b}$ - koncentrácia chlorofylu *b* ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ čerstvej hmotnosti)
- C_{Kar} - koncentrácia karotenoidov ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ čerstvej hmotnosti)
- **konštanty (12.21, 2.81, 20.13, 5.03, 1000, 3.27, 104 a 229)** predstavujú extinkčné koeficienty pre 80 % (v/v) acetón, štandardizované podľa Lichtenthaler & Wellburn (1983).

Výsledné koncentrácie pigmentov sa uvádzajú v jednotkách **mg pigmentu · g⁻¹ čerstvej hmotnosti východiskového materiálu** a vzťahujú sa na množstvo rastlinného materiálu použitého pri extrakcii (napr. 50 mg). Ak absorbancia presahuje hodnotu ≥ 2.0 , odporúča sa extrakt zriediť 80 % (v/v) acetónom a meranie zopakovať, aby sa zachovala linearita merania.

5.1.3 Stanovenie MDA - výpočet koncentrácie (TBARS metóda)

Koncentrácia malondialdehydu (MDA), indikátora lipidovej peroxidácie, sa určuje na základe tvorby farebného komplexu MDA - TBA počas zahrievania v kyslom prostredí. Po inkubácii a centrifugácii sa meria absorbancia číreho supernatantu pri 532 nm a 600 nm. Hodnota pri 600 nm slúži na korekciu zákalu a nešpecifickej absorpcie. Pri výpočte sa používajú absorbancie po odčítaní referenčnej (blank) vzorky obsahujúcej 0,1 % TCA + TBA reagensiu.

1. Výpočet špecifickej absorbancie MDA

$$A_{\text{MDA}} = A_{532} - A_{600}$$

kde:

- A_{532} - absorbancia MDA-TBA komplexu,
- A_{600} - absorbancia použitá na korekciu zákalu.

Poznámka:

- *TBARS metóda nie je špecifická len pre malondialdehyd, pretože kyselina thiobarbiturová môže reagovať aj s ďalšími karbonylovými zlúčeninami a vytvárať nešpecifické TBA-reaktívne produkty. Meranie absorbancie pri 600 nm sa používa na korekciu zákalu a odstránenie interferencií.*

2. Výpočet koncentrácie MDA v reakčnej zmesi

$$c[\text{MDA}] = \frac{A_{532} - A_{600}}{\epsilon \cdot l}$$

kde:

- A_{532} - absorbancia MDA-TBA komplexu,
- A_{600} - absorbancia použitá na korekciu zákalu.
- **extinkčný koeficient** ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) pre MDA-TBA komplex (Heath a Packer, 1968)
- **l** - optická dráha kyvety (zvyčajne 1 cm)

Prevod na nmol ml⁻¹

Keďže $1 \text{ mM} = 1000 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$, potom:

$$c_{\text{MDA}} (\text{nmol} \times \text{ml}^{-1}) = c_{\text{MDA}} (\text{mM}) \times 1000$$

Výsledky sa vyjadrujú najčastejšie ako $c_{\text{extrakt}} = \text{nmol MDA} \times \text{ml}^{-1}$.

3. Prepočet na g čerstvej hmotnosti

$$\text{MDA (nmol g}^{-1} \text{ FW)} = \frac{c_{\text{extrakt}} (\text{nmol} \times \text{ml}^{-1}) \times V (\text{ml})}{m (\text{g})}$$

kde:

- **c_{extrakt}** - koncentrácia MDA v extrakte (mM),
- **V** - objem reakčnej zmesi (ml),
- **m** - východisková hmotnosť analyzovaného rastlinného materiálu (g čerstvej hmotnosti).

Následne sa výsledky vyjadrujú ako nmol MDA × g⁻¹ FW (čerstvej hmotnosti). Ak bola vzorka pred meraním riedená, výsledná koncentrácia sa upraví o riediaci faktor *DF*:

$$c_{\text{MDA neriedená}} = c_{\text{MDA riedená}} \times DF$$

5.2 Spracovanie a štatistické vyhodnotenie biochemických údajov

Po dokončení biochemických analýz (prolín, fotosyntetické pigmenty a malondialdehyd (MDA)) sa získané hodnoty absorbancie prepočítajú na koncentrácie analyzovaných metabolitov podľa výpočtových postupov uvedených v príslušných podkapitolách (prolín: kalibračná krivka; fotosyntetické pigmenty: rovnice podľa Lichtenthaler & Wellburn, 1983; MDA: výpočet na základe rozdielu absorbancií pri 532 a 600 nm s použitím extinkčného koeficientu podľa Heath & Packer, 1968). Výsledné hodnoty sa vyjadrujú ako obsah alebo koncentrácia vzťahovaná na gram čerstvej hmotnosti (FW) rastlinného materiálu, čím sa zabezpečí porovnateľnosť medzi vzorkami. Normalizácia je základným predpokladom porovnateľnosti medzi vzorkami a vypočíta sa nasledovne:

$$X_{FW} = \frac{C}{m}$$

kde:

- **C** - koncentrácia analytu v extrakte,
- **m** - hmotnosť použitého rastlinného materiálu (g FW).

Pred aplikáciou štatistických metód sa overia základné predpoklady analýzy. Normalita rozdelenia dát sa testuje pomocou Shapiro - Wilkovho testu a homogenita variancií pomocou Leveneho testu. V prípade odchýlok od normality je vhodné použiť transformácie, najmä logaritmickú transformáciu alebo Box - Cox transformáciu, definovanú rovnicou:

$$Y(\lambda) = \begin{cases} \frac{Y^\lambda - 1}{\lambda}, & \lambda \neq 0 \\ \ln(Y), & \lambda = 0 \end{cases}$$

kde:

- **Y** - pôvodná hodnota analyzovanej premennej (napr. koncentrácia prolínu),
- **Y(λ)** - transformovaná hodnota premennej,
- **λ** - transformačný parameter, ktorého hodnota sa odhaduje s cieľom dosiahnuť čo najlepšie splnenie predpokladov parametrickej analýzy, najmä aproximáciu normality a stabilizáciu variancie,
- **ln(Y)** - prirodzený logaritmus pôvodnej hodnoty (používa sa, ak optimálne λ = 0).

Transformácie stabilizujú varianciu dát a umožňujú použitie parametrických metód.

Na porovnanie kontrolného a stresového variantu sa používa nezávislý dvojvýberový (two-sample) Studentov t-test pri splnení predpokladov normality a homogenity variancií. V prípade nesplnenia týchto predpokladov je vhodné použiť neparametrický Mann-Whitney U test. Pri viacerých genotypoch alebo viacerých faktoroch je možné aplikovať jednofaktorovú (one-way) alebo dvojfaktorovú (two-way) analýzu variancie (ANOVA), ktorá umožňuje posúdiť samostatné aj interakčné efekty stresu a genotypu. Štatisticky významné rozdiely medzi skupinami je vhodné ďalej analyzovať pomocou *post hoc* testov (napríklad Tukey HSD alebo Fisher LSD).

Výsledky sa uvádzajú vo forme priemeru $\pm$ smerodajnej odchýlky (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

kde:

- x_i - jednotlivé hodnoty,
- $\bar{x}$ - aritmetický priemer,
- n - počet opakovaní.

Na identifikáciu vzťahov medzi biochemickými parametrami sa odporúča Pearsonova korelačná analýza (v prípade normálneho rozloženia dát), pričom korelačný koeficient r sa vypočíta ako:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

kde:

- x - hodnoty prvej premennej (napr. obsah prolínu),
- y - hodnoty druhej premennej (napr. obsah MDA),
- $\bar{x}$ - aritmetický priemer všetkých hodnôt premennej x ,
- $\bar{y}$ - aritmetický priemer všetkých hodnôt premennej y ,
- $\sum$ - súčet hodnôt v celom súbore dát.

Hodnoty r blízke $+1$ alebo -1 indikujú silnú pozitívnu alebo negatívnu lineárnu koreláciu. (napr. medzi prolínom a MDA).

Pri práci s komplexnejšími datasetmi je vhodné použiť mnohorozmerné metódy. Pred ich aplikáciou sa premenné štandardizujú pomocou z-score transformácie (Z):

$$Z = \frac{x - \bar{x}}{SD}$$

kde:

- x - pôvodná hodnota analyzovanej premennej (napr. koncentrácia prolínu vo vzorke),
- $\bar{x}$ - aritmetický priemer všetkých hodnôt danej premennej v súbore dát,
- SD - smerodajná odchýlka tejto premennej v súbore dát.

Táto transformácia zabezpečí rovnaký príspevok pre parametre s rôznymi jednotkami a rozsahmi. Analýza hlavných komponentov (PCA) umožňuje identifikovať hlavné zdroje variability a zoskupiť vzorky podľa ich odozvy na stres. Pre komplexnú vizualizáciu je možné využiť hierarchickú klastrovú analýzu (HCA) (napr. použitím Euclidovskej vzdialenosti a Ward metódy), ktorá umožní identifikovať skupiny genotypov s podobnou stresovou odpoveďou a teda s podobným biochemickým profilom.

Na kvantifikáciu rozdielov medzi kontrolou a stresom sa môže vypočítať percentuálna zmena (%Δ):

$$\% \Delta = \frac{(S-K)}{K} \times 100$$

kde:

- **S** - hodnota parametra v stresovej podmienke,
- **K** - hodnota parametra v kontrolnej podmienke.

5.3 Interpretácia biochemických parametrov

Výsledky biochemických analýz je vhodné prezentovať pomocou vhodných grafických výstupov: stĺpcových grafov, boxplotov, PCA diagramov, korelačných máp a heatmap. Tieto formy vizualizácie dopĺňajú numerickú interpretáciu, umožňujú rýchle posúdenie variability medzi genotypmi a zároveň zvyrazňujú rozdiely medzi kontrolnými a stresovými podmienkami. Príklady možností grafického spracovania údajov sú uvedené v kapitole 8. Príloha Obrázok 9 a 10 a Tabuľka 2. Z hľadiska biologickej interpretácie hodnoty získané z jednotlivých analýz poskytujú komplementárne informácie o stave rastlín. Zvýšený obsah prolínu je ukazovateľom osmoregulačných a protektívnych mechanizmov, ktoré sa aktivujú v podmienkach vodného stresu. Pokles koncentrácie fotosyntetických pigmentov odráža narušenie alebo degradáciu fotosyntetického aparátu a môže znamenať zníženú efektivitu využitia svetelnej energie. Zvýšené hladiny MDA sú markerom lipidovej peroxidácie a poukazujú na rozsah oxidačného poškodenia bunkových membrán. Integrované vyhodnotenie týchto troch skupín parametrov umožňuje komplexne charakterizovať odozvu genotypov na stresové podmienky. Kombináciou údajov o osmoregulácii (prolín), stave fotosyntetického aparátu (chlorofyly a karotenoidy) a oxidačnom poškodení (MDA) možno identifikovať tolerantné, intermediárne a citlivé reakčné typy a celkovo zhodnotiť mieru adaptačného potenciálu rastlín. Tieto biochemické ukazovatele tak predstavujú robustné indikátory stresovej fyziológie vhodné na aplikáciu v experimentálnych aj šľachtiteľských programoch.

6. Záver

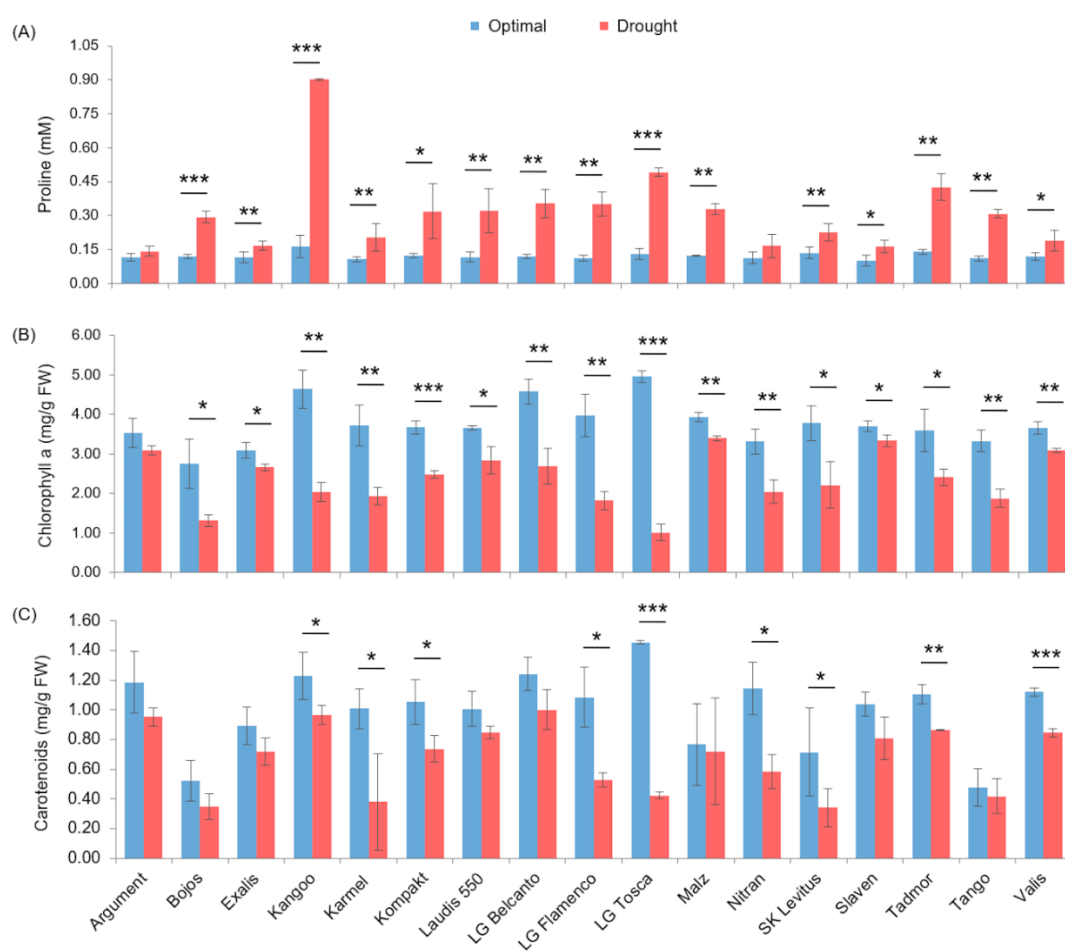
Metodické postupy uvedené v tejto príručke predstavujú ucelený a experimentálne overený rámec pre monitorovanie biochemických reakcií rastlín vystavených vodnému stresu, pričom koncentrácia prolínu, obsah fotosyntetických pigmentov a hladina malondialdehydu tvoria komplementárny súbor ukazovateľov charakterizujúcich osmoregulačné procesy, funkčný stav fotosyntetického aparátu a mieru oxidačného poškodenia bunkových membrán. Jednotlivé protokoly boli formulované tak, aby zabezpečovali jednotné a stabilné podmienky prípravy rastlinného materiálu, extrakcie a spektrofotometrických meraní, čo v spojení s presne definovanými výpočtovými postupmi a odporúčaniami pre štatistické spracovanie údajov umožňuje konzistentné a spoľahlivé hodnotenie sledovaných parametrov. Takto vystavaný rámec podporuje reprodukovateľnosť výsledkov naprieč experimentmi a uľahčuje ich interpretáciu v kontexte genotypovej variability, intenzity stresu a rozdielov medzi experimentálnymi usporiadaniami. Príručka zároveň vytvára priestor na prepojenie biochemických ukazovateľov s ďalšími fyziologickými a molekulárnymi analýzami, čo umožňuje detailnejšiu charakterizáciu mechanizmov spojených s toleranciou rastlín voči suchu a poskytuje vstup pre komplexné hodnotenie ich adaptability v meniacich sa klimatických podmienkach. Integráciou presne opísaných analytických postupov s jasne definovaným rámcom interpretácie výsledkov prispieva k systematickému a transparentnému spracovaniu experimentálnych údajov, ktoré je nevyhnutné pre rozvoj komparatívnych štúdií a dlhodobých výskumov zameraných na sledovanie reakcií rastlín voči stresovým faktorom (nedostatočný prísun vody, zvýšenie salinity pôdy, zvýšenie teploty, atď.).

7. Použitá literatura

1. Bandurska H., Niedziela J., Pietrowska-Borek M., Nuc K., Chadzinikolau T., Radzikowska D. (2017): Regulation of proline biosynthesis and resistance to drought stress in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes of different origin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118: 427 - 437.
2. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973): Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205 - 207.
3. Brahmi W., Ltifi A., Haouala F. (2023): Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Biochemistry & Pharmacology*, 12: 001.
4. Cai K., Chen X., Han Z., Wu X., Zhang S., Li Q., Nazir M.M., Zhang G., Zeng F. (2020): Screening of worldwide barley collection for drought tolerance: the assessment of various physiological measures as the selection criteria. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1159.
5. Frimpong F., Anokye M., Windt C.W., Naz A.A., Frei M., Van Dusschoten D., Fiorani F. (2021): Proline-mediated drought tolerance in the barley (*Hordeum vulgare* L.) isogenic line is associated with lateral root growth at the early seedling stage. *Plants*, 10: 2177.
6. Heath R.L., Packer L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1): 189 - 198.
7. Kaňuková Š., Gubišová M., Hudcovicová M., Gubiš J., Ondreičková K. (2025): Genotypic variation in physiological, biochemical, and transcriptional responses to drought stress in spring barley at an early growth stage. *Plant, Soil and Environment*, 71(12): 905 - 922.
8. Kishor P.B.K., Rajesh K., Reddy P.S., Seiler C., Sreenivasulu N. (2014): Drought stress tolerance mechanisms in barley and its relevance to cereals. In: Kumlehn J., Stein N. (eds.): *Biotechnological Approaches to Barley Improvement*. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 69. Springer, Berlin, Heidelberg.
9. Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. (1983): Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11: 591 - 592.
10. Sallam A., Alqudah A.M., Dawood M.F.A., Baenziger P.S., Börner A. (2019): Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 3137.
11. Samanta S., Seth C.S., Roychoudhury A. (2024): The molecular paradigm of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) with different phytohormone signaling pathways during drought stress in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 206: 108259.
12. Szabados L., Saviouré A. (2009): Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15: 89 - 97.

8. Príloha

Obrázky a tabuľka v kapitole 8. *Príloha* poskytujú ilustračné príklady spracovania a vizualizácie údajov získaných biochemickými analýzami popísanými v tejto metodologickej príručke. Uvedené grafické výstupy slúžia ako referenčné ukážky, ktoré demonštrujú možné formy prezentácie výsledkov, vrátane základných biochemických parametrov a pokročilých mnohorozmerných analýz. Cieľom príloh nie je interpretácia konkrétnych experimentálnych výsledkov, ale podpora používateľa pri výbere možných postupov vizualizácie získaných výsledkov.



Obrázok 9: Biochemické odpovede rastlín na vodný stres (prevzaté z Kaňuková a kol., 2025). **(A)** koncentrácia prolínu v listoch (mM), **(B)** obsah chlorofylu a ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ FW), **(C)** obsah karotenoidov ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ FW) pri 17 genotypov jačmeňa pestovaných v optimálnych (modrá farba) a suchých podmienkach (červená farba).

Poznámka: Údaje sú uvedené ako priemer $\pm$ SD. Hviezdičky označujú štatisticky významné rozdiely medzi ošetreniami na základe dvojvýberového Studentovho *t*-testu alebo Mann-Whitneyho *U* testu (v závislosti od normality a homogenity variancií): $p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$.

Tabuľka 2: Ilustračný príklad výstupu dvojfaktorovej analýzy variancie (Two-way ANOVA) pre hodnotenie efektov Genotypu, Ošetrenia a Interakcie na jednotlivé fyziologické a biochemické parametre pri jačmeni siatom (*Hordeum vulgare* L.) (prevzaté z Kaňuková a kol., 2025).

Parameter	Genotype	Treatment	Genotype × Treatment
RWC	0.2352	< 0.0001	0.9966
Height	< 0.0001	< 0.0001	0.8634
Dry weight	< 0.0001	< 0.0001	0.9877
Proline	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Chlorophyll a	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Carotenoids	< 0.0001	< 0.0001	0.0080

Poznámky:

Názov: Biochemické markery tolerancie sucha u rastlín - Metodická príručka s aplikáciou a validáciou na jačmeň siaty

Autor metodiky: RNDr. Šarlota Kaňuková, PhD.

Autori fotografií: RNDr. Šarlota Kaňuková, PhD.

Obrázky vytvorené pomocou: BioRender.com a Nano Banana Pro

Vydal: Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

Rok vydania: 2026

Počet strán: 38

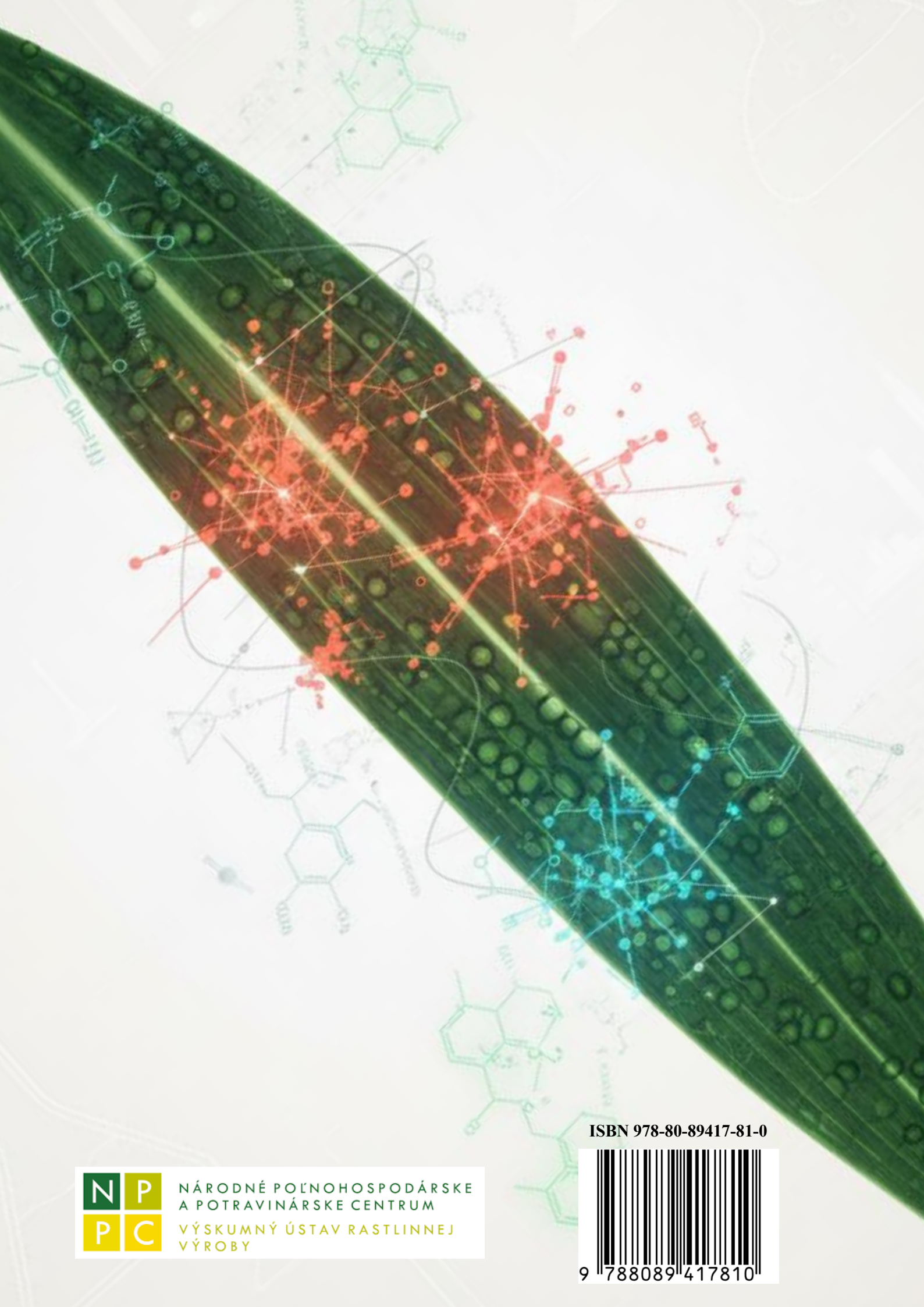
Formát: A4

ISBN 978-80-89417-81-0

Publikácia neprešla jazykovou úpravou

Metodika je nepredajná

Kontakt na autora: sarlota.kanukova@nppc.sk



ISBN 978-80-89417-81-0



NÁRODNÉ POĽNOHOSPODÁRSKE
A POTRAVINÁRSKE CENTRUM
VÝSKUMNÝ ÚSTAV RASTLINNEJ
VÝROBY

