

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Fotoinhibice lišejníků studovaná pomocí rychlého fluorescenčního
indukčního jevu

Vypracovala: Lenka Řiháková

Studijní obor: Molekulární biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Petr Ilík, Ph.D.

Děkuji vedoucímu bakalářské práce, Doc. RNDr. Petru Ilíkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a věnovaný čas během zpracování této práce.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citované literatury.

V Olomouci dne.....

Souhrn:

U lišejníků majících jako fotobionta zelenou řasu *Trebouxia* se ve fluorescenčním indukčním jevu (FIJ) narozdíl od vyšších rostlin objevuje neobvyklá vlna H. Tato vlna není doprovázena změnou redoxního stavu P700. K analýze tohoto neobvyklého průběhu fluorescence chlorofylu bylo použito současné měření FIJ a kinetiky absorpčních změn P700 před a po fotoinhibici za aerobních i anaerobních podmínek. Vlivem fotoinhibice se tato vlna H v FIJ výrazně snižuje, ale toto snížení je vratné po určité době zatemnění stélek lišejníků. K vytvoření této vlny H pravděpodobně dochází díky redukci plastochinonu (PQ) endogenním reduktantem. Z našich výsledků plyne, že existuje souvislost mezi objevením se vlny H v FIJ a funkcí fotosystému II (PSII). Čím je fotochemická funkce PSII lepší, tím je vlna H zřetelnější, z čehož můžeme usuzovat, že zdroj vlny H má původ v elektronech pocházejících z PSII. Z našich výsledků dále plyne, že k vytvoření vlny H ve FIJ dochází, když je P700 oxidovaný a parametr F_v/F_M dosahuje hodnoty minimálně 0,5. Nárůstu do vlny H předchází pokles intenzity fluorescence za vlnou P v FIJ, který pravděpodobně souvisí s aktivací ferredoxin-NADP⁺-oxidoreduktázy (FNR).

Na základě měření FIJ a kinetiky absorpčních změn P700 v anaerobních podmínkách je možné zjistit, jak tyto podmínky ovlivňují redoxní děje na úrovni PSII a PSI. Anaerobní podmínky u lišejníků způsobují inhibici přenosu na akceptorové straně PSI, což je doprovázeno ztrátou poklesu intenzity fluorescence za vlnou P. Anaerobní působení u vyšších rostlin má naopak za následek aktivaci akceptorové strany PSI, což lze vysvětlit aktivací FNR vlivem změny redoxního stavu stromatu chloroplastů. V této práci byla velmi důležitá kombinace měření kinetiky absorpčních změn P700 a FIJ pro studium mechanismu fotoinhibice vyšších a nižších rostlin. Toto současné měření nám umožňuje studovat fotoinhibici rostlin na úrovni tylakoidních membrán.

Abstract:

An unusual step H (compared to higher plant behavior under comparable light condition) in chlorophyll induction (FI) was observed for thalli of lichen species having *Trebouxia* species (the most common symbiotic green alga) as their photobiont. This step H is not accompanied by the changes in redox state of P700. To analyse this unusual behavior we use simultaneous measurement of FI and absorption kinetics of P700 before and after photoinhibition under aerobic and anaerobic treatment. In photoinhibited thalli the step H was markedly reduced but this reduction is reversible during subsequent darkening of thalli of lichens. The step has obviously its origin in reduction of plastoquinon (PQ) by some stromal reductant. We observed that there is a connection between the creation of step H and the function of photosystem II (PSII). The better the function of PSII is, the more this step H is pronounced, which implies that the step H has its origin in the electrons from PSII. We can also conclude that the step H is created as long as the parameter F_V/F_M reaches its minimal value 0,5 and the P700 is in oxidized state. A dip in fluorescence intensity after the step P (before the H step) is probably related to activation of ferredoxin-NADP⁺-oxidoreductase (FNR).

It is possible, by measuring FI and absorption kinetics of P700 under anaerobic treatment, establish how this conditions influence the redox state in the level of PSII and PSI. In lichens anaerobic treatment causes the inhibition of the transmission at acceptor side of PSI which is accompanied by the loss of the dip after the step P. In higher plants anaerobic treatment resulted contrary to lichens in the activation of PSI acceptor side which can be elucidated by the activation of FNR due to changes in redox state of stroma in chloroplasts. The simultaneous measurement of absorption kinetics of P700 and FI is very important to study photoinhibition of higher and lower plants. By this simultaneous measurement we can study photoinhibition of plants on the level of thylakoid membrana.

Seznam použitých zkratk:

ATP	adenosintrifosfát
cyt b_6f	cytochrom b_6f komplex
CET	cyklický elektronový transport
D1	protein fotosystému II
D2	protein fotosystému II
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
Fd	ferredoxin
FIJ	fluorescenční indukční jev
FNR	ferredoxin-NADP ⁺ -oxidoreduktáza
F _O	minimální fluorescence chlorofylu <i>a in vivo</i>
F _M	maximální fluorescence chlorofylu <i>a in vivo</i>
F _V	variabilní fluorescence
F _V /F _M	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
LHCII	světlosběrný komplex fotosystému II
NADP ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NADPH	redukováná forma NADP fosfátu
Ndh	NAD(P)H dehydrogenáza
NPQ	nefotochemické zhášení excitovaných molekul chlorofylu <i>a in vivo</i>
OEC	komplex vyvíjející kyslík (“oxygen-evolving komplex“)
OER	rychlost vývinu kyslíku
P680	donor elektronů fotosystému II
P700	donor elektronů fotosystému I
PAR	fotosynteticky aktivní záření (400-700nm)
PC	plastocyanin
Pheo	feofytin lokalizovaný v D1 proteinu
Pheo2	feofytin lokalizovaný v D2 proteinu
PQ	plastochinon
PQH ₂	volně pohyblivý redukováný plastochinon
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II

PSII α	fotosystém II s vnitřním i vnějším světloběrným komplexem
PSII β	fotosystém II s vnitřním světloběrným komplexem
PSII _A	aktivní centra fotosystému II
PSII _X	neaktivní centra fotosystému II
PTOX	plastidová terminální oxidáza
Q _A	primární stabilní akceptor elektronů ve fotosystému II
Q _B	sekundární plastochinonový akceptor ve fotosystému II
q _P	koeficient fotochemického zhášení
q _N	koeficient nefotochemického zhášení
RC PSII	reakční centrum fotosystému II
TROL	tylakoidní protein podobný rhodanáze
Φ_{II}	kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II

Obsah:

1. Obecná charakteristika lišejníků	10
1.1. Fyziologie lišejníků.....	10
1.2. Sekundární produkty metabolismu.....	11
1.3. Vysychání lišejníků jako ochranný proces.....	11
2. Transport elektronů v tylakoidní membráně.....	12
2.1. Fluorescenční indukční jev vyšších rostlin.....	13
2.1.1. Fotochemická fáze.....	13
2.1.2. Termální fáze.....	14
2.1.3. Parametry fluorescence chlorofylu <i>a in vivo</i>	14
2.2. Fluorescenční indukční jev lišejníků.....	15
2.2.1. Možné interpretace anomálního chování fluorescence v FIJ za vlnou P.....	17
3. Fotoinhibice světelných reakcí fotosyntézy rostlin.....	18
3.1. Fotoinhibice PSII u symbiotických organismů.....	18
3.2. Mechanismy působící proti fotoinhibici rostlin.....	19
4. Cíle práce.....	20
5. Materiál a metody.....	21
5.1. Materiál.....	21
5.2. Metody.....	22
5.2.1. Měření fluorescenčního indukčního jevu <i>in vivo</i>	22
5.2.2. Současné měření fluorescenčního indukčního jevu a absorpčních změn P700.....	22
5.2.3. Navození fotoinhibice fotosyntetického aparátu rostlin.....	23
5.2.4. Vitalizace lišejníků.....	24
5.2.5. Infiltrace roztokem DCMU.....	24
6. Výsledky a diskuze.....	25
6.1. FIJ lišejníků po fotoinhibici.....	25
6.2. FIJ lišejníků v průběhu vitalizace	27
6.3. Vliv DCMU na FIJ a kinetiku absorpčních změn P700.....	29
6.4. FIJ a kinetika absorpčních změn P700 rostlin po fotoinhibici.....	34
6.4.1. Fotoinhibice rostlin při aerobních podmínkách.....	34
6.4.1.1. Fotoinhibice lišejníků při aerobních podmínkách.....	34

6.4.1.2. Fotoinhibice huseníčku rolního při aerobních podmínkách.....	37
6.4.2. Fotoinhibice rostlin při anaerobních podmínkách.....	39
6.4.2.1. Fotoinhibice lišejníků při anaerobních podmínkách.....	39
6.4.2.2. Fotoinhibice huseníčku rolního při anaerobních podmínkách.....	43
7. Závěr.....	46
8. Seznam literatury.....	48

1. Obecná charakteristika lišejníků

Lišejník je symbiotické společenství houby (mykobionta) a fotosyntetizujícího organismu, kterým bývá zelená řasa nebo sinice. Houbovým partnerem je většinou vřeckovýtrusná houba (*Ascomycetes*), u několika málo výjimek též stopkovýtrusá houba (*Basidiomycetes*). Společný růst řasy, resp. sinice a houby umožňuje velkou rozmanitost v utváření stélky. Vnější vzhled stélky bývá většinou určen houbou, řasa dodává sacharidy vznikající při fotosyntéze. Lišejníky najdeme na polích, skalách a kmenech stromů (viz např. Nash III 2008).

1.1. Fyziologie lišejníků

Soužitím dvou různých organismů tvořících lišejník vzniká nová fyziologická jednotka. Toto spojení se odráží ve všech základních fyziologických procesech, mezi které patří vodní režim a příjem živin. Lišejníky se vyznačují zcela specifickou regulací příjmu a výdeje vody. V období latentního dehydrovaného stavu jsou fotosyntéza a další životní pochody utlumeny na minimum. Lišejníky vyskytující se na suchých stanovištích přežijí i delší období sucha bez poškození. Příjem vody je zajištěn celou plochou stélky. Ve vysokohorských oblastech dochází ke zvlhčování stélek mlhou i vodou z tajícího sněhu. Způsob příjmu živin lišejníků je odlišný od způsobu jakým přijímají živiny řasy a houby existující jako samostatný organismus. Příjem kyslíku a CO₂ je důležitý pro dýchání a fotosyntézu, dusík je přijímán obvykle ve formě nitrátů. Pouze u některých lišejníků můžou fotobionti vázat vzdušný dusík. Lišejníky jsou schopny ve svých stélkách hromadit radioaktivní elementy ¹³⁷Cs a ⁹⁰Sr. Této vlastnosti se využívá k indikaci oblastí, které jsou zamořeny radioaktivními spady (viz např. Nash III 2008).

1.2. Sekundární produkty metabolismu

Jedním z mnoha ochranných mechanismů lišejníků před nepříznivými podmínkami okolí (např. vysoká ozáření, útok herbovirů) je tvorba sekundárních metabolitů. Těchto specifických látek je známo přes 700. Jsou produkovány lišejníky při působení stresových faktorů a dovolují jim růst v extrémních podmínkách. Tyto látky jsou produkovány zpravidla mykobiontem, ale pouze při symbióze s fotobiontem. Některé sekundární metabolity jsou zásobními nebo odpadními látkami. U řady z nich byly prokázány antibiotické či toxické účinky (viz např. Váczi 2005).

1.3. Vysychání lišejníků jako ochranný proces

Lišejníky jsou poikilohydrické povahy tzn., že vlastní organismus není schopen regulovat stav vody ve stélce. Vyschlé lišejníky je možno velmi rychle hydratovat tajícím sněhem, deštěm, mlhou, rosou nebo jen vysokou vlhkostí vzduchu. Pokud zdroj ovlhčení zmizí, stélky lišejníků okamžitě znovu vysychají a jsou schopny ztrácet více než 97% obsahu vody. Stélky lišejníků v přírodě tedy často střídají stav metabolické aktivity a inaktivity. U lišejníků je vysychání stélky mnohem rychlejší než u vyšších rostlin, což vychází z jejich poikilohydrické povahy. Vysychání je příčinou řady změn. Dochází ke snížení metabolické aktivity fotobiontů, narušuje se funkční integrita jejich buněčných membrán a fotochemického aparátu. Vysychání způsobuje blokování elektronového transportu v tylakoidních membránách, a tedy inhibici produkce ATP a NADPH. Vysychání brání poškození lišejníků při vysoké ozáření. U lišejníků jsou aktivovány mechanismy podporující nefotochemické zhášení excitovaných stavů chlorofylu *a*, které chrání makromolekulární látky a biomembrány (viz např. Kranner 2008, Palmquist 2000).

2. Transport elektronů v tylakoidní membráně

Světelná energie dopadající na list je zachycena anténními systémy a je předána do reakčních center PSI a PSII. Vlastní přenos elektronů v rámci lineárního transportu začíná v PSII. Jádrem RC PSII je tvořeno zejména dvěma integrálními proteiny D1 a D2. Na tyto proteiny jsou navázány dimer chlorofylu *a* (P680; elektronový donor PSII), feofytin (Pheo), primární stabilní elektronový akceptor Q_A (vázaný na protein D2) a sekundární elektronový akceptor plastochinon Q_B (vázaný na protein D1). Světlem indukovaná oxidace P680 (vznik $P680^+$) je hnací silou pro fotolýzu vody – zdroj elektronů pro $P680^+$. Elektron získaný při oxidaci P680 je přenesen na přenašeč Pheo a následně na Q_A a Q_B . Q_A přijímá pouze jeden elektron a odevzdává jej na Q_B , který je schopen přijmout dva elektrony a dva protony ze stromální části tylakoidní membrány. Uvolněný plastochinon z PSII (PQH_2) se pohybuje napříč membránou a na lumenální straně předává dva elektrony na cytochrom b_6f (cyt b_6f) komplex. Uvolnění dvou elektronů z redukovaných PQ molekul je doprovázeno uvolněním dvou protonů do lumenu tylakoidu, což představuje nejpomalejší proces lineárního elektronového transportu z PSII na PSI. Redukovaný cyt b_6f komplex předává v rámci lineárního elektronového transportu elektrony na volně pohyblivý plastocyanin (PC), který přenáší elektrony do RC PSI, kde se nachází oxidovaný donor elektronů P700 ($P700^+$). $P700^+$ vzniká nábojovou separací P700 po absorpci záření fotosystémem I (PSI). Elektrony z P700 redukují ferredoxin (Fd), který je volně pohyblivý ve stromatu a ten je přenáší na ferredoxin-NADP⁺-oxidoreduktázu (FNR). FNR je také přítomno ve stromatu chloroplastů a je neaktivní ve stavu adaptovaném na tmu. Konečným akceptorem lineárního transportního řetězce je NADP⁺, který je pomocí FNR redukován na NADPH. Redukované Fd může vracet elektrony na cyt b_6f komplex a umožňovat tak cyklický elektronový transport (CET). Aktuální redoxní stav elektronových přenašečů transportního řetězce v tylakoidní membráně může být monitorován pomocí měření tzv. fluorescenčního indukčního jevu (FIJ) (viz např. Lazár 2009).

2.1. Fluorescenční indukční jev vyšších rostlin

Maximální kvantový výtěžek fluorescence chlorofylu *a* ve fotosyntetickém aparátu je 2-8%. Za fyziologických podmínek je původ fluorescence chlorofylu připisován hlavně anténám PSII. Měřením fluorescence chlorofylu fotosyntetických vzorků adaptovaných na temnotní podmínky může být získána fluorescenční indukční křivka, tzv. Kautského křivka. Fluorescenční indukční křivka se skládá z charakteristických fází O-J-I-P (viz obr. 1B), které odrážejí přechodnou akumulaci elektronových přenašečů lineárního elektronového transportu v tylakoidní membráně. Rychlá fáze FIJ nastává během první sekundy po ozáření silným světlem. Po excitaci předem zatemněných stélek je první detekovaný fluorescenční signál označován jako O. Intenzita fluorescence v tomto bodě (F_0) je považována za minimální a odráží stav PSII s Q_A v plně oxidovaném stavu. Vlna J křivky FIJ se nachází přibližně ve 2 ms po zapnutí intenzivního světla, vlna I přibližně v 20-50 ms. FIJ dospěje do svého maxima P asi po 500 ms. Při dostatečně intenzivním osvětlení maximum P reprezentuje maximální hodnotu fluorescence (F_M). Přesná poloha jednotlivých vln FIJ závisí na intenzitě excitace (viz např. Cruz a kol. 2010).

2.1.1. Fotochemická fáze

Fluorescenční indukční křivka O-J-I-P má dvě fáze. Fáze O-J, která odráží hlavně fotochemické děje (fotochemická fáze) a fázi J-I-P, která je označována jako termální fáze, jelikož závisí na teplotě měření. Sklon počáteční fáze O-J a její relativní výška závisí na intenzitě excitačního světla, odráží přechodnou redukci Q_A , kdy je Q_A redukován, zatímco Q_B zůstává oxidován. To, že fáze O-J odráží redukci jen Q_A nám potvrzuje měření s DCMU (účinný inhibitor elektronového transportu z Q_A na Q_B), kdy fluorescenční indukční křivka dosahuje svého maxima ve vlně J. Pokud DCMU není přítomno, Q_A nemusí být ve vlně J plně redukováno, jelikož elektrony jsou plynule transportovány na Q_B a dále až na PSI. Q_A může být tedy ve vlně J redukováno jen částečně (viz např. Lazár 2006).

2.1.2. Termální fáze

Termální fáze FIJ (J-I-P) odráží redukcí PQ, a to jak PQ vázaného na PSII (Q_B), tak volně se vyskytujícího PQ v tylakoidní membráně. Vlny I a P odráží akumulaci redukováného Q_B . Inhibice donorové strany PSI potlačuje termální fázi FIJ. Vlna I a P FIJ pravděpodobně souvisí s transportem elektronů za PQ a v PSI. Informace o transportu elektronů za PQ lze získat pomocí měření absorpčních změn P700 u 830 nm, které odráží změny v redoxním stavu PC a P700 (obr. 1A, Ilík a kol. 2008). V měření absorpčních změn P700 u vyšších rostlin během 1 s saturačního pulzu rozlišujeme dvě charakteristické fáze, kdy prvotní oxidace P700 během prvních 20 - 30 ms saturačního pulzu je následována redukcí P700 způsobenou přílivem elektronů z PSII. Redukce P700 souhlasí s I-P fází na fluorescenční indukční křivce. Je způsobena inaktivací FNR na akceptorové straně PSI, která zamezuje toku elektronů na $NADP^+$ (viz např. Lazár 2006, Schansker a kol. 2003).

Redukovaný Fd je schopen přenášet elektrony na molekulární kyslík na akceptorové straně PSI a vytvářet tak superoxidový radikál tzv. Mehlerovou reakci. Superoxidový radikál je v dalších enzymatických reakcích transformován až na molekulu vody. Mehlerova reakce konkuruje standardně probíhající redukcí $NADP^+$ a za normálních podmínek je minimální. Při stresových podmínkách, kdy je inhibována činnost Calvinova cyklu anebo např. po delší adaptaci na tmou, kdy je činnost Calvinova cyklu minimální se její vliv začíná více projevovat (viz např. Kotabová 2007).

2.1.3. Parametry fluorescence chlorofylu a in vivo

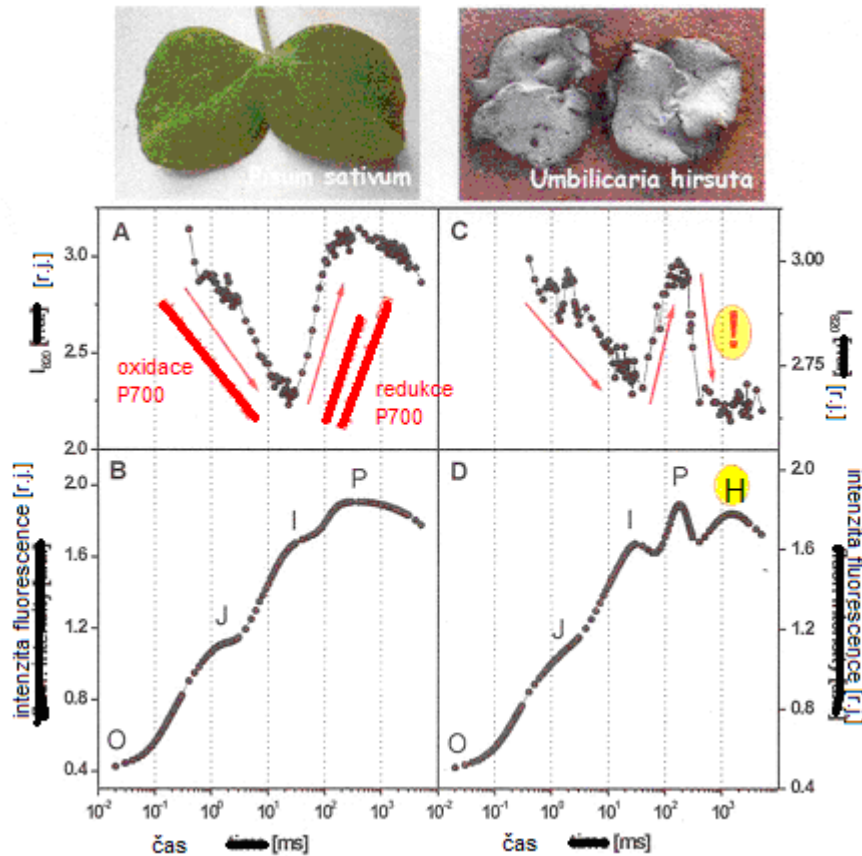
I když fluorescence chlorofylu zahrnuje nejméně se uplatňující proces deaktivace excitovaných pigmentů, jsou časové změny výtěžku fluorescence chlorofylu velice důležité, protože pomocí nich jsme schopni zkoumat mechanismy, jakými tylakoidy regulují využití zářivé energie absorbované komplexy PSII. Nárůst fluorescence chlorofylu nastává během první sekundy po ozáření silným světlem a označuje se jako rychlá fáze fluorescence chlorofylu. Poté následuje pomalá fáze fluorescence chlorofylu trvající několik minut, než je dosaženo rovnovážného stavu fotosyntézy. Rychlá fáze se vztahuje k procesům probíhajícím v tylakoidních membránách chloroplastů, zatímco pomalá fáze se vztahuje k enzymatickým procesům probíhajícím ve stromatu chloroplastů.

Parametry fluorescence chlorofylu *a in vivo* mohou být využívány jako indikátory stresu ovlivňujícího fotochemické reakce a využití absorbovaného světelného záření. Zejména maximální kvantový výtěžek fotochemie (F_v/F_M) a kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (Φ_{II}) jsou nejčastěji využívány ve fyziologii stresu rostlin. Parametr F_v/F_M je široce využíván k posouzení stavu fotosyntetického aparátu a odráží maximální možnou účinnost primárních fotochemických reakcí fotosystému II. Φ_{II} je ukazatelem aktuální kapacity fotosystému II pro fotochemické procesy (viz Roháček a kol. 2002).

2.2. Fluorescenční indukční jev lišejníků

U lišejníků majících řasu *Trebouxia* jako fotobionta můžeme pozorovat neobvyklý průběh fluorescenční indukční křivky. Ve FIJ lišejníků dochází k poklesu intenzity fluorescence za vlnou P, za níž následuje neobvyklá vlna H (obr. 1D, Ilík a kol. 2006). Současné měření FIJ s kinetikou absorpčních změn P700 (obr. 1C a 1D) odhaluje, že klesající část fluorescenční indukční křivky za vlnou P v intervalu 0,2-0,4 s souhlasí s reoxidací elektronových přenašečů v PSI pravděpodobně díky rychlejší aktivaci FNR. Taková oxidace vede k oxidaci dalších elektronových přenašečů včetně Q_A v tylakoidní membráně a tím způsobuje snížení fluorescence. Další možnou příčinou tohoto poklesu intenzity fluorescence za vlnou P by mohla být Mehlerova reakce (viz výše, Ilík a kol. 2006). Přechodná limitace v přenosu elektronů na akceptorové straně PSI, ve FIJ tomu odpovídá vlna P, je u lišejníků tedy relativně krátkodobá ve srovnání s vyššími rostlinami. Nárůst intenzity fluorescence do vlny H není doprovázen změnou v redoxním stavu P700. Vlna H je pozorovatelná při různých excitačních a emisních délkách, což napovídá, že má původ v PSII (viz Ilík a kol. 2008). Tuto vlnu můžeme pozorovat nejen ve fluorescenčním indukčním jevu lišejníků obsahujících řasu *Trebouxia*, ale také u některých korálů a izolovaných zooxanthelách korálů (viz Ilík a kol. 2008). Objevuje se také u vyšších rostlin např. po krátkodobém vysokoteplotním stresu na listech ječmene jarního. Vlna H je také pozorována ve FIJ buněčné suspenze řas *Trebouxia erici*, nezávisí tedy na interakci fotobiontu s mykobiontem, ale je přisuzována jen fotobiontu (Ilík a kol. 2008). Objevuje se při různých intenzitách excitačního světla (100- 1800 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$), při vyšších intenzitách je mírně posunuta ke kratším časům. Bylo pozorováno, že vlna H se výrazně snižuje po

fotoinhibici lišejníků za nízkých teplot a při zatemnění je opět obnovena (Ilík a kol. 2008).



Obr.1. FIJ (B, D) a transmisní změny v 820 nm (I_{820}) pro listy hrachu setého (vlevo) a stélky lišejníku *Umbilicaria hirsuta* (vpravo) během 5-s excitace. Intenzita excitačního světla byla $2400 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 650 nm. Převzato z posteru Ilík a kol. (2008) The unusual step in chlorophyll fluorescence induction of lichens can be observed also in some higher plants. Prezentováno na konferenci XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB). Upraveno.

2. 2. 1. Možné interpretace anomálního chování fluorescence v FIJ za vlnou P

Pokles fluorescence za vlnou P v intervalu 0,2-0,4 s u lišejníků odrážející rychlý odtok elektronů z PSI souhlasí s reoxidací P700. Nárůst intenzity fluorescence do vlny H ale není doprovázen změnou v redoxním stavu P700 (viz výše). Z toho vyplývá, že tento nárůst není způsoben přílivem elektronů do PSI. Jeho příčinou je pravděpodobně příliv elektronů z endogenního reduktantu, který redukuje PQ, což se projevuje v nárůstu intenzity detegované fluorescence. Aktivovaný PSI však na tento endogenní reduktant již není citlivý. Ilík a kol. (2006) se domnívali, že by tímto reduktantem mohl být NADPH, který vrací elektrony na PQ mechanismem známým jako CET závislý na NAD(P)H. Redukce PQ by také mohla být způsobena elektrony vracejícími se zpět na PQ pomocí feredoxinu, tzv. CET závislým na feredoxinu. Proto Ilík a kol. (2006) zkoumali vliv CET na neobvyklý průběh FIJ u lišejníků *Umbilicaria hirsuta*. V pokusech, které provedli, však vlna H nebyla citlivá ani na antimycin A (inhibitor CET závislého na feredoxinu), ani na rotenone (inhibitor CET závislého na NAD(P)H). Z toho vyplynulo, že CET není odpovědný za vlnu H. Redukce PQ tedy nastává pravděpodobně vlivem endogenního reduktantu, který ovšem nesouvisí s CET.

3. Fotoinhibice světelných reakcí fotosyntézy rostlin

Vlivem vysoké ozáření může docházet k fotoinhibici světelných reakcí fotosyntézy. PSI je při normálních teplotách mnohem odolnější vůči vysoké ozáření než PSII. Fotoinhibice PSII je důsledkem přebytku energie přivedené do RC PSII po záchytu fotonů v anténních komplexech PSII a nedostatečnou kapacitou odvodu elektronů z RC PSII. Přebytečná excitační energie v anténních komplexech je převedena na teplo nebo vyzářena ve formě fluorescence. Pokud není kapacita těchto deexcitačních procesů dostatečná, dochází k řadě strukturně-funkčních změn v PSII a v konečném důsledku k poškození D1 proteinu PSII. Fotoinhibici PSII můžeme rozdělit na fotoinaktivaci, kdy některé proteiny PSII ztrácejí svou funkci, ale nejsou poškozeny, a fotodestrukci, kdy dochází k irreverzibilnímu poškození proteinů PSII (viz např. Krulová 2006).

3.1. Fotoinhibice PSII u symbiotických organismů

U symbiotických organismů, stejně jako u vyšších rostlin, způsobuje nadbytek excitační energie fotoinhibici PSII v tylakoidní membráně chloroplastů fotobionta. Fotoinhibice fotosyntézy u těchto organismů není dosud dostatečně prozkoumána. V současné době probíhá mnoho studií zaměřujících se na fotoinhibici všech komponent fotosyntetického aparátu. Např. Hill a kol. (2006) se domnívají, že snížení účinnosti fotosyntézy během fotoinhibice korálů (symbióza polypu a obrněnek) může být způsobeno tvorbou nefunkčních center PSII.

Existuje určitá rozmanitost ve fotosystémech II. Můžeme je dělit z hlediska schopnosti redukovat Q_B na aktivní centra PSII ($PSII_A$), která jsou známá jako Q_B redukující, kdy redukovaný primární stabilní akceptor elektronů Q_A^- je účinně reoxidován sekundárním elektronovým akceptorem Q_B a neaktivní centra ($PSII_X$), známá jako Q_B neredukující, u nichž jsou Q_A^- oxidována asi tisíckrát pomaleji. Další dělení PSII rozlišuje fotosystémy s vnitřním i vnějším světlosběrným komplexem (LHCII) ($PSII_\alpha$) a fotosystémy mající jen vnitřní LHCII ($PSII_\beta$). Stresové faktory jako např. nadměrné ozáření mají vliv na výskyt těchto typů fotosystémů v chloroplastu.

Výzkumy fotoinhibice fotosyntézy prováděné na korálech ukázaly, že nadměrná ozáření má za následek pokles parametru F_V/F_M a výraznou změnu ve tvaru FIJ. Např. Hill a kol. (2006) se domnívají, že tento pokles parametru F_V/F_M , stejně jako u vyšších rostlin, souvisí s relativním nárůstem vlny J v FIJ, z čehož lze usoudit, že nadměrná

ozáření vede ke přeměně PSII_A na PSII_X. Tato přeměna může být plně reverzibilní. Při nadměrné ozáření korálů navíc dochází, stejně jako u vyšších rostlin, k přeměně PSII_α na PSII_β, čímž se snižuje absorpční průřez PSII a PSII je tak chráněn před nadbytkem excitací. K podobné ochraně PSII dochází při indukci tzv. nefotochemického zhášení (NPQ).

Váczi (2006) zkoumal vliv různě vysoké ozáření na buněčnou suspenzi zelených řas *Trebouxia erici*. Tento experiment prokázal exponenciální pokles aktuálního kvantového výtěžku fotochemie Φ_{II} měřeného v průběhu pomalého FIJ a nárůst rychlosti vývinu kyslíku (OER) při rostoucí ozáření. OER dosahovala svého maxima při ozáření 500 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Pokles Φ_{II} poukazuje na snížení rychlosti elektronového transportu na tylakoidních membránách a zvýšení nezářivé disipace absorbované energie. K podobným výsledkům u stélek lišejníků *Umbilicaria decussata*, *Umbilicaria antarctica* a *Usnea antarctica* došla i Vráblíková (2005).

3.2. Mechanismy působící proti fotoinhibici rostlin

Rostliny si v průběhu evoluce vyvinuly řadu mechanismů, jak se vypořádat s nadměrnou ozáření. Jedním z nejdůležitějších mechanismů je zrychlená přeměna excitační energie na tepelnou, pomocí pigmentů xantofylového cyklu. Jiným obranným mechanismem proti nadměrné ozáření je odpojení vnějších LHCI od PSII. V tomto případě dochází k aktivaci specifické kinázy, která fosforyluje proteiny LHCI a způsobuje odpojení komplexu od PSII. Ve stromální části membrány se fosforylované LHCI vážou na PSI, kterému předávají excitační energii (viz např. Krulová 2006).

Lišejníky jsou schopny se vypořádat s fotoinhibicí pomocí několika mechanismů. Stélka ve své svrchní korové vrstvě obsahuje sekundární metabolity např. melanin a parietin, které pohlcují světlo a fungují tak jako ochranná clona, která brání průchodu světla na fotobionta. Významnou roli v ochraně před nadměrnou ozáření také hraje světlem indukovaná tvorba zeaxantinu. Stélky lišejníků vlivem nadměrné ozáření vysychají. Ve vyschlém stavu se stélky vyznačují zvýšenou spektrální odrazivostí, která je také chrání před nadměrnou ozáření (viz např. Vráblíková 2005). Ve stélkách lišejníků se nachází antioxidanty, zahrnující karotenoidy, askorbát a tokoferoly, jejichž úlohou je vypořádat se s reaktivními formami kyslíku, které se při vysokém ozáření stélek vytvářejí. Je-li kapacita těchto antioxidantů vyčerpána, přijde na řadu neodvratné poškození fotosystémů (Kranner a kol. 2005).

4. Cíle práce

Předkládaná práce si klade za cíl studium průběhu fluorescenční indukční křivky lišejníků obsahujících symbiotickou řasu rodu *Trebouxia*. Studium je zaměřeno na analýzu zejména neobvyklé vlny H ve fluorescenční indukci v souvislosti s fotoinhibicí fotosyntetického aparátu fotobionta. Je také zkoumán vliv vysoké ozáření za anaerobních podmínek. Pro srovnání jsou použity při studiu rostliny huseníčku rolního jako zástupci vyšších rostlin.

5. Materiál a metody

5.1. Materiál

Lišejníky *Umbilicaria hirsuta* byly nasbírány v lokalitě Brněnské přehrady (49°15' 25.989" N, 16°27' 55.498" E). Po sběru byly dehydrovány a skladovány za šera při pokojové teplotě. Minimálně dva dny před měřením byly stélky vitalizovány (kap. 5.2.4.) při teplotě 17°C. Zástupci lišejníku *Umbilicaria hirsuta* jsou zobrazeni na obr. 2 (<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id106822/?taxonid=125211>).



Obr. 2. *Umbilicaria hirsuta* - pupkovka srstnatá (<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id106822/?taxonid=125211>)

Pro srovnávací měření byly použity rostliny huseníčku rolního. Huseníček rolní byl pěstován po 4 týdny v květináčích v rašelinovém substrátu při teplotě 25 °C a 60% vlhkosti. Růst huseníčku probíhal v režimu 12 hodin světlo (bílé světlo o intenzitě 100 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, PAR) / 8 hodin tma. Na obr. 3 je vyobrazen huseníček rolní v růstové fázi těsně před měřením.



Obr. 3. *Arabidopsis thaliana*- huseníček rolní

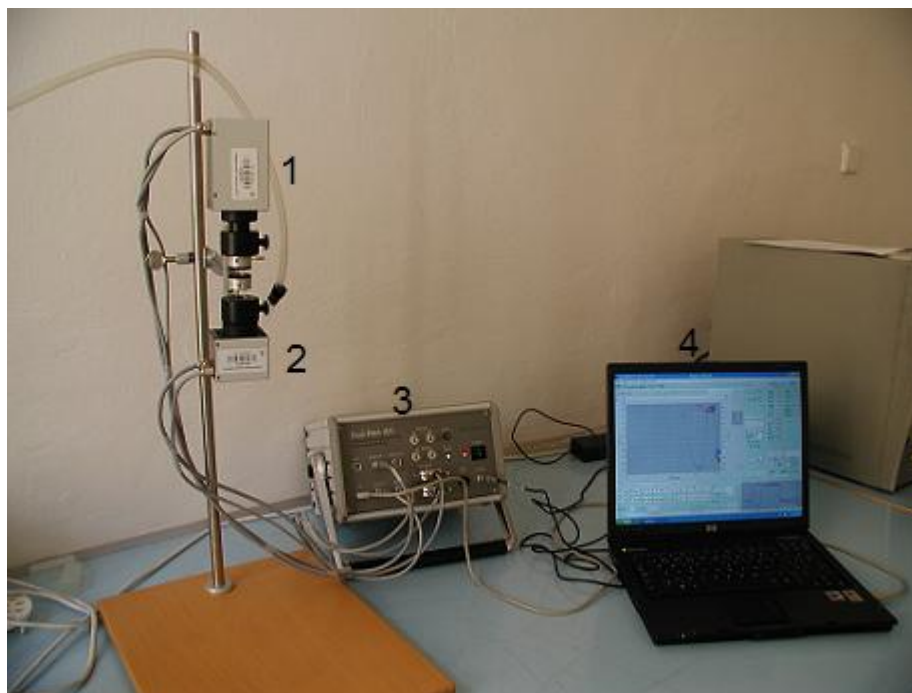
5.2. Metody

5.2.1. Měření fluorescenčního indukčního jevu *in vivo*

K měření fluorescenčních indukčních křivek byl použit PEA fluorimetr (Hansatech Instruments, Norfolk, UK), kde zdrojem excitačního světla jsou LED diody vyzařující na vlnové délce 650 nm. Intenzita excitačního červeného světla byla nastavena na 40% maximální hodnoty ($4660 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Byla ozařována svrchní strana stélek lišejníků a listů huseníčku rolního. Měření trvalo po dobu 3 s. Měření probíhalo při teplotě 23°C.

5.2.2. Současné měření fluorescenčního indukčního jevu a absorpčních změn P700

Přístroj DUAL PAM-100 (Waltz GmbH, Německo), zobrazený na obr. 4, umožňoval současné měření fluorescenčního indukčního jevu (FIJ) a absorpčních změn při 830 nm během saturačního pulzu. Součástí přístroje jsou měřicí hlavy DUAL-E a DUAL-DB s detektorem. Měřicí hlava DUAL-DB je vybavena LED diodou emitující měřicí světlo o vlnové délce 460 nm. Jako zdroj aktinického světla v obou měřicích hlavách slouží několik LED diod emitujících červené záření (635 nm). Pro měření absorpčních změn donoru elektronů PSI (P700) je měřicí hlava DUAL-E vybavena dvěma zdroji infračerveného záření (830 a 875 nm). Detektor absorpčních změn vyhodnocuje rozdíl intenzit záření prošlého vzorkem (list, stélka) u obou vlnových délek ($I_{875} - I_{830}$). Světlem stimulovaný nárůst rozdílu $I_{875} - I_{830}$ poukazuje na probíhající oxidaci P700. Před každým měřením byly intenzity obou světél procházejících vzorkem nastaveny na stejnou hodnotu, aby redoxní změny P700 byly detekovány co nejcitlivěji. Měření bylo prováděno v rychlém modu, doba trvání saturačního pulzu byla 800 ms. Měření probíhalo při teplotě 23°C. V této práci jsou prezentovány typické průběhy FIJ i kinetiky absorpčních změn P700, k podobným výsledkům jsme dospěli i v dalších sadách experimentů.



Obr. 4. Měřicí aparatura DUAL PAM-100 (1- měřicí hlava DUAL-E, 2- měřicí hlava DUAL-DB, 3- napájecí a řídicí jednotka, 4-notebook)

5.2.3. Navození fotoinhibice fotosyntetického aparátu rostlin

Byla navozována fotoinhibice fotosyntetického aparátu zatemněných stélek *Umbilicaria hirsuta* a listů huseníčku rolního. Jestliže jsme měřili fluorescenční indukční jevy pomocí PEA fluorimetru, byla fotoinhibice fotosyntetického aparátu *Umbilicaria hirsuta* navozena bílým světlem o intenzitě $1500 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 50 minut při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pomocí zdroje studeného světla KL-2000 (Zeiss, Hertfordshire, UK). Po ozáření byly stélky po dobu až 2 hodin zatemněny. V průběhu této temnotní adaptace byl na fotoinhibovaných listech (stélkách) měřen FIJ. Po celou dobu měření byly stélky umístěny v klipu, aby byla zachována stejná geometrie při měření. Jestliže jsme měřili s přístrojem DUAL-PAM-100, byla fotoinhibice fotosyntetických aparátů navozena červeným aktinickým světlem o intenzitě $1690 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ s dobou trvání 30 minut.

5.2.4. Vitalizace lišejníků

Byl studován průběh vitalizace vyschlých stélek *Umbilicaria hirsuta*. Na svrchní stranu dehydrovaných předem zatemněných stélek lišejníků *Umbilicaria hirsuta* bylo přikápnuto 0.5 ml deionizované vody. Měření FIJ probíhalo na 5 vzorcích (část stélky lišejníku). Na prvním vzorku jsme měřili FIJ po 30 s od počátku hydratace, na druhém vzorku po 1 minutě, na třetím po 4 minutách, na čtvrtém po 8 minutách a na pátém po 16 minutách od počátku hydratace. Pro časy 30 s, 1, 4, 8, 16 minut bylo tedy měření realizováno na různých vzorcích, aby nedocházelo k příliš častému osvětlování stélek, které by ovlivňovalo následná měření FIJ. Stélky byly po celou dobu měření umístěny v klipu na vatě, aby byla zachována stejná geometrie při měření. Měření jsme prováděli dvakrát.

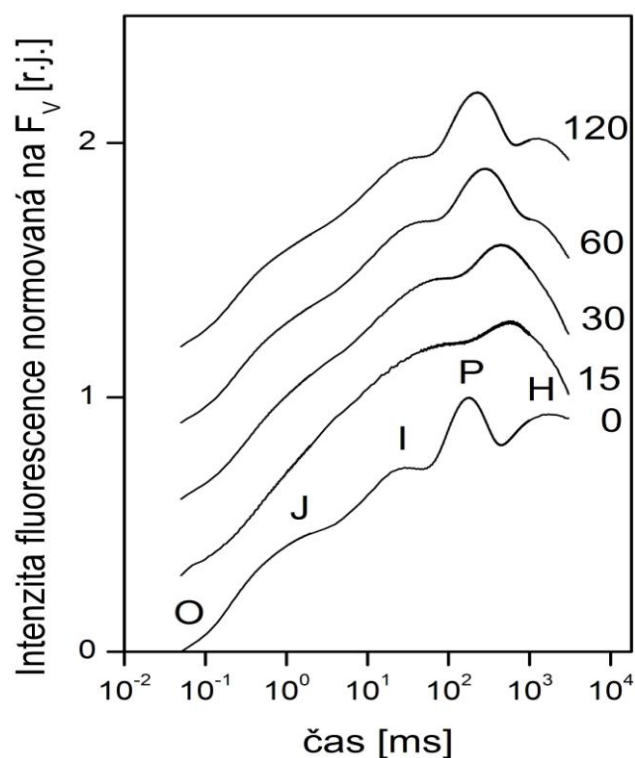
5.2.5. Infiltrace roztokem DCMU

Pro měření v přítomnosti DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), inhibitor elektronového transportu z Q_A na Q_B , byly zatemněné stélky lišejníků *Umbilicaria hirsuta* vystaveny působení 5 a 20 μM DCMU obsahujícího 1% etanolu. Stélky lišejníku byly vystaveny působení 5 μM DCMU po dobu až 40 minut. FIJ zároveň s kinetikou absorpčních změn P700 byl měřen po 10, 20 a 40 minutách působení DCMU. Jestliže byly stélky vystaveny působení 20 μM DCMU po dobu až 50 min, byl FIJ zároveň s kinetikou absorpčních změn P700 měřen po 10, 20 a 50 minutách působení DCMU. Listy huseníčku rolního byly vystaveny působení 20 μM roztoku DCMU po dobu až 80 minut. Měření FIJ zároveň s kinetikou absorpčních změn P700 probíhalo po 10, 20, 40 a 80 minutách působení DCMU. Stélky, listy byly umístěny v Petriho misce na vatě napuštěné roztokem DCMU a ponechány zde ve tmě. Po uplynutí požadované doby působení DCMU byly vzorky před každým měřením osušeny papírovým kapesníčkem. Po jednotlivých měřeních byly stélky opět položeny na vatu do Petriho misky, nebyla tak tedy zachována stejná geometrie při měření.

6. Výsledky a diskuze

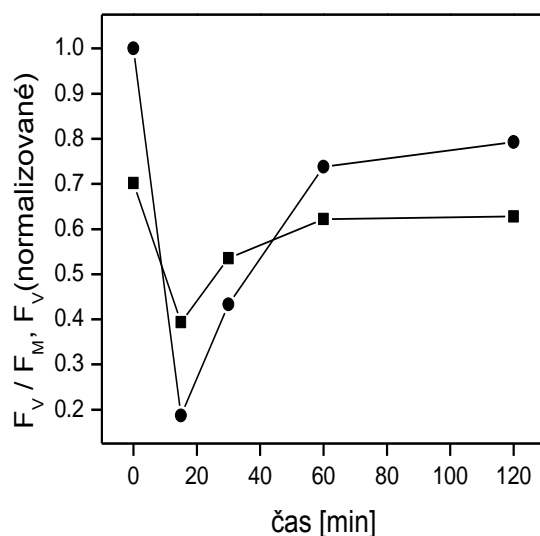
6.1. FIJ lišejníků po fotoinhibici

Fluorescenční indukční křivka lišejníků obsahujících řasu *Trebouxia* se vyznačuje neobvyklým průběhem. Kromě charakteristických fází O-J-I-P na ní ještě pozorujeme nezvyklou vlnu H (viz kap. 2.2.). Zvitalizované a zatemněné stélky lišejníků byly fotoinhibovány světlem o intenzitě $1500 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ po dobu 50 minut při $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Poté byly ponechány ve tmě po různou dobu (15-120 minut). Během temnotní adaptace po fotoinhibici byl měřen FIJ (obr. 5). Po celou dobu byly stélky umístěny v klipu pro zachování stejné geometrie při měření. Tento pokus byl zopakován na základě měření, které provedl Ilík a kol. (2006). Tito autoři pozorovali, že ve FIJ docházelo k poklesu vlny H na fotoinhibovaných stélkách lišejníku. Na obr. 5 jsou fluorescenční indukční křivky normalizovány na variabilní fluorescenci $F_V = F_M - F_O$ (F_M , maximální intenzita fluorescence ve fluorescenční indukční křivce; F_O , intenzita fluorescence v bodě O), aby byly více patrné tvarové změny křivek. Bezprostředně po fotoinhibici (15 min) došlo k relativnímu snížení vlny H (srovnej s kontrolou před fotoinhibicí). S rostoucí dobou zatemnění po fotoinhibici relativní výška vlny H rostla. V měření, které provedl Ilík a kol. (2006) byl po 2 hodinách zatemnění pozorován téměř kompletní návrat vlny H na původní úroveň s největším relativním nárůstem vlny H mezi 15-30 minutami. V našem měření však 2 hodiny zatemnění nestačily ke kompletní obnově vlny H, ale byla zaznamenána stejná tendence v relativním zvyšování této vlny. Výsledky naznačují, že po fotoinhibici došlo ke snížení donace elektronů na PQ v intervalu 0,4-2 s (viz kap. 2.2.1). S rostoucí dobou zatemnění po fotoinhibici je postupně donace elektronů na PQ výraznější, což se projevuje v relativním nárůstu vlny H ve FIJ.



Obr. 5. FIJ pro stélky *Umbilicaria hirsuta* před (0) a 15, 30, 60 a 120 minut po fotoinhibici navozené světlem o intenzitě $1500 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 50 minut při 4°C . Číselné údaje vyjadřují dobu zatemnění po fotoinhibici v minutách. Křivky jsou normalizovány na variabilní fluorescenci. Fluorescenční indukční křivky jsou vzájemně posunuty o konstantní hodnotu 0,3 r.j.

Z naměřených FIJ je možno vyhodnotit maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII, F_V/F_M , a variabilní fluorescenci, F_V , normovanou na F_V před fotoinhibicí, které se používají k posouzení stavu fotosyntetického aparátu stresovaných rostlin. Obr. 6 ukazuje, že 15 minut po fotoinhibici hodnoty parametrů F_V/F_M a F_V (normované) výrazně poklesly. S rostoucí dobou zatemnění hodnoty parametrů rostly téměř na úroveň před fotoinhibicí. Dosáhl-li parametr F_V/F_M hodnoty $\sim 0,6$, došlo i k vytvoření vlny H (srovnej s obr. 5). S rostoucí dobou zatemnění by se zřejmě dále zvyšovala relativní úroveň vlny H.



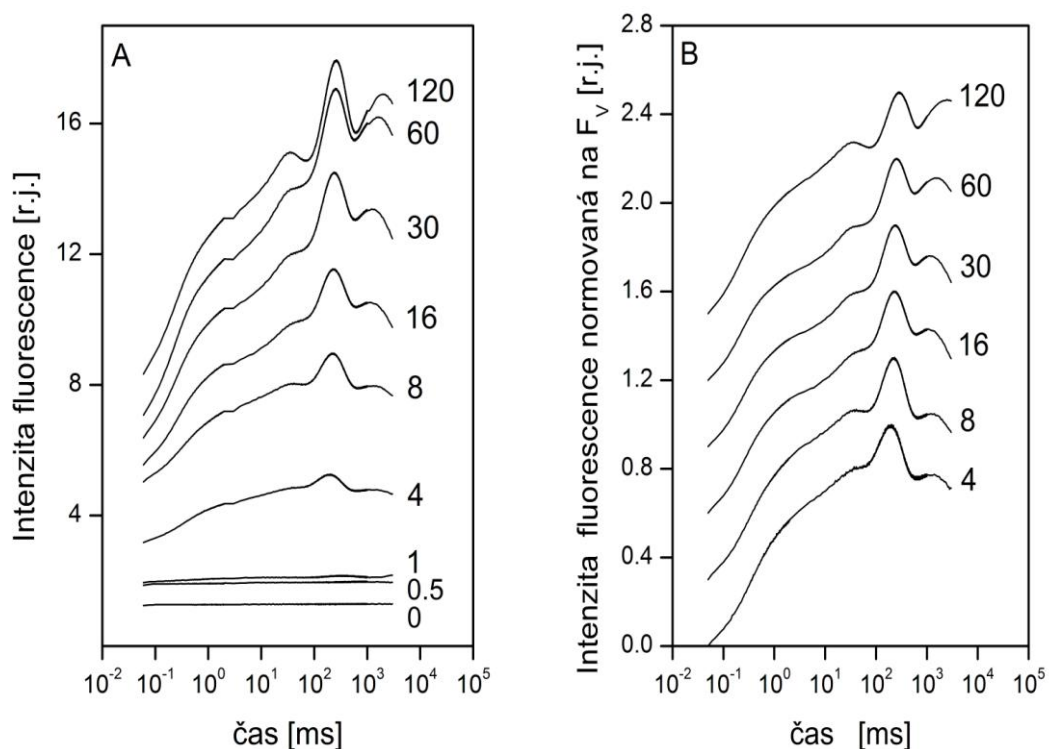
Obr. 6. Závislost parametrů F_v/F_M (■) a F_v (●, normované na F_v před fotoinhibicí) na čase po fotoinhibici navozené světlem o intenzitě $1500 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 50 minut při 4°C pro stélky *Umbilicaria hirsuta*. Hodnota v 0 minutách odpovídá kontrolnímu vzorku před fotoinhibicí.

6.2. FIJ lišejníků v průběhu vitalizace

Aktivita PSII ve vysychajících stélkách je výrazně nižší než v hydratovaném stavu (viz kap. 1.3.). Zajímalo nás, zda se bude v průběhu hydratace zaschlých stélek lišejníků (vitalizace) se zvyšující se aktivitou PSII také zvyšovat relativní zastoupení vlny H. Na svrchní stranu dehydrovaného předem zatemněného lišejníku *Umbilicaria hirsuta* byla přikápnuta deionizovaná voda.

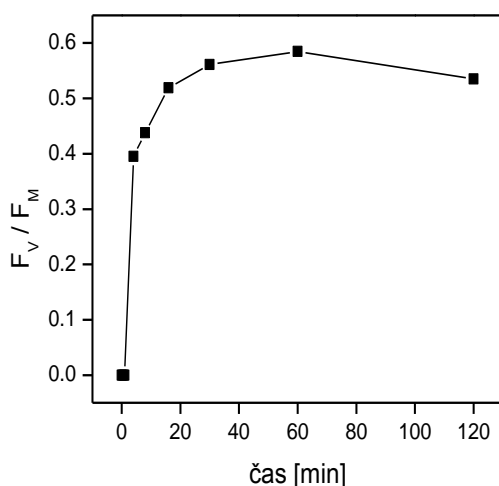
Obr. 7A ukazuje, že FIJ dehydrovaných stélek lišejníků vykazovaly velmi nízkou úroveň fluorescence, která byla v rámci měření FIJ téměř konstantní. Variabilní fluorescence byla prakticky nulová. S rostoucí dobou vitalizace docházelo k nárůstu F_v , což poukazuje na zvyšující se aktivitu PSII. Charakteristické fáze fluorescenční indukční křivky (J, I, P) pozorujeme až po 4 minutách hydratace. Na obr. 7B jsou FIJ normalizovány na F_v , aby byly více patrné tvarové změny, zejména nárůst vlny H. Křivky FIJ do 4 minut od začátku hydratace nejsou v tomto obrázku zobrazeny, jelikož nevykazovaly téměř žádné tvarové změny. V průběhu hydratace roste relativní zastoupení vlny H, což naznačuje zvýšenou redukci PQ díky endogenním reduktantům. Čím je funkce PSII lepší, tím je vlna H relativně vyšší. Podobná měření provedli Bukhov a kol. (2003) na lišejnících *Hypogymnia physodes*. Jejich měření ukázalo, že

fáze O-J-I-P se objevily až velikost F_V dosáhla alespoň 25% svého maxima v plně hydratovaném stavu. Bukhov a kol. (2003) se také zabývali aktivací PSI v průběhu vitalizace a zjistili, že fotochemické procesy se v PSI obnovily rychleji než v PSII.



Obr. 7. FIJ nenormalizované (A) a normalizované na variabilní fluorescenci (B) pro stélky *Umbilicaria hirsuta* v průběhu vitalizace. Vitalizace byla navozena kápnutím 0,5 ml deionizované vody na vyschlé stélky. Číselné údaje vyjadřují čas vitalizace v minutách. Pro časy 30 s, 1, 4, 8, 16 minut od počátku hydratace byly FIJ měřeny na různých vzorcích, aby nedocházelo k příliš častému osvětlování stélek. Na obr. 7B jsou fluorescenční indukční křivky vzájemně posunuty o konstantní hodnotu 0,3 r.j.

Z FIJ naměřených v průběhu vitalizace je na obr. 8 vyhodnocen parametr F_V/F_M v závislosti na době od počátku hydratace. Tento parametr byl pro vyschlé stélky lišejníků nulový. Jak se aktivita PSII zvyšovala, tak také postupně rostla hodnota F_V/F_M a docházelo i k vytvoření vlny H. Po 20 minutách vitalizace se ale maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII již téměř neměnil, zůstával na stejné úrovni, a přesto se vlna H stále zvyšovala. Relativní nárůst vlny H tedy neodpovídá jednoznačně zlepšování funkce PSII.



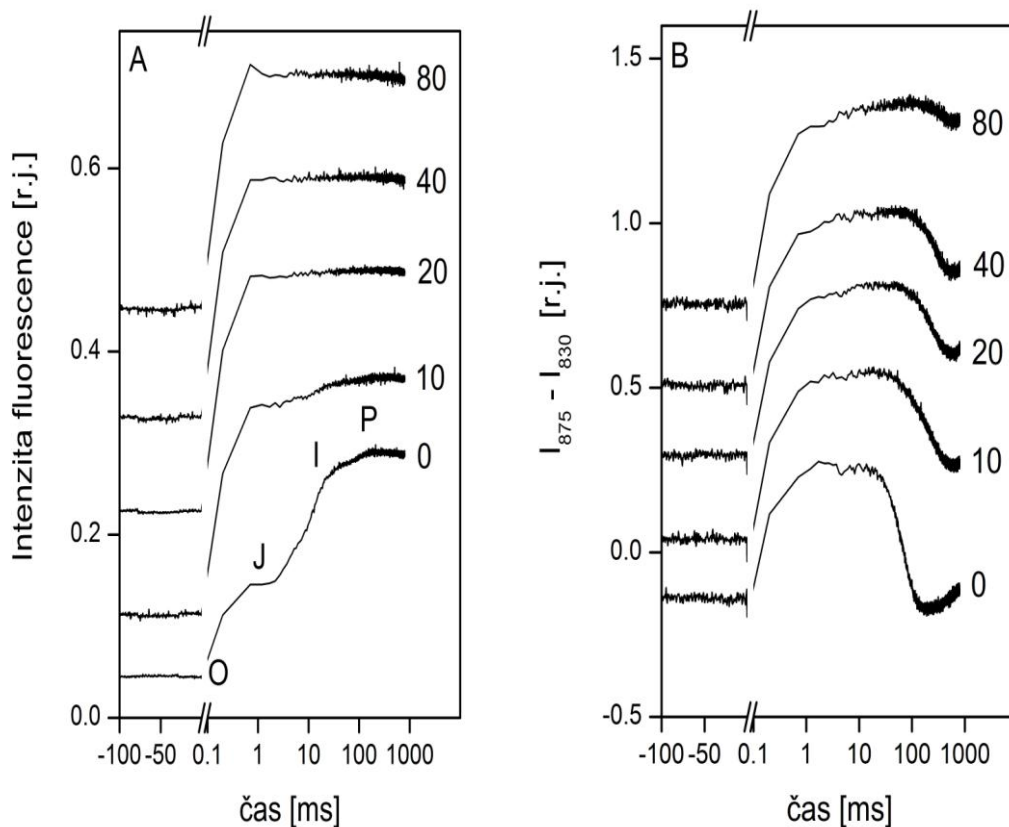
Obr. 8. Závislost parametru F_v/F_M na době od počátku hydratace pro stélky *Umbilicaria hirsuta*.

6.3. Vliv DCMU na FIJ a kinetiku absorpčních změn P700

DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) je účinný blokátor elektronového transportu z Q_A na Q_B . Měřením FIJ u vzorků (listy, stélky) infiltrovaných roztokem DCMU získáme informaci, jak FIJ vypadá při úplné blokaci akceptorové strany PSII. Abychom získali hlubší informace o transportu elektronů z PQ do PSI a za PSI, měřili jsme zároveň s FIJ i absorpční změny P700. Tyto absorpční změny poskytují informace o kinetice a rozsahu oxidace P700.

V kinetice absorpčních změn P700 u vyšších rostlin rozlišujeme v průběhu 800 ms saturačního pulzu dvě fáze (Schansker a kol. 2003). Počáteční oxidaci P700 v prvních sekundách saturačního pulzu a následnou redukci P700 v 30-800 ms způsobenou přílivem elektronů z PSII. Finální oxidace P700 se neobjevuje, jelikož v tak krátkých časech u vyšších rostlin není ještě aktivováno FNR (viz kap. 2.1.2). Ke zkoumání vlivu DCMU na FIJ a kinetiku absorpčních změn P700 u vyšších rostlin jsme použili vzorky huseníčku rolního. Listy huseníčku byly vystaveny působení DCMU po dobu až 80 minut. Působení DCMU na listy huseníčku rolního výrazně ovlivňuje FIJ i kinetiku absorpčních změn P700. Obr. 9A ukazuje, že FIJ dosahuje svého maxima už po 2-3 ms v J fázi, což poukazuje na kompletní inhibici elektronového transportu za Q_A . Z naměřených FIJ jsme vypočítali parametr F_v/F_M . Pro FIJ u kontrolního listu huseníčku bez infiltrace DCMU tento parametr nabýval hodnoty 0,84. Po 80 minutách působení 20 μM roztoku DCMU se tato hodnota snížila na 0,72. Obr. 9B ukazuje, že se redukce

P700 s rostoucí dobou působení DCMU na list huseníčku postupně zmenšuje. Po 80 minutách působení DCMU již dochází ke kompletní oxidaci P700 v intervalu 20-800 ms, kdy žádné elektrony z PSII nejsou dodávány do PSI. Podobná měření provedli Schansker a kol. (2003), kteří zkoumali vliv 100 μM roztoku DCMU na FIJ a kinetiku absorpčních změn P700 u listů hrachu setého. Zjistili, že po 60 minutovém působení DCMU na listy hrachu setého je elektronový transport z Q_A na Q_B kompletně inhibovaný a zároveň dochází k úplné oxidaci P700.



Obr. 9. Vliv DCMU na FIJ (A) a kinetiku absorpčních změn P700 (B) pro listy huseníčku rolního. Zatemněné listy byly vystaveny působení 20 μM DCMU po dobu 0, 10 20, 40 až 80 minut. Číselné hodnoty vyjadřují dobu působení DCMU na listy huseníčku v minutách. Signál v záporných časech je úměrný fluorescenci F_0 . Fluorescenční indukční křivky jsou vzájemně posunuty o konstantní hodnotu.

U lišejníku nacházíme odlišný průběh kinetiky absorpčních změn P700. U kontrolních na tmě adaptovaných stélkách lišejníků za aerobních podmínek rozlišujeme tři charakteristické fáze (Schansker a kol. 2003):

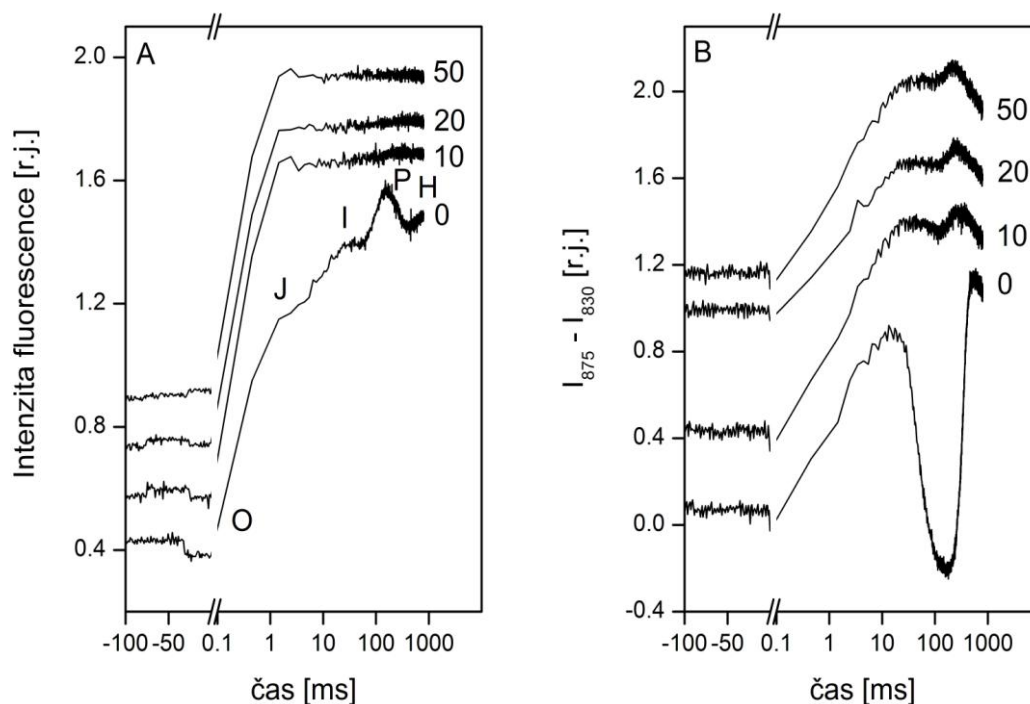
1. prvotní oxidaci P700 během prvních 20 - 30 ms saturačního pulzu
2. přechodnou redukci P700 v časovém intervalu 30 - 150 ms
3. finální oxidaci P700 po 300 - 600 ms

Přechodná redukce souhlasí s I-P fází na fluorescenční indukční křivce. Je způsobena inaktivací FNR na akceptorové straně PSI, která zamezí toku elektronů na NADP⁺. Jakmile je FNR aktivováno (po 150 ms saturačního osvětlení), může akceptorová strana udržovat P700 v oxidovaném stavu.

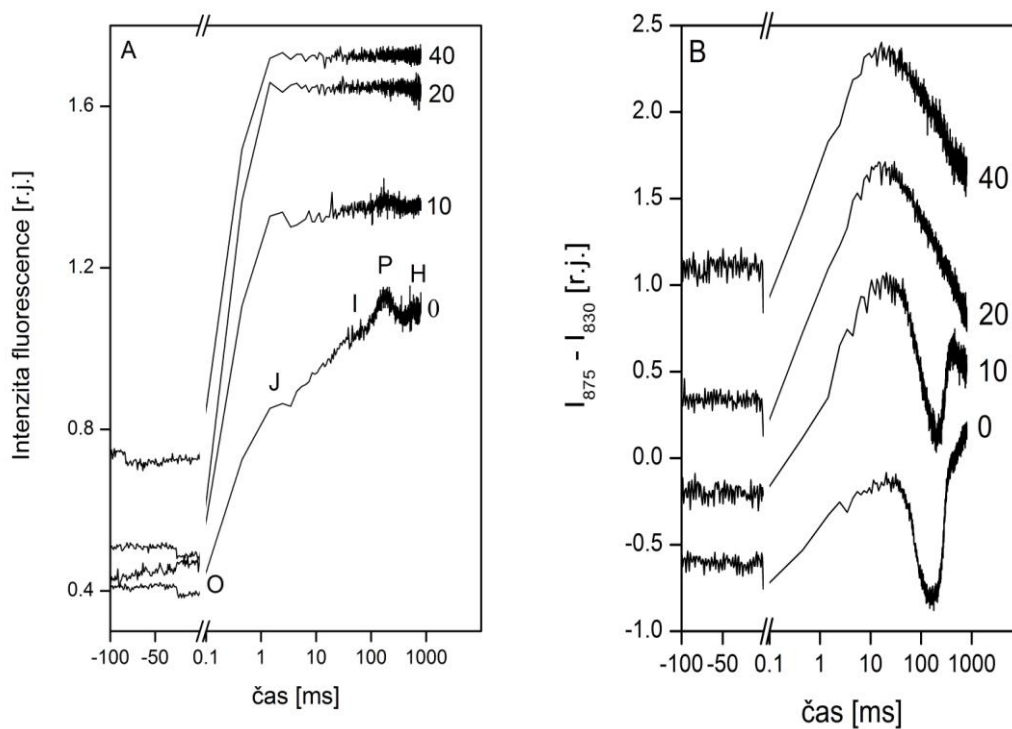
Pro měření v přítomnosti DCMU, byly stélky ponořeny do 5 μ M roztoku DCMU po dobu až 40 min a do 20 μ M roztoku DCMU po dobu až 50 min. Jak je patrné z obr. 10A a 11A, FIJ u stélek infiltrovaných 5 i 20 μ M DCMU jsou charakteristické absencí J-I-P fáze už po 10 minutách působení DCMU. FIJ dosahuje svého maxima již ve fázi J podobně jako u huseníčku rolního (srovnej 9A). Vlivem působení DCMU na stélky lišejníků dochází také ke snížení vlny H ve FIJ, což ukazuje na souvislost vlny H s redukcí elektronových přenašečů za Q_B. Kinetika absorpčních změn P700 u stélky infiltrované 20 μ M roztokem DCMU je však odlišná od kinetiky absorpčních změn P700 změřené u stélek, které byly vystaveny působení 5 μ M roztoku DCMU. Obr. 10B ukazuje, že již po 10 minutách působení 20 μ M roztoku DCMU dochází k trvalé oxidaci P700. Přechodné redukce P700 je potlačena díky inhibici elektronového transportu z Q_A na Q_B. V intervalu 30-150 ms je viditelná jen minimální redukce P700, která přetrvává i po delší době působení DCMU na stélky lišejníku. Příčina této redukce není zřejmá, může být způsobena díky NADPH, který se tvoří v průběhu měření a donuje elektrony na PQ, které jsou pak dále transportovány do PSI. Obr. 11B ukazuje, že vlivem 10 minutového působení 5 μ M roztoku DCMU na stélky lišejníku dochází k pomalému mizení přechodné redukce P700 z důvodu klesající donace elektronů z PSII. S rostoucí dobou působení DCMU na stélky je počáteční oxidace následována redukcí, která by už však neměla být způsobena elektrony z PSII, jelikož transport elektronů z Q_A na Q_B je inhibován (srovnej obr. 11A). Tento efekt redukce P700 není u vzorků vystavených působení DCMU běžný. K podobnému jevu dochází v kinetice absorpčních změn P700 u lišejníků vystavených anaerobním podmínkám (viz kap. 6.3.2.). Dospěli jsme tedy k podezření, že tento vzorek byl příliš ponořen do roztoku DCMU a tak byl vystaven anaerobním podmínkám. Z naměřených FIJ u lišejníků vystavených působení DCMU

jsme vyhodnocovali parametr F_V/F_M . Pro FIJ u kontrolních stélek, nefiltrovaných roztokem DCMU, tento parametr nabýval hodnoty 0,77 a 0,78. Po 40 minutovém působení 5 μM roztoku DCMU na stélku lišejníku jeho hodnota klesla na 0,7. Po 50 minutové infiltraci jiné stélky 20 μM roztokem DCMU klesla hodnota F_V/F_M z 0,78 na 0,67. Čím je tedy DCMU koncentrovanější, tím způsobuje větší pokles F_V/F_M .

Podobná měření provedli Grouneva a kol. (2010) u rozsivek *Phaeodactylum tricornutum*, u kterých se také ve FIJ také objevuje vlna podobná vlně H. Zjistili, že působení 40 μM roztoku DCMU u rozsivek způsobuje nárůst vlny J v FIJ podobně jako v našem měření. Také zjistili, že vlivem DCMU dochází k úplné oxidaci P700, což značí, že všechny elektronové přenašeče mezi Q_A a PSI jsou oxidované.



Obr. 10. Vliv DCMU na FIJ (A) a kinetiky absorpčních změn P700 (B) pro stélky *Umbilicaria hirsuta*. Zatemněné stélky byly vystaveny působení 20 μM DCMU po dobu 0, 10 20 až 50 minut. Číselné hodnoty vyjadřují dobu působení DCMU na stélku lišejníku v minutách. Signál v záporných časech je úměrný fluorescenci F_O . Fluorescenční indukční křivky jsou vzájemně posunuty o konstantní hodnotu.



Obr. 11. Vliv DCMU na FIJ (A) a kinetiku absorpčních změn P700 (B) pro stélky *Umbilicaria hirsuta*. Zatemněné stélky byly vystaveny působení 5 μ M DCMU po dobu 0, 10, 20 až 40 minut. Číselné hodnoty vyjadřují dobu působení DCMU na stélky lišejníku v minutách. Signál v záporných časech je úměrný fluorescenci F_0 . Fluorescenční indukční křivky jsou vzájemně posunuty o konstantní hodnotu.

6.4. FIJ a kinetika absorpčních změn P700 rostlin po fotoinhibici

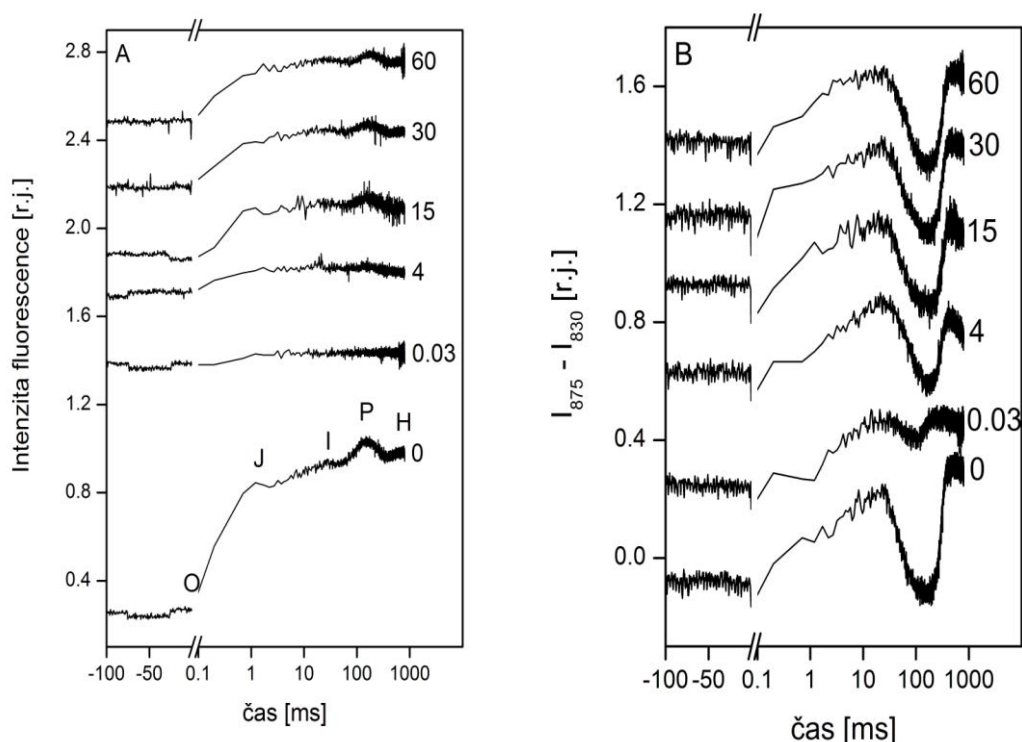
6.4.1. Fotoinhibice rostlin při aerobních podmínkách

6.4.1.1. Fotoinhibice lišejníků při aerobních podmínkách

Pro získání více informací o transportu elektronů za PQ a v PSI po fotoinhibici lišejníků byl studován FIJ zároveň s kinetikou absorpčních změn P700. Zatemněné stélky byly umístěny do plastového pytlíku s navlhčenou vatou, aby nedocházelo k vysychání stélek během měření. Takto připravený vorek byl vložen mezi měřicí hlavy přístroje DUAL-PAM-100 (viz kap. 5.2.2.) a byl zde ponechán po celou dobu měření, aby byla zajištěna stejná geometrie při měření. Fotoinhibice byla navozena červeným aktinickým světlem o intenzitě $1690 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ po dobu 30 min. Saturační pulz byl aplikován 2 s, 4, 15, 30 a 60 minut po fotoinhibici.

Obr. 12A ukazuje, že bezprostředně (2 s) po světelné iluminaci FIJ nabývá svého maxima již ve 2 ms ve fázi J, což značí, že PQ je silně redukován. Tato redukce je způsobena přemírou elektronů v transportním řetězci po vysokém ozáření a přetrvává i po 4 minutách od konce fotoinhibice. Po 4 minutách od konce fotoinhibice není ještě patrný pokles intenzity fluorescence za vlnou P. Tento pokles je viditelný ve FIJ až po 15 minutách od konce fotoinhibice. Po 30 minutách po fotoinhibici se ve FIJ začíná objevovat i nárůstová fáze vlny H, která se s rostoucí dobou zatemnění po fotoinhibici relativně zvyšuje. Průběh FIJ je podobný jako FIJ u stélek lišejníků po fotoinhibici při 4°C měřený na PEA přístroji, kdy se s rostoucím časem po fotoinhibici také relativně zvyšuje zastoupení vlny H (viz obr. 5). Obr. 12B prokazuje, že přechodná redukce P700 po 2 s zatemnění po světelné iluminaci nebyla tak výrazná jako u kontrolních vzorků, jelikož působením aktinického světla byla aktivovaná akceptorová strana PSI, která nedovoluje tak výraznou akumulaci redukováného P700. Navíc funkce PSII je po fotoinhibici utlumena. PSII není schopen dodávat elektrony v plném rozsahu tak jako před fotoinhibicí. V měření absorpčních změn po 4 minutách zatemnění po fotoinhibici pozorujeme silnější redukci P700 ve srovnání s redukcí P700 viditelnou 2 s po fotoinhibici. Náběh finální oxidace P700 po 4 minutách od konce fotoinhibice nastává ve stejnou dobu jako u kontroly, narozdíl od odezvy pozorované po 2 s po fotoinhibici, kdy se reoxidace P700 objevila už v dřívějších časech. To naznačuje zvýšenou inaktivaci akceptorové strany PSI v krátkých časech s rostoucí dobou zatemnění po

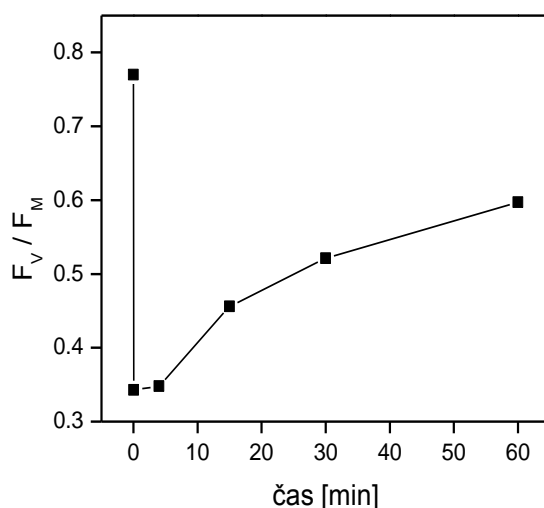
fotoinhibici. Kinetika absorpčních změn se tak s rostoucí dobou zatemnění stále více přibližuje kontrolnímu měření před fotoinhibicí.



Obr. 12. FIJ (A) a kinetika absorpčních změn P700 (B) pro stélky *Umbilicaria hirsuta* měřené pomocí saturačních pulzů aplikovaných na stélky před fotoinhibicí (0) a 2s, 4, 15, 30 a 60 minut po fotoinhibici navozené aktinickým světlem o intenzitě $1690 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 30 minut. Číselné údaje vyjadřují čas po fotoinhibici v minutách. Signál v záporných časech je úměrný fluorescenci F_0 . Fluorescenční indukční křivky jsou posunuty o konstantní hodnotu.

Grouneva a kol. (2009) provedli podobná měření na rozsivkách *Phaeodactylum tricorutum*, u kterých se ve FIJ také objevuje vlna H. Tito autoři také pozorovali po fotoinhibičním působení ve FIJ u rozsivek nárůst intenzity fluorescence ve vlně J značící výraznou redukci PQ. Tito autoři se domnívají, že redukce PQ nastává díky chlororespiraci, kdy dochází k donaci elektronů na PQ z NADPH přes NADPH dehydrogenazu (Ndh). K tomu podle Grounevy a kol. přispívá i to, že v měření kinetiky absorpčních změn P700 se po fotoinhibici objevuje přechodná redukce P700, která by měla být detegována jen v kinetice absorpčních změn P700 u na tmu adaptovaných rozsivek, u kterých je na počátku měření FIJ inaktivovaná akceptorová strana PSI. Přechodná redukce P700 ale může být způsobena slabou donací elektronů z PSII, jehož funkce je sice po fotoinhibici utlumena, ale i tak je schopen dodávat alespoň malé

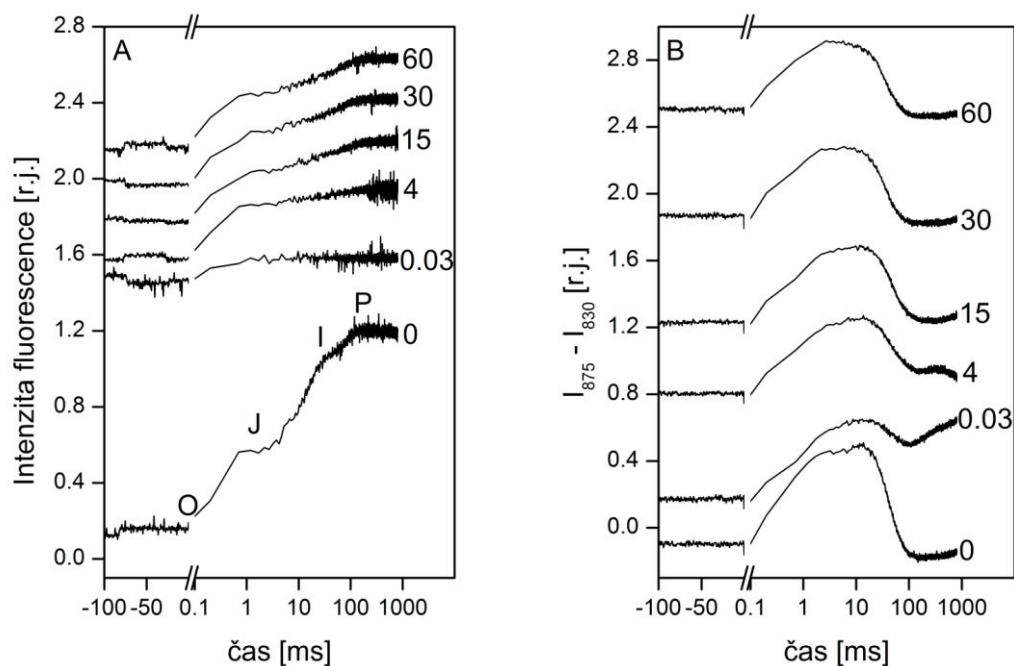
množství elektronů. S přibývajícím dobou zatemnění se obnovuje jak funkce PSI, tak funkce PSII. Do 15 minut od ukončení fotoinhibice je pravděpodobně vlna H snížena díky pomalejší donaci elektronů z endogenních reduktantů na PQ. S rostoucí dobou zatemnění po fotoinhibici se donace elektronů z endogenních reduktantů na PQ opět zvyšuje a tím dochází k relativnímu nárůstu vlny H. V oblasti 200-800 ms, kdy se objevuje vlna H, není P700 po 4 minutách po fotoinhibici kompletně oxidováno, zatímco u kontroly a po 30 a více minutách po fotoinhibici je P700 již úplně oxidováno a objevuje se zároveň vlna H. Na základě těchto poznatků můžeme vyslovit hypotézu, že k nárůstu vlny H ve FIJ dochází, když je P700 kompletně oxidovaný. Zlepšování funkce PSII po fotoinhibici sledujeme i v postupném růstu parametru F_V/F_M , vyhodnocovaného z naměřených FIJ (Obr. 13). Zatemněné kontrolní vzorky vykazují normální hodnoty F_V/F_M (kolem 0.8), bezprostředně po fotoinhibici je hodnota tohoto parametru již značně snížena. Jak se funkce PSII po fotoinhibici postupně obnovuje, zvyšují se i hodnoty F_V/F_M . Dosáhl-li parametr F_V/F_M hodnoty $\sim 0,5$, došlo také k vytvoření vlny H. Ani hodina zatemnění po fotoinhibičním působení však nestačila k úplné obnově funkce PSII. Pokles parametru F_V/F_M je typickou reakcí na stres, a to nejen na vysokou ozářenost (viz kap. 3.1.), ale také na stres suchem, vysokou teplotou nebo expozicí těžkými kovy (Václavík a Barták 2006).



Obr. 13. Závislost parametru F_V/F_M na době po fotoinhibici navozené aktinickým světlem o intenzitě $1690 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 30 minut. Hodnota v čase 0 minut odpovídá kontrolním, nefotoinhibovaným stélkám *Umbilicaria hirsuta*.

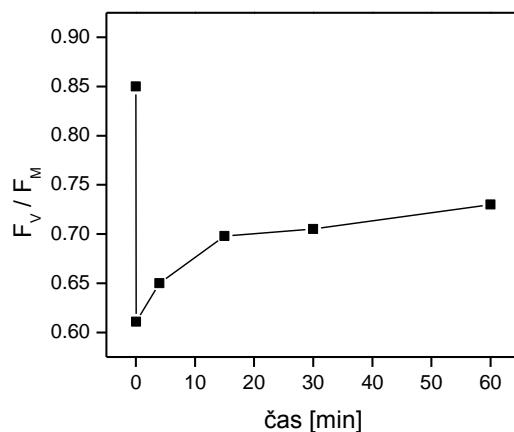
6.4.1.2. Fotoinhibice huseníčku rolního při aerobních podmínkách

Pro srovnání FIJ a kinetiky absorpčních změn P700 po fotoinhibici u lišejníků a vyšších rostlin bylo provedeno měření na listu huseníčku rolního za stejných podmínek. FIJ u kontrolních listů adaptovaných na tmu vykazuje typický průběh O-J-I-P (Schansker a kol. 2003), což nám ukazuje obr. 14A. Bezprostředně (2 s) po fotoinhibici FIJ dosahuje svého maxima už po 2-3 ms v J fázi, stejně jako u lišejníku, což poukazuje na silnou redukci PQ. Z měření absorpčních změn P700 je na obr. 14B zřejmé, že po 2 s po fotoinhibici nedochází k tak výrazné redukci P700, jelikož je již světlem aktivovaná akceptorová strana, která brání akumulaci redukovaného P700. V kinetice absorpčních změn po 2 s po fotoinhibici je patrné jen malé zvlnění v intervalu 30-800 ms, které značí mírnou redukci P700 díky slabé donaci elektronů z PSII, jehož funkce byla fotoinhibičním působením značně utlumena. Ke stejnému jevu dochází i u lišejníku *Umbilicaria hirsuta* (viz kap. 6.4.1.1.). S prodlužující se dobou zatemnění po fotoinhibici dochází k postupné inaktivaci akceptorové strany PSI, což se projevuje stále silnější redukcí P700 v intervalu 20-300 ms. Mezi 4 -15 minutami po fotoinhibici se kinetika absorpčních změn i FIJ již výrazně podobají kinetikám absorpčních změn P700 a FIJ u kontrolních vzorků. V kinetice absorpčních změn P700 u vyšších rostlin nepozorujeme finální oxidaci P700 v intervalu 300-500 ms, jelikož u vyšších rostlin není v těchto časech aktivováno FNR (viz kap. 2.1.2.). Nedávné studie týkající se FNR naznačují, že u vyšších rostlin je většina FNR vázáno k tylakoidní membráně pomocí dvou proteinů zvaných Tic62 a TROL. U nižších rostlin se tyto komplexy nevyskytují (Mulo 2010). Vazba FNR na tylakoidní membrány je regulována indukovanou změnou redoxního stavu stromatu chloroplastu. Ve tmě je FNR spíše navázáno k tylakoidní membráně, zatímco na světle dochází k jeho uvolnění do stromatu (Benz a kol. 2010, Mulo 2010). Právě světlem indukované vyvázání FNR z tylakoidní membrány a tedy jeho zapojení do oxidace Fd může být zdrojem finální oxidace (300-800 ms) P700, kterou pozorujeme bezprostředně (2 s) po fotoinhibici. S rostoucí dobou po fotoinhibici se FNR pravděpodobně opět váže na tylakoidní membránu a akceptorová strana PSI je inaktivována.



Obr. 14. FIJ (A) a kinetika absorpčních změn P700 (B) pro listy huseníčku rolního měřené pomocí saturačních pulzů aplikovaných před fotoinhibicí (0) a 2s, 4, 15, 30, 60 minut po fotoinhibici navozené aktinickým světlem o intenzitě $1690 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 30 minut. Číselné údaje vyjadřují čas po fotoinhibici v minutách. Signál v záporných časech je úměrný fluorescenci F_0 . Fluorescenční indukční křivky jsou posunuty o konstantní hodnotu.

Na obr. 15 je z naměřených FIJ vyhodnocen parametr F_V/F_M v závislosti na době po fotoinhibici pro listy huseníčku. Průběh této závislosti má podobný trend jako u lišejníku (viz obr. 13). Ani zde hodina zatemnění nestačí ke kompletní obnově funkce PSII.



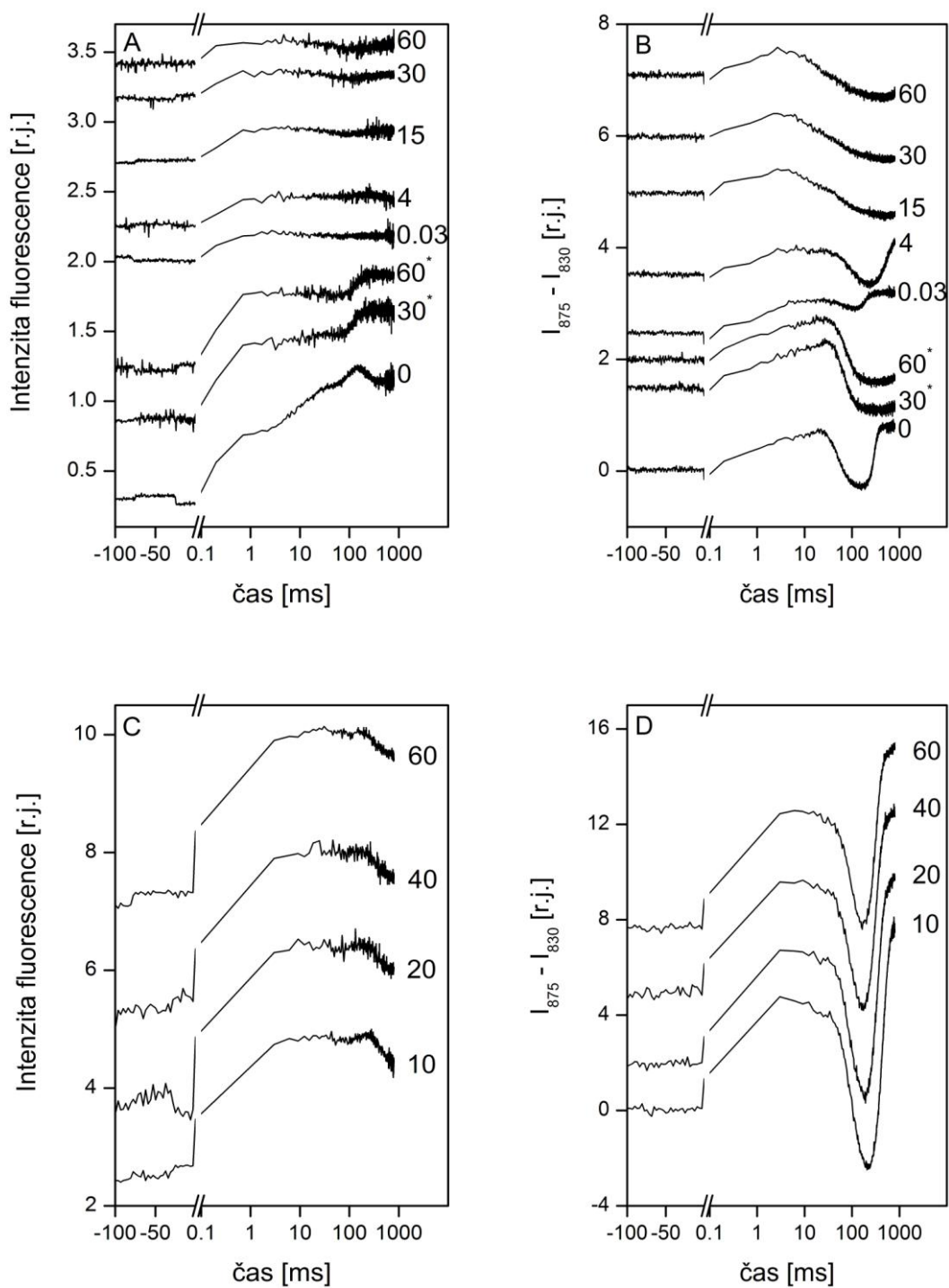
Obr. 15. Závislost parametru F_V/F_M na době po fotoinhibici navozené aktinickým světlem o intenzitě $1690 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 30 minut. Hodnota v čase 0 minut odpovídá kontrolním, nefotoinhibovaným listům huseníčku rolního.

6.4.2. Fotoinhibice rostlin při anaerobních podmínkách

6.4.2.1. Fotoinhibice lišejníku při anaerobních podmínkách

Autoři Cruz a kol. (2010) provedli měření FIJ a kinetiky absorpčních změn P700 za anaerobních podmínek u rozsivek, u kterých se ve FIJ také vyskytuje vlna podobná vlně H. Na základě podobnosti FIJ u rozsivek a lišejníků jsme zkoumali vliv fotoinhibice na FIJ a kinetiku absorpčních změn P700 též za anaerobních podmínek. Zatemněné stélky *Umbilicaria hirsuta* byly umístěny do plastového pytlíku s navlhčenou vatou, aby nevysychaly. Takto připravené vzorky byly vloženy mezi měřicí hlavy přístroje DUAL-PAM-100 (viz kap. 5.2.2.) a byly zde ponechány po celou dobu měření, aby byla zajištěna stejná geometrie při měření. Do pytlíku byl foukán dusík, aby bylo zamezeno přístupu kyslíku ke vzorkům. Nejdříve byly vzorky ponechány po dobu jedné hodiny v dusíkové atmosféře a po uplynutí této doby byla navozena fotoinhibice červeným aktinickým světlem o intenzitě $1690 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 30 minut. Saturací pulz byl aplikován po 2 s, 4, 15, 30 a 60 minutách od konce fotoinhibice. Poté byl pytlík otevřen a byly měřeny FIJ a kinetika absorpčních změn P700 po 10, 20, 30 a 60 minutách pobytu vzorků na vzduchu.

Již samotné působení dusíkové atmosféry dramaticky změnilo průběh křivek FIJ i kinetiky absorpčních změn P700. Obr. 16A ukazuje, že už po 30 minutách působení anaerobních podmínek není ve FIJ přítomna fáze J-I, což značí, že nedochází k transportu elektronů z Q_A na PQ, jelikož PQ je redukováno endogenními reduktanty. Strmý nárůst fáze I-P značí redukci Fd. Můžeme si také všimnout, že ve FIJ nedochází za anaerobních podmínek k poklesu intenzity fluorescence za vlnou P, což pravděpodobně značí zvýšenou inaktivaci akceptorové strany PSI. Zvýšenou inaktivaci PSI nám také potvrzuje kinetika absorpčních změn P700 na obr. 16B, kde není už po 30 minutách působení anaerobních podmínek viditelná finální oxidace P700 v intervalu 200-600 ms (Cruz a kol. 2010, objeveno u rozsivek). Následná 30 minutová fotoinhibice stále za anaerobních podmínek způsobila význačné změny hlavně v průběhu kinetiky absorpčních změn P700. Fotoinhibiční působení za anaerobních podmínek se projevilo opětovnou oxidací P700 v intervalu 200-600 ms stejně jako za aerobních podmínek (viz kap. 6.3.1.) jak lze usoudit z kinetiky absorpčních změn P700 naměřené 2 s po fotoinhibici. Malé zvlnění v redoxním stavu P700 v intervalu 50-200 ms lze stejně jako v případě aerobní fotoinhibice vysvětlit zhoršením donace elektronů z PSII.



Obr. 16. FIJ (A, C) a kinetika absorpčních změn P700 (B, D) pro stélky *Umbilicaria hirsuta*. Měření pomocí saturačních pulzů aplikovaných na stélky v průběhu působení anaerobních podmínek (A, B) a při následném působení aerobních podmínek (C, D). A a B zobrazuje křivky před fotoinhibicí (0, 30* a 60*) a po fotoinhibici. Číselné hodnoty značí čas v minutách. Fotoinhibice byla navozena aktinickým světlem o intenzitě $1690 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 30 minut. Signál v záporných časech je úměrný fluorescenci F_0 . Fluorescenční indukční křivky jsou posunuty o konstantní hodnotu.

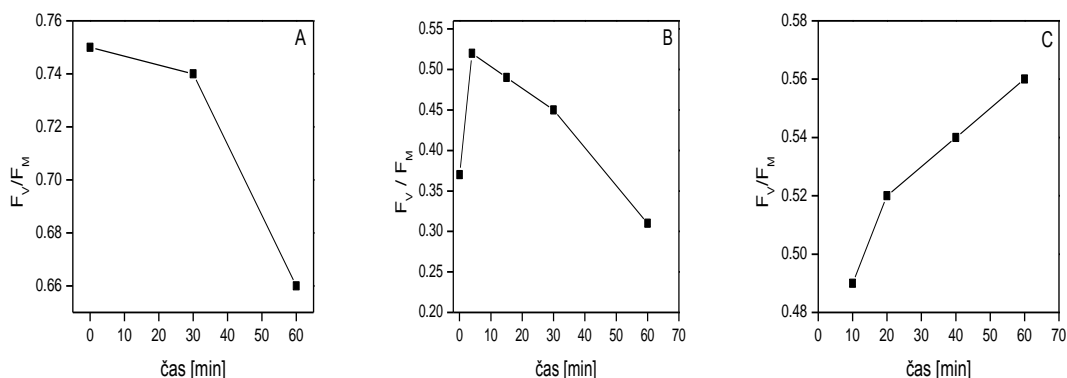
Zde navíc k redukci PSII mohou přispívat endogenní reduktanty, které redukují PQ (viz výše). Díky aktivované akceptorové straně PSI aktinickým světlem jsou však tyto elektrony transportovány dál v elektronovém transportním řetězci, což se projevuje ve vysokém stupni oxidace P700 v celém intervalu 10-800 ms. Po 4 minutách zatemnění po fotoinhibici pozorujeme přechodnou redukci P700 následovanou finální oxidací P700, která však probíhá ve srovnání s kontrolním vzorkem pomaleji. Od 15. minuty po fotoinhibici finální oxidace P700 zcela chybí, v kinetice absorpčních změn P700 je viditelná jen pomalá redukce P700 pravděpodobně elektrony z PSII. Po 15 minutách po fotoinhibici tedy znovu dominuje inhibice akceptorové strany PSI. Po celou dobu zatemnění po fotoinhibici je fotochemie PSII silně inhibována, jak lze usoudit z relativně nízké hodnoty F_v (obr. 16A) a skutečnosti, že maximální intenzita fluorescence FIJ je dosažena již ve vlně J. I po hodině od ukončení působení anaerobních podmínek (obr. 16CD) je PQ stále redukovaný, což lze vyvodit z toho, že maximum intenzity fluorescence nabývá FIJ ve vlně J. Ve všech FIJ měřených u vzorků lišejníku za aerobních podmínek po fotoinhibici si můžeme všimnout poklesu za vlnou P, který je pravděpodobně způsoben aktivací FNR. Tomu napovídá i kinetika absorpčních změn P700, ve které se po přechodné redukci P700 objevuje finální oxidace P700. Kinetika absorpčních změn P700 se tedy za působení aerobních podmínek velmi rychle obnovila. Již po 10 minutách je kinetika P700 podobná kinetice P700 na počátku měření. Nárůst vlny H však ve FIJ u stélek na vzduchu nepozorujeme, i když je finální oxidace P700 obnovena.

Podobná měření provedli Cruz a kol. (2010) na rozsivkách *Thalassiosira pseudonana*, u kterých se ve FIJ také vyskytuje vlna podobná vlně H. Autoři navíc zjistili, že po infiltraci vzorků DCMU se kinetika absorpčních změn při působení anaerobních podmínek prakticky nezměnila, z čehož usoudili, že redukce P700 v průběhu měření FIJ nebyla způsobena elektrony z PSII, ale byla způsobena endogenními reduktanty. Podobně jako u našich měření po 30 minutách na vzduchu byly jak FIJ, tak kinetika absorpčních změn P700 téměř kompletně obnoveny.

Obecně anaerobní podmínky blokují jak mitochondriální respiraci, tak respiraci probíhající v chloroplastech (viz např. Cruz a kol. 2010). Za těchto podmínek se hromadí v buňkách NADPH (Haldimann a Tsimilli-Michael 2002), které inhibuje elektronový transport jednak díky redukci PQ a jednak díky inhibici FNR na akceptorové straně PSI, což se projevuje ztrátou finální oxidace P700 za anaerobních podmínek. Absence finální oxidace P700 v intervalu 200-800 ms může být vysvětlena i

inhibicí Mehlerovy reakce (viz kap. 2.1.2., Cruz a kol. 2010), což by mohlo souviset se ztrátou poklesu za vlnou P ve FIJ při anaerobních podmínkách. Při našem měření za anaerobních podmínek lze aktivaci finální oxidace P700 po fotoinhibičním působení přisoudit oxidaci NADPH stimulováním Calvinova cyklu. S rostoucí dobou zatemnění po fotoinhibici se za anaerobních podmínek opět hromadí NADPH, které inaktivuje akceptorovou stranu PSI, což se projevuje absencí finální oxidace P700. Po navrácení aerobních podmínek došlo při našich měřeních k téměř okamžité aktivaci finální oxidace srovnatelné s kontrolou, což můžeme vysvětlit tím, že se za aerobních podmínek obnovila i aktivita mitochondrií.

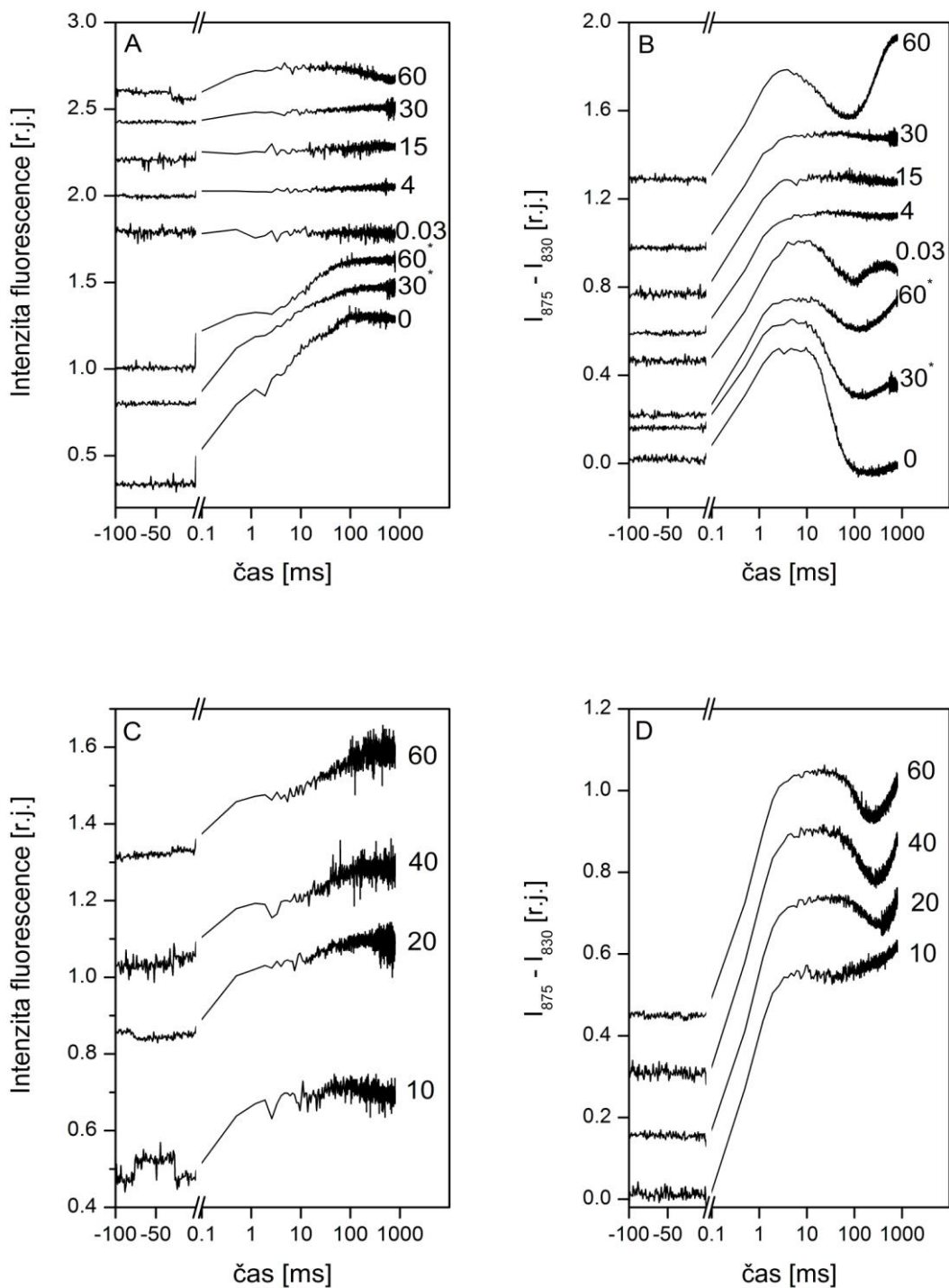
Z FIJ naměřených před a po fotoinhibičním působení za anaerobních a následných aerobních podmínek jsme vyhodnotili parametr F_V/F_M . V dusíkové atmosféře hodnota F_V/F_M klesla na hodnotu 0,66 (obr. 17A). Bezprostředně (2 s) po fotoinhibici se jeho hodnota snížila až na 0,35. Po 4 minutách po fotoinhibici jsme naměřili vyšší hodnotu, která s prodlužující se dobou po fotoinhibici opět nečekaně klesala (obr. 17B). Teprve za aerobních podmínek začala hodnota F_V/F_M růst (obr. 17C)



Obr. 17. Závislost parametru F_V/F_M na době působení anaerobních podmínek na stélky *Umbilicaria hirsuta* (A), na době po fotoinhibici navozené aktinickým světlem o intenzitě $1690 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 30 minut (B) a na době pobytu stélek v aerobních podmínkách (C).

6.4.2.2. Fotoinhibice huseníčku rolního při anaerobních podmínkách

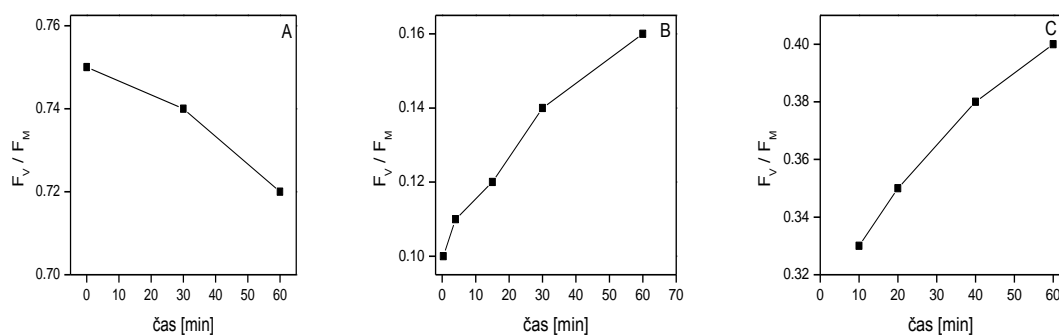
Bylo provedeno také srovnávací měření FIJ a kinetiky absorpčních změn P700 při anaerobních podmínkách na huseníčku rolním, zástupci vyšších rostlin. Působení anaerobních podmínek na FIJ i absorpční změny P700 se projevuje u huseníčku jinak než u lišejníku (srovnej 18A, B s 16A, B). Narozdíl od lišejníku nedochází k inhibici přenosu elektronů z Q_B na PQ, jak lze usoudit z kinetiky FIJ během hodinového působení dusíkové atmosféry. Fáze J-I je v FIJ stále přítomna. Z FIJ naměřených u listů huseníčku jsme vyhodnocovali parametr F_V/F_M . Hodnota tohoto parametru v průběhu měření za anaerobních podmínek mírně klesala (viz obr. 19A). Obr. 18B ukazuje, že po 60 minutách působení anaerobních podmínek je v kinetice absorpčních změn P700 patrné mírné zvlnění v intervalu 20-800 ms naznačující pouze přechodnou redukci P700 elektrony z PSII. Toto snižování redukce P700 v průběhu měření FIJ ukazuje na postupnou aktivaci akceptorové strany PSI. Aktivace funkce akceptorové strany PSI může být způsobena např. aktivací FNR. Následující 30 minutová fotoinhibice červeným aktinickým světlem utlumila funkci PSII, FIJ jsou prakticky konstantní a i hodnota parametru F_V/F_M je velmi nízká (obr. 19B). S rostoucí dobou zatemnění po fotoinhibici se však hodnota parametru F_V/F_M na rozdíl od lišejníku zvyšuje (srovnej s obr. 17B). V kinetice absorpčních změn P700 můžeme po 2 s zatemnění po fotoinhibici vidět slabou přechodnou redukci P700 v intervalu 20-600 ms, která může být způsobena přicházejícími elektrony z PSII. Jelikož je však funkce PSII výrazně snížena, je možné, že za tuto redukci P700 jsou odpovědné endogenní reduktanty. Narozdíl od lišejníku po 4 minutách po fotoinhibici zůstává P700 v intervalu 20-800 ms kompletně oxidován, neobjevuje se žádná přechodná redukce P700. Vysvětlení tohoto jevu může být v utlumené funkci PSII, který nedodává elektrony na PSI. K redukci P700 nedochází ani endogenními reduktanty. P700 přetrvává v intervalu 20-800 ms v oxidovaném stavu ještě po 30 minutách po fotoinhibici. Po 60 minutách od konce fotoinhibice se již pravděpodobně obnovila funkce PSII, o čemž vypovídá přechodná redukce P700. Za přechodnou redukcí P700 následuje finální oxidace P700 ukazující, že akceptorová strana PSI je aktivovaná pravděpodobně vlivem anaerobních podmínek jako tomu bylo po 60 minutovém pobytu huseníčku v dusíkové atmosféře.



Obr. 18. FIJ za anaerobních podmínek (A) a na vzduchu (C) a kinetika absorpčních změn P700 za anaerobních podmínek (B) a na vzduchu (D) pro listy huseníčku rolního. Měření pomocí saturačních pulzů aplikovaných na listy huseníčku v průběhu působení anaerobních podmínek (A, B) a při následném působení aerobních podmínek (C, D). A a B zobrazuje křivky před fotoinhibicí (0, 30^{*} a 60^{*}) a po fotoinhibici. Číselné hodnoty značí čas v minutách. Fotoinhibice byla navozena aktinickým světlem o intenzitě 1690 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 30 minut. Signál v záporných časech je úměrný fluorescenci F_0 . Fluorescenční indukční křivky jsou posunuty o konstantní hodnotu.

Na obr. 18CD jsou zobrazeny FIJ a kinetika absorpčních změn P700 měřené na listech huseníčku při aerobních podmínkách po navrácení huseníčku do atmosféry s kyslíkem. V kinetice absorpčních změn P700 je patrné zvlnění, značící přechodnou redukci P700 díky donaci elektronů z PSII, jehož funkce je stále i po 60 minutách v aerobních podmínkách částečně inhibována (viz obr. 18C). Částečnou inhibici funkce PSII potvrzují i hodnoty parametru F_V/F_M vyhodnocené z FIJ měřených u listů huseníčku v atmosféře s kyslíkem (viz obr. 19C). Hodnota tohoto parametru se s rostoucí dobou působení aerobních podmínek sice zvyšovala, ale ani 60 minut na vzduchu nestačilo k úplné obnově funkce PSII. Finální oxidace P700, následující za přechodnou redukcí, značí aktivaci akceptorové strany PSI. Aktivaci akceptorové strany PSI ve tmě je možné dát do souvislosti se změnou redoxního stavu stromatu chloroplastů, která podle literatury (Benz 2010) může regulovat aktivitu FNR.

Podobná měření FIJ za anaerobních podmínek provedli Haldimann a Strasser (1999) u hrachu setého. Narozdíl od nás pozorovali, že po 60 minutách působení anaerobních podmínek FIJ dosáhl svého maxima už ve 2 ms ve vlně J, což značí redukcí PQ. Zjistili tedy, že FIJ se velmi podobá FIJ získanému při měření s vzorky infiltrovanými DCMU, kde maximum fluorescence je dosaženo ve fázi J díky zablokování elektronového transportu za Q_A .



Obr. 19. Závislost parametru F_V/F_M na době působení anaerobních podmínek na list huseníčku rolního (A), na době po fotoinhibici navozené aktinickým světlem o intenzitě $1690 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 30 minut (B) a na době pobytu listů v aerobních podmínkách (C).

7. Závěr

Cílem této práce bylo popsat FIJ u lišejníku *Umbilicaria hirsuta* obsahující řasu *Trebouxia*, u kterého se v rámci FIJ v 0.4-2 s vyskytuje neobvyklá vlna H. V této práci byl analyzován zejména vliv fotoinhibice na neobvyklou vlnu H za aerobních i anaerobních podmínek. Ke studiu vlivu fotoinhibice na průběh fluorescence chlorofylu bylo použito současné měření FIJ a kinetiky absorpčních změn P700, které umožňuje zkoumat fotoinhibici rostlin na úrovni tylakoidních membrán. Výsledky byly porovnávány s výsledky naměřenými u huseníčku rolního jako zástupci vyšších rostlin.

Pokles v FIJ za vlnou P (před vlnou H) u lišejníku je pravděpodobně podle našeho názoru způsoben rychlejší aktivací FNR, jelikož tato fáze v FIJ odpovídá reoxidaci P700 (viz také Ilík a kol. 2006). Ve FIJ u huseníčku se časný pokles za vlnou P v FIJ neobjevuje, protože k aktivaci FNR u vyšších rostlin dochází až později (Schansker a kol. 2003). Působení anaerobních podmínek u lišejníku způsobuje inhibici akceptorové strany PSI, která se projevuje ztrátou poklesu za vlnou P. Po reoxygenaci se akceptorová strana PSI opět aktivuje.

Naše měření dále potvrdila, že vlivem fotoinhibice dochází k dočasnému snížení vlny H (Ilík a kol. 2008), která se s přibývajícím dobou zatemnění po fotoinhibici vůči vlně P relativně zvyšuje. Nárůst vlny H není doprovázen změnou v redoxním stavu P700, tedy jeho příčinou je pravděpodobně příliv endogenního reduktantu, který redukuje PQ. Po fotoinhibici zřejmě dochází ke snížení donace elektronů na PQ v intervalu 0,4-2 s a s rostoucí dobou zatemnění po fotoinhibici se postupně donace elektronů na PQ zvyšuje, což se projevuje v relativním nárůstu vlny H ve FIJ. Z našich výsledků můžeme vyvodit, že vlna H se objevuje vždy, když parametr F_V/F_M dosahuje hodnoty minimálně 0,5 (pro nižší F_V/F_M vlnu H v FIJ nepozorujeme) a zároveň když je P700 oxidovaný. Vlna H je tedy zřejmě zapříčiněna elektrony, které redukují PQ a mají původ v PSII. Z dosažených výsledků nejsme schopni určit, zda je za vlnu H odpovědné NADPH nebo nějaký jiný endogenní reduktant.

Na základě experimentů prováděných v anaerobních podmínkách je možné zjistit, jak tyto anaerobní podmínky ovlivňují redoxní děje na úrovni PSII a PSI. Měření FIJ a kinetiky absorpčních změn P700 u lišejníku odhalilo, že anaerobní podmínky inhibují aktivaci akceptorové strany PSI díky hromadícímu se NADPH. Po fotoinhibici, kdy je NADPH spotřebováno činností Calvinova cyklu se akceptorová strana v průběhu měření FIJ aktivuje, což způsobuje i ztrátu poklesu za vlnou P ve FIJ. Při zatemnění po

fotoinhibici je aktivita FNR pravděpodobně opět inhibována a je obnovena až po navrácení stélky lišejníku do atmosféry s kyslíkem, kdy je také ve FIJ patrný pokles za vlnou P. Při anaerobních podmínkách nedocházelo k nárůstu vlny H, jelikož aby došlo k tomuto nárůstu, je nejdříve nutné, aby mu předcházel pokles intenzity fluorescence za vlnou P. Odlišné výsledky byly naopak získány při měření za anaerobních podmínek s huseníčkem rolním, zástupcem vyšších rostlin. U vyšších rostlin naopak anaerobní podmínky akceptorovou stranu aktivují, což je patrné z kinetiky absorpčních změn P700. Tuto aktivaci akceptorové strany PSI je možné dát do souvislosti se změnou redoxního stavu stromatu chloroplastu. Změna redoxního stavu stromatu v chloroplastu může způsobit vyvázání FNR z TROL komplexu vázaného na tylakoidní membrány (Benz a kol. 2010) a tím jeho aktivaci. Jestli je rychlejší aktivace FNR opravdu odpovědná za pokles v intenzitě fluorescence bude možné v budoucnu ověřit pomocí měření na mutantním huseníčku rolním, u kterého se nevyskytuje v tylakoidních membránách TROL komplex. Pokud by se opravdu ve FIJ změřeném na takovém vzorku objevil časný pokles za vlnou P jako u lišejníku, naše hypotéza o vztahu časného poklesu za vlnou P a aktivací FNR bude prokázána.

8. Seznam literatury

Benz J. P, Cintala M, Soll J, Mulo P, Bolter B (2010) A new concept for ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. Trends in Plant Science Vol. 15 No. 11

Bukhov G. N, Govindachary S (2004) Recovery of photosystem I and II activities during re-hydration of lichen *Hypogymnia physodes* thalli. Planta 219, 110-120

Cruz S, Goss R, Wilhelm Ch, Leegood R, Horton P, Jakob T (2011) Impact of chlororespiration on non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and on the regulation of the diadinoxanthin cycle in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. Journal of Experimental Botany, Vol. 62, No. 2, pp. 509-519

Grouneva I, Jakob T, Wilhelm Ch, Goss R (2009) The regulation of xanthophyll cycle activity and non-photochemical fluorescence quenching by two alternative electron flows in the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Cyclotella meneghiniana*. Biochimica et Biophysica Acta 1787, 929-938

Haldimann P, Strasser J. R (1999) Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise kinetics in pea (*Pisum sativum* L.). Photosynthesis Research 62, 67-83

Haldimann P, Tsimilli-Michael M (2002) Merkury inhibits the non-photochemical reduction of plastoquinone by exogenous NADPH and NADH: evidence from measurement of the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise in spinach chloroplasts. Photosynthesis Research 74, 37-50

Hill R, Ralph J. P (2006) Photosystem II heterogeneity of *in hospite* zooxanthellae in scleractinian corals exposed to bleaching conditions. Photochemistry and Photobiology 82, 1577-1585

Ilík P, Schansker G, Kotabová E, Váczi P, Strasser J. R, Barták M (2006) A dip in the chlorophyll fluorescence induction at 0,2-2 s in *Trebouxia*- possessing lichens reflects a fast reoxidation of photosystem I. A comparison with higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757, 12-20

Ilík P, Váczi P, Schansker G, Barták M (2008) The unusual step in chlorophyll fluorescence induction of lichens can be observed also in some higher plants. *Book of Abstracts Physiologia Plantarum* volume 133 P08-023

Kotabová E (2007) Mechanismy zapojené do ochrany fotosyntetického aparátu při oxidativním poškození. *Disertační práce, UP Olomouc*

Kranner I, Beckett R, Hochman A, Nash III H. T (2008) Desiccation tolerance in lichens: A review. *The Bryologist* 111(4), pp. 576-593

Kranner I., Cram W.J., Zorn M., Wornik S., Yoshimura I., Stabentheiner E., Pfeifhofer H.W. (2005). Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102: 3141-3146.

Krulová J (2007) Biochemické a fyziologické markery antropogenního stresu. *Disertační práce, MU Brno*

Lazár D (2006) The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology* 33, 9-30

Lazár D (2009) Modelling of light-induced chlorophyll *a* fluorescence rise (O-J-I-P transient) and changes in 820 nm-transmittance signal of photosynthesis. *Photosynthetica* 47, 483-497

Mulo P (2010) Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR): structure, function and location. *Biochimica and Biophysica Acta*.

Nash III H. T (2008) Lichen biology. Cambridge University Press. United Kingdom. ISBN:978-0-521-69216-8

Palmquist K (2000) Carbon economy in lichens. *New Phytol.* 148, 11-36

Roháček K (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning and mutual relationships. *Photosynthetica* 40, 13-29

Schansker G, Srivastava A, Govindjee and Strasser J. R (2003) Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll *a* fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Functional Plant Biology* 30, 785-796

Váczi P, Barták M (2006) Photosynthesis of lichen symbiotic alga *Trebouxia erici* as affected by irradiance and osmotic stress. *Biologia Plantarum* 50 (2), 257-264

Váczi P (2005) Fyziologické vlastnosti lišejníkových fotobiontů rodu *Trebouxia*. Disertační práce, MU Brno

Vráblíková H (2005) Limitation of Photochemical and Non-photochemical Processes of Photosynthesis in Lichens under Extreme Light. Disertační práce, MU Brno

<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id106822/?taxonid=125211>