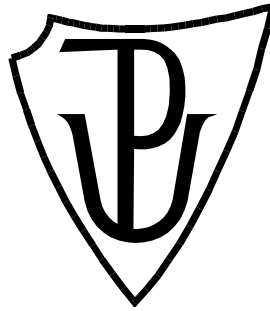


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Změny fotosyntetického aparátu u mutanta ječmene
s nefunkční biosyntézou chlorofylu *b***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Tereza Vánská
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Alexandra Husičková, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 11. 5. 2020

Podpis:

Děkuji vedoucí diplomové práce Mgr. Alexandře Husičkové, Ph.D. za vedení, odbornou pomoc a za ochotu a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat panu docentu Lazárovi, doktoru Chamrádovi a paní magistře Opatíkové za pomoc a rady.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Tereza Vánská
Název práce	Změny fotosyntetického aparátu u mutanta ječmene s nefunkční biosyntézou chlorofylu <i>b</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biofyziky
Vedoucí práce	Mgr. Alexandra Husičková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Mutantní typy rostlin s nedostatkem chlorofylu *b* jsou často využívány ve vědeckých experimentech k výzkumu fotosyntetického aparátu. Chlorofyl *b* má vliv na množství procesů probíhajících v rostlině, mimo jiné ovlivňuje efektivitu a stavbu fotosyntetického aparátu. V diplomové práci byly na základě experimentálních dat srovnávány rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus) a jeho mutantní formy *chlorina f2^{f2}*, která je specifická nedostatkem chlorofylu *b*. Hodnoceny byly obsahy pigmentů, fluorescenční parametry chlorofylu *a*, redoxní stav P700 a plastocyaninu a elektroforetické separace proteinových komplexů tylakoidních membrán. Analýza pigmentů ukázala, že *chlorina* má snížené množství chlorofylů *a* a *b* a karotenoidů oproti přirozenému genotypu ječmene. Na základě hodnocení fluorescenčních parametrů velmi rychlé fluorescenční indukce bylo zjištěno, že *chlorina* má nižší účinnost fotochemie fotosystému II a menší zastoupení světlosběrných antén než přirozený genotyp ječmene setého. Tyto výsledky odpovídaly zjištěné limitaci účinnosti fotochemie fotosystému I u *chloriny* na donorové straně elektronového transportního řetězce. Z výsledků měření zhášecí a relaxační analýzy vyplynulo, že *chlorina* má jinou kinetiku zhášecích procesů než přirozený genotyp a že zhášecí procesy se na zpracování energie podílejí odlišným způsobem. Z elektroforetických separací pigment-proteinových komplexů tylakoidních membrán bylo zřejmé, že *chlorina* netvoří superkomplexy fotosystému II a světlosběrných komplexů II, které byly typické pro přirozeně se vyskytující genotyp ječmene. U *chloriny* bylo zaznamenáno menší množství světlosběrných komplexů a odlišné složení pigment-proteinových komplexů.

Klíčová slova	chlorina, fluorescence chlorofylu, fotochemie, fotosystém I, fotosystém II, světlosběrný komplex, zhášení fluorescence
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Tereza Vánská
Title	Alterations of photosynthetic apparatus in chlorophyll <i>b</i> deficient mutant of barley
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biophysics
Supervisor	Mgr. Alexandra Husičková, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Chlorophyll *b* deficient mutants are often used in scientific experiments to investigate the photosynthetic apparatus. Chlorophyll *b* affects a number of processes taking place in plants, including the efficiency and structure of photosynthetic apparatus. Based on experimental data, plants of barley (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus) and its mutant *chlorina f2^{f2}* were compared in the diploma thesis. Pigment contents, parameters of chlorophyll fluorescence, and redox state of P700 and plastocyanin, and electrophoretic separation of protein complexes of the thylakoid membranes were evaluated. Analysis of pigments showed that *chlorina* had a reduced content of chlorophyll *a* and *b* and carotenoids compared to wild type barley. Based on the fluorescence parameters of very fast fluorescence induction, it was found that *chlorina* has lower efficiency of the photochemistry of photosystem II and smaller amount of the light-harvesting complexes than the natural genotype of barley. These results corresponded to the observed limitation in electron transfer in photosystem I donor side in *chlorina*. The results of quenching and relaxation analysis showed that *chlorina* had different quenching kinetics than wild type and that the quenching processes participated differently in energy dissipation. From the electrophoretic separations of pigment-protein complexes of thylakoid membranes, it was clear that *chlorina* did not form supercomplexes made of photosystem II and light-harvesting complex II, which are typical in the naturally occurring barley genotype. For *chlorina*, smaller amounts of light-harvesting complexes and different compositions of pigment-protein complexes were noted.

Keywords	<i>chlorina</i> , chlorophyll fluorescence, fluorescence quenching, light-harvesting complex, photochemistry, photosystem I, photosystem II
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD.....	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	11
2.1	Fotosyntetický aparát.....	11
2.1.1	Proteiny tylakoidní membrány.....	11
2.1.1.1	Fotosystém II a světlosběrný komplex II.....	12
2.1.1.2	Fotosystém I a světlosběrný komplex I.....	14
2.2	Deficit chlorofylu <i>b</i>	15
2.3	Fluorescence chlorofylu.....	17
2.3.1	Vybrané fluorescenční parametry.....	19
2.3.1.1	Velmi rychlá fluorescenční indukce.....	19
2.3.1.2	Pomalá fluorescenční indukce.....	19
2.3.1.3	Pulzní amplitudová modulační technika.....	22
2.3.2	Fluorescenční parametry u <i>chloriny</i>	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
3.1	Materiál a metody.....	25
3.1.1	Použité chemikálie.....	25
3.1.2	Použité přístroje a pomůcky.....	25
3.1.3	Rostlinný materiál a podmínky pěstování.....	26
3.1.4	Použité metody.....	26
3.1.4.1	Stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů.....	26
3.1.4.2	Velmi rychlá fluorescenční indukce.....	27
3.1.4.3	Pomalá fluorescenční indukce.....	28
3.1.4.4	Měření redoxního stavu PSI a plastocyaninu.....	29
3.1.4.5	Izolace tylakoidních membrán.....	29
3.1.4.6	Elektroforetická separace proteinů tylakoidní membrány.....	31
3.1.4.6.1	Nativní elektroforéza proteinů tylakoidní membrány.....	31
3.1.4.6.2	Dvojměrná elektroforéza proteinů tylakoidní membrány.....	34
3.1.5	Použité programové vybavení.....	36
3.1.6	Statistická analýza dat.....	36
4	VÝSLEDKY.....	37
4.1	Obsah chlorofylů a karotenoidů.....	37
4.2	Velmi rychlá fluorescenční indukce.....	37
4.3	Pomalá fluorescenční indukce.....	40
4.3.1	Zhášecí analýza.....	40
4.3.2	Relaxační analýza.....	44
4.4	Redoxní stav PSI a plastocyaninu.....	45

4.5	Nativní gelová elektroforéza	48
4.6	Dvojrozměrná gelová elektroforéza	49
5	DISKUSE.....	53
5.1	Obsah pigmentů	53
5.2	Světlosběrné komplexy	54
5.3	Fotosystém II.....	55
5.4	Fotosystém I.....	56
6	ZÁVĚR	58
7	LITERATURA	60
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63

Cíle práce

Teoretická část:

- Vypracovat přehled problematiky zaměřený na stavbu a funkčnost fotosyntetického aparátu u mutantů ječmene s nedostatkem chlorofylu *b*.

Praktická část:

- Zvládnout metodiky izolace tylakoidních membrán a elektroforetických separací pigment-proteinových komplexů.
- Zvládnout metodiku měření redoxního stavu P700 a plastocyaninu.
- Naučit se metodiku relaxační analýzy kvantových výtěžků fotochemických a nefotochemických procesů u fotosystému II.
- Pomocí výše uvedených metod a pomocí metod zvládnutých již pro bakalářskou práci:
 - velmi rychlé indukce chlorofylové fluorescence,
 - zhášecí analýzy kvantových výtěžků fotochemických a nefotochemických procesů u fotosystému II a
 - stanovení obsahu chlorofylů i karotenoidůprovést měření na rostlinách přirozeného i mutovaného genotypu.

1 ÚVOD

Mutantní rostliny s absolutní nebo částečnou blokáci v syntéze chlorofylu *b* jsou častým prostředkem ve výzkumu funkcí a možností ovlivňování fotosyntézy a jsou zdrojem pro pochopení a výzkum fotosyntetického aparátu a jevů na něm probíhajících. Mutanti s nedostatkem chlorofylu *b* mají specifický fenotypový projev, jejich listy mívají typickou žluto-zelenou barvu. V diplomové práci bylo využito rostlin přirozeného genotypu ječmene (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus) a jeho mutantní formy *chlorina f2²*, tento mutant se vyznačuje absolutním nedostatkem chlorofylu *b*. Nedostatek chlorofylu *b* často vede k defektům ve fotosyntéze a v produktivitě.

Porovnání přirozeného genotypu ječmene a jeho mutantní formy s nedostatkem chlorofylu *b* je v této práci založeno na hodnocení stavby a funkčnosti fotosyntetického aparátu. K tomuto účelu byly využity metody založené na měření fluorescence chlorofylu *a*, pulzní amplitudová modulační technika a elektroforetické separace. Na základě měření fluorescenčních parametrů chlorofylu můžeme získat detailní náhled na aktivitu a stav jednotlivých komponent světelné fáze fotosyntézy. Zjišťujeme takto např. efektivitu fotochemie fotosystému II a taktéž jaké procesy a jakou mírou se dále účastní zhášení excitací zachycených fotosystémem II, a tím studujeme i obranné mechanismy rostliny. Zhášení excitací může probíhat buďto formou fotochemického zhášení, nebo neregulovatelnou (pasivní) disipací (fluorescence a tepelná disipace) a taktéž v podobě regulovatelného nefotochemického zhášení. Je zde možnost detailně studovat, jakým způsobem se energie disipuje, i na jakém místě se může nacházet případné poškození fotosyntetického aparátu. Při elektroforetické separaci pigment-proteinových komplexů nás zajímá, jaké proteinové podjednotky se u WT ječmene nachází a u *chloriny* nikoli, popřípadě změna jejich zastoupení. Zaměřujeme se i na proteinové podjednotky, které se u *chloriny* vyskytují, a tudíž můžeme zjišťovat, jak významnou roli hrají ve fotosyntetických procesech.

Mutantní typy rostlin s nedostatkem chlorofylu *b* nemají typické využití v zemědělství, avšak jejich studiem můžeme hlouběji zkoumat procesy světelné fáze fotosyntézy. Účelem studia mutantních rostlin, ať už s poruchou biosyntézy chlorofylu *b* nebo s jinými změnami či nedostatky, je detailnější pochopení důležitosti chybějící složky, která se nachází u přirozeného genotypu rostlin. V případě *chloriny* cílíme na vliv nedostatku chlorofylu *b* na strukturu a funkčnost fotosyntetického aparátu a další pochody s fotosyntézou související. Můžeme tak odhalit vliv chlorofylu *b* na různé aspekty života

rostliny a zjistit tak, jaký má chlorofyl *b* účel v rostlinné populaci s přirozeným genotypem.

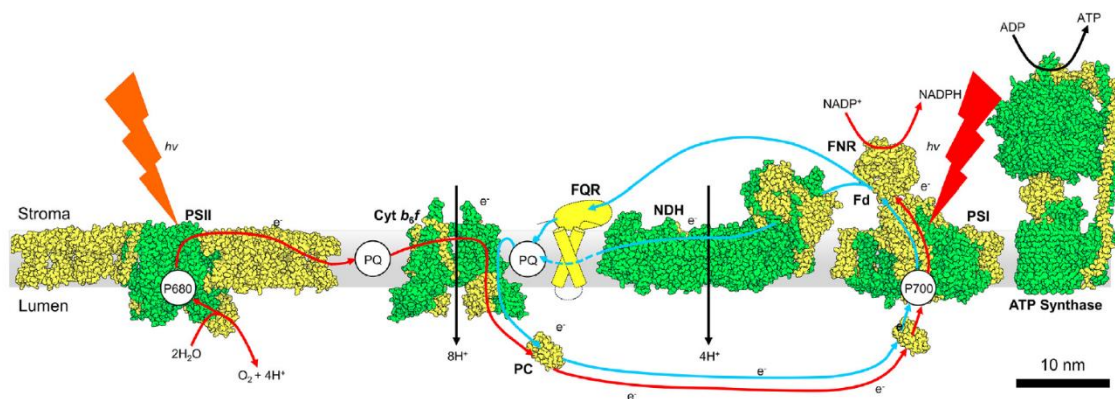
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Fotosyntetický aparát

Listy jsou u vyšších rostlin hlavním místem průběhu fotosyntézy. Asimiláty fotosyntézy jsou nezbytné pro život rostliny, růst listů a dodávku živin pro ostatní rostlinné orgány. Největší část fotosyntetického aparátu se nachází na tylakoidních membránách chloroplastů (Nath *et al.*, 2013; Albanese *et al.*, 2016). Dochází zde k sérii fotochemických reakcí, kdy se světelná energie absorbovaná chlorofyly mění na energii chemickou, která může pohánět další metabolické reakce (Nath *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2017).

2.1.1 Proteiny tylakoidní membrány

Tylakoidní membrány nacházející se uvnitř chloroplastů představují membránový systém sestávající z granálních a stromálních tylakoidů. Právě tato uskupení jsou hlavní strukturální komponentou umožňující průběh světelné fáze fotosyntézy u rostlin a řas. V tylakoidních membránách se nachází velké proteinové komplexy, které umožňují přenos a využití světelné energie pro oxygenní fotosyntézu. Tyto proteinové komplexy jsou součástí elektronového transportního řetězce (Obr. 1). Patří mezi ně fotosystémy I a II (PSI a PSII), transport elektronů mezi nimi umožňuje cytochromový komplex *b₆f*. Dalšími proteinovými komplexy, které se účastní elektronového transportu, jsou NDH



Obr. 1 Strukturální model fotosyntetického elektronového transportního řetězce rostlin. Červené šipky představují lineární elektronový transportní řetězec a modré šipky představují cyklický transport. V reakčním centru fotosystému II (PSII) dochází při absorpci k nábojové separaci. Elektron (e^-) se z PSII přenáší přes plastochinon (PQ) na cytochrom *b₆f* (*cyt b₆f*). Dále elektron putuje přes plastocyanin (PC) k fotosystému I (PSI), kde je pro další přenos elektronů opět vyžadována absorpce světla. V lineárním transportním řetězci pak dojde k přenosu elektronu přes ferredoxin (Fd) na ferredoxin-NADP⁺ reduktasu (FNR), kde dochází k redukci NADP⁺. Při cyklickém transportu se elektron z Fd přesouvá přes NADH dehydrogenasa-like komplex (NDH, NADH dehydrogenase-like complex) nebo přes ferredoxin-plastochinon reduktasu (FQR) zpět na PQ a *cyt b₆f*. Při transportu elektronu dochází rovněž k přesunu H⁺ ze stromatu do lumenu tylakoidu a tak se tvoří gradient pH potřebný pro syntézu ATP na ATP syntase. Převzato a upraveno dle McKenzie *et al.* (2020).

komplex (NADH dehydrogenasa-like komplex) a ATP syntasa (Yadav *et al.*, 2017; Lambrev a Akhtar, 2019; McKenzie *et al.*, 2020).

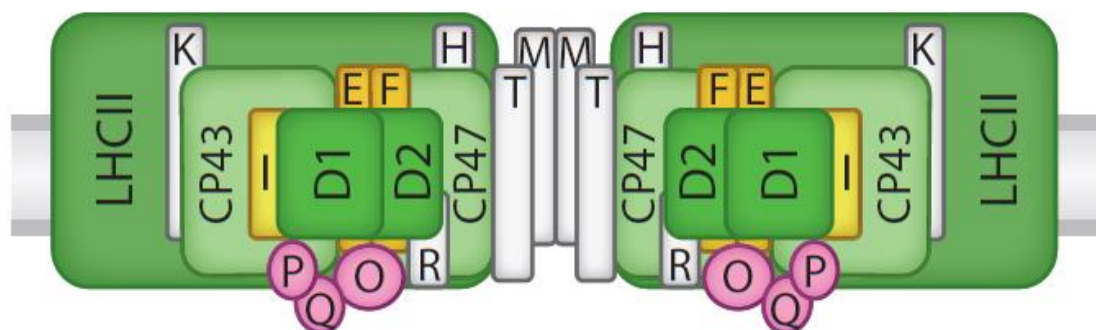
Z výše jmenovaných jsou PSI a PSII nejvíce zastoupenými pigment-proteinovými komplexy, které asociují se specifickými světlosběrnými komplexy (Nath *et al.*, 2013). Klíčovou roli u tvorby reakčních center fotosystémů i světlosběrných komplexů hraje chlorofyl *a*, chlorofyl *b* je důležitou komponentou světlosběrných komplexů (Liu *et al.*, 2004; Nath *et al.*, 2013). U vyšších rostlin přítomné PSII a PSI mají svá typická absorpční maxima. PSII absorbuje maximum světelného záření při vlnové délce 680 nm. U PSI se absorpční maximum nachází u vlnové délky 700 nm.

Následující popis bude cílen právě na PSI a PSII a s nimi asociující světlosběrné komplexy, na které je tato práce zaměřena.

2.1.1.1 Fotosystém II a světlosběrný komplex II

Rostlinný PSII (Obr. 2) je pigment-proteinový komplex tvořený mnoha podjednotkami a je aktivní ve své dimerní formě (Nickelsen a Rengstl, 2013; Albanese *et al.*, 2016). Přednostně je lokalizován v granálních tylakoidních membránách. Sestává z dimerického jádra a rozsáhlého periferního systému antén. Světlosběrný komplex II (LHCII, light harvesting complex II) zastupuje periferní anténní systém superkomplexu PSII (Su *et al.*, 2017; McKenzie *et al.*, 2020). Dohromady tak tvoří superkomplex PSII-LHCII o velikosti 1,3 MDa (Albanese *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2017; McKenzie *et al.*, 2020). PSII-LHCII se mohou laterálně spojovat a tvořit tak ještě rozměrnější PSII-LHCII megakomplexy, jak bylo potvrzeno u hrachu týmem Albanese *et al.* (2016).

Periferní systém antén sbírá světelnou energii a přivádí ji k reakčnímu centru v jádru. Zde dochází za účasti kyslík vyvíjejícího centra k oxidaci vody za vzniku kyslíku



Obr. 2 Složení superkomplexu fotosystému II a světlosběrného komplexu II (LHCII). Šedě jsou označeny nízkomolekulární podjednotky, fialovou barvu mají podjednotky kyslík vyvíjejícího centra. Jednopísmenné zkratky představují Psb podjednotky fotosystému II. Převzato a upraveno dle Nickelsen a Rengstl (2013).

a uvolnění 4 protonů a k redukci plastochinonu, který přenáší elektrony dále do elektronového transportního řetězce (McKenzie *et al.*, 2020) (Obr. 1).

Složení a struktura PSII je častým tématem vědeckých experimentů. Albanese *et al.* (2016) izolovali PSII-LHCII megakomplexy hrachu a charakterizovali je s pomocí proteomické analýzy a elektronové mikroskopie. Při experimentech izolovali megakomplexy a ty rozdělili za použití modré nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy na gelech s velkými póry (IpBN-PAGE) a také pomocí dvojrozměrné polyakrylamidové gelové elektroforézy za použití dodecylsulfátu sodného (2D SDS-PAGE). Spoty a pásy byly poté vyřezány a analyzovány systémem kapalinové chromatografie s navazující tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Provedli rovněž transmisní elektronovou mikroskopii megakomplexů a zjistili, že 2 PSII-LHCII megakomplexy jsou umístěné vedle sebe v rovině membrány a interagují s druhou převrácenou dvojicí stejného typu megakomplexů a vytváří tak sendvičovou strukturu.

McKenzie *et al.* (2020) zjišťovali stechiometrii proteinových komplexů ve fotosyntetických membránách rostlin. Určili poměry všech hlavních komplexů elektronového transportního řetězce v tylakoidech u *Arabidopsis* pomocí techniky založené na kvantitativní hmotnostní spektrometrii. Určením poměrů obsahů proteinových komplexů se tak snažili docílit hlubšího pochopení světlosběrného systému fotosyntézy a jeho regulace. Dále také určili podíl elektronů náležících lineárnímu, nebo cyklickému elektronovému transportu. Níže popsané složení fotosystémů vychází mimo jiné i z výsledků experimentů zmíněných vědeckých skupin.

Jaderný komplex PSII se u rostlin skládá z nejméně 20 podjednotek. Většina patří mezi membránové proteiny. Řadí se sem mimo jiné i podjednotky reakčního centra (protein PsbA/D1 a PsbD/D2) a vnitřní anténní proteiny PsbC/cp43 a PsbB/cp47, výše jmenované jsou 4 velké membránové podjednotky. Dále se v jádru nachází nízkomolekulární podjednotky jako cytochrom *b*₅₅₉, který je heterodimerem skládajícím se z PsbE/cyt *b*₅₅₉ α, a PsbF/cyt *b*₅₅₉ β a obsahuje molekulu hemu (Albanese *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2017; McKenzie *et al.*, 2020). Dalšími takovými podjednotkami jsou PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbTc, PsbW, PsbX a PsbZ (Wei *et al.*, 2016). Jaderný komplex sestává i z několika podjednotek nacházejících se vně membrány na lumenální straně. Patří mezi ně i proteiny kyslík vyvíjejícího centra (PsbO/OEE-1, PsbP/OEE-2 a PsbQ-1 a PsbQ-2) a PsbTn (Wei *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2017; McKenzie *et al.*, 2020).

LHCII je tvořen proteiny, které u vyšších rostlin asociují s 14 molekulami chlorofylu *a* a 8 molekulami chlorofylu *b* (Liu *et al.*, 2004). Proteinové podjednotky pigment-

proteinových komplexů LHCII, které obklopují reakční centrum PSII jsou kódovány *Lhcb* genovou rodinou. Hlavní periferní mobilní část LHCII komplexu tvoří podjednotky Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3, jež se v komplexech vyskytují ve formě homo- či hetero-trimerů. Další proteiny vyskytující se v LHCII se objevují ve formě monomerů a jsou to podjednotky Lhcb4/CP29, Lhcb5/CP26 a Lhcb6/CP24, které zajišťují specifickou interakci mezi jadernou částí PSII a trimerními anténními proteiny (Pan *et al.*, 2011; Albanese *et al.*, 2016; Tyutereva *et al.*, 2018).

V závislosti na světelných podmínkách se světloběrné komplexy účastní buďto shromažďování světelné energie nebo mají fotoprotektivní účinky a disipují přijatou přebytečnou energii ve formě tepla (Tyutereva *et al.*, 2018). LHCII se může účastnit tzv. stavového přechodu, kdy se odpojí od PSII a přejde k PSI. Stavový přechod je jedním z mechanismů redistribuce energie světelného kvanta mezi fotosystémy. Při osvětlení světlem, které excituje zejména PSII, dojde k fosforylaci vnějších proteinů LHCII, ty se od PSII odpojí a přejdou k asociaci s PSI a dochází tak ke vzniku stavu 2 (Rochaix *et al.*, 2012). Při nadbytku excitací přijatých PSII hrozí rostlině oxidativní poškození. Aby se poškození předešlo, antény LHCII se od PSII odpojí, tím dojde k poklesu přísunu excitací. Zároveň se zvýší počet excitací PSI a tím se budou vyšší měrou odčerpávat elektrony z PSII. Naopak zastínění nebo osvětlení světlem o vlnové délce, která excituje přednostně PSI, vyústí v defosforylaci LHCII a jeho návrat k PSII (Vetoshkina *et al.*, 2019).

2.1.1.2 Fotosystém I a světloběrný komplex I

Přítomnost dvou fotosystémů u vyšších rostlin umožňuje mimo jiné i existenci dvou módů elektronového transportu:

- A) lineární elektronový transport, jenž využívá oba fotosystémy a elektrony získané z vody a přechází na NADP^+ a vzniká $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a ATP;
- B) cyklický elektronový transport, který využívá pouze PSI a vzniká zde pouze ATP (McKenzie *et al.*, 2020).

Jednou z nejdůležitějších rolí PSI je jeho schopnost adaptovat se na vnější podmínky a tím upravovat průběh fotosyntetických reakcí. Tohoto jevu se dá dosáhnout zejména díky navození cyklického elektronového transportu, nebo díky stavovému přechodu LHCII mezi PSII a PSI (Yang *et al.*, 2015).

PSI je lokalizován v membránách na okrajích gran a ve stromálních tylakoidních membránách. Reakční centrum PSI je obklopeno LHCI proteiny kódovanými *Lhca*

rodinou genů, které představují periferní systém antén (Nath *et al.*, 2013). Jádru PSI tvoří heterodimerní PsaA-PsaB proteiny. Další podjednotky, které bývají přítomny v PSI, jsou PsaC, PsaD, PsaE, PsaF, PsaG, PsaH, PsaK a PsaL (Kouřil *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2017; McKenzie *et al.*, 2020). LHCI je tvořeno 6 podjednotkami Lhca1-6 (Neilson a Durnford, 2010; Kouřil *et al.*, 2014).

2.2 Deficit chlorofylu *b*

Absence chlorofylu *b chloriny f2^{f2} (clo)* je způsobena mutací v genu pro chlorofylid *a* oxygenasu (EC 1.14.13.122), jež je enzymem, který katalyzuje změnu 7-methylové skupiny chlorofylidu *a* na 7-formylovou skupinu chlorofylidu *b* (Mueller *et al.*, 2012).

Tyto mutantní rostliny se často vyznačují sníženou funkčností fotosyntetického aparátu (Štroch *et al.*, 2004; He *et al.*, 2015). *Chlorina* má oproti WT rovněž nižší obsah chlorofylu *a* a karotenoidů a chybí jí chlorofyl *b* (Štroch *et al.*, 2008; Janečková *et al.*, 2019). Rovněž můžeme u *chloriny* pozorovat nižší obsah xantofylů, přičemž poměr xantofylů ku chlorofylům je u *chloriny* vyšší (Janečková *et al.*, 2019). Tomuto mutantu chybí světlosběrné komplexy Lhca4, Lhcb1 a Lhcb6, jelikož bez přítomnosti chlorofylu *b*, jsou tyto proteiny nestabilní. Také množství Lhcb2, Lhcb3 a Lhcb4 je sníženo (Bossmann *et al.*, 1997). Fotochemické pochody jsou u *chloriny* na srovnatelné nebo nepatrně nižší úrovni oproti přirozenému genotypu ječmene (Štroch *et al.*, 2008). Tento trend se však při stresových podmínkách, jako je zvýšená teplota a intenzita osvětlení, mění a efektivita fotosystému II (PSII) je v tomto případě u *chloriny* znatelně snížena (Štroch *et al.*, 2008; Tyutereva *et al.*, 2017).

Nedostatek chlorofylu *b* vede mimo jiné k odlišnému uspořádání světlosběrných komplexů fotosystémů. Chlorofyl *b* je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících velikost a složení fotosyntetických antén, jejichž omezená funkčnost může vést k neefektivní fotoprotekci a vysoké senzitivitě rostliny vůči světelnému stresu. Chloroplasty takovýchto rostlin mají často malý počet gran, a tak změna světlosběrných komplexů má vliv nejen na funkci fotosyntetických komplexů ale i na organizaci membrán chloroplastů (Lin *et al.*, 2009; Ramel *et al.*, 2013). Tyutereva *et al.* (2017) zjistili, že schopnost difúze pigment-proteinových komplexů mutantní formy ječmene (*chlorina f2³⁶¹³*) je značně snížena a ty tak nemají dostatečnou laterální mobilitu. Nedochozí zde tedy k efektivnímu využití světelné energie, což vede k nedostatečnému lineárnímu elektronovému transportu. Taktéž může docházet k poškození fotosystému II (PSII), které takto mutované rostliny nestačí opravovat ve stejné míře jako WT. Menší velikost a množství

světlosběrných komplexů vede k poklesu absorbovaných excitací reakčními centry fotosystémů a snižuje se tak i výtěžek samotných fotosyntetických procesů.

Laterální mobilita pigment-proteinových komplexů v granálních membránách chloroplastů je klíčová pro regulaci přijímání světelné energie. Světlosběrný komplex fotosystému II (LHCII) se tímto způsobem přesouvá mezi fotosystémem II a I a je takto zapojen v obraně rostlin před světelným stresem, ať už se jedná o nadměrné nebo nedostatečné osvětlení. Nadměrným světelným zářením je ohrožen hlavně protein D1, jenž je součástí PSII. Opravné mechanismy poškození proteinu D1 jsou závislé právě i od schopnosti laterální mobility LHCII (Kirchhoff, 2014; Tyutereva *et al.*, 2017). Mutanti s nedostatkem chlorofylu *b* jsou takto znevýhodněni, jelikož opravné mechanismy slouží k udržení efektivity fotosyntetického aparátu a k obraně před fotoinhibicí.

Chlorina mutanti, i když jsou znevýhodněni z hlediska růstu a jsou v podstatě nevyužitelnými v zemědělském průmyslu, jsou dokonalým nástrojem pro zkoumání fotosyntetického aparátu a obraných reakcí rostlin na stres. Pomáhají nám k pochopení ohromné flexibility a komplexnosti jednotlivých částí fotosyntetického aparátu. V experimentálních studiích se často srovnávají s přirozeným genotypem rostlin a to na základě rozdílnosti ve fluorescenčních parametrech chlorofylu, jeho samotném obsahu, obsahu dalších ve fotosyntéze se účastnících barviv a jednotlivých pigment-proteinových komplexů (Krol *et al.*, 2009; Brestič *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Tyutereva *et al.*, 2017; Janečková *et al.*, 2019). K jejich studiu se také využívají mikroskopické techniky (Tyutereva *et al.*, 2017).

U *chlorina* mutantů ječmene bylo prokázáno, že nedostatek chlorofylu *b* vede ke sníženému množství nebo i absenci některých podjednotek LHCI i LHCII (Bossmann *et al.*, 1997; Brestič *et al.*, 2015; Tyutereva *et al.*, 2017). Přičemž záleží na typu mutace. Bossmann *et al.* (1997) prokázali, že u *chlorina f2^{f2}* mutantních rostlin chybí podjednotky světlosběrných komplexů Lhca4, Lhcb1 a Lhcb6 a obsah Lhcb2, Lhcb3 a Lhcb4 je u nich snížen oproti jejich obsahu u WT. Podle Tyuterevy *et al.* (2017) je u *chloriny f2³⁶¹³* zastoupení většiny LHC proteinů sníženo oproti přirozenému genotypu ječmene. Nejvýraznější pokles byl pozorován u Lhcb2, Lhcb4, Lhcb6, Lhca2 a Lhca4 proteinů. Množství Lhca1, Lhca3 a Lhcb1 bylo pouze lehce sníženo oproti WT a množství Lhcb3 a Lhcb5 nebylo u *chloriny f2³⁶¹³* změněno. Dle Krol *et al.* (1995); Krol *et al.* (2009) je *chlorina f2²⁸⁰⁰* deficientní v Lhcb1, Lhcb4 a Lhcb6 podjednotkách LHCII a má rovněž snížené množství Lhcb2, Lhcb3 a Lhcb5.

Na základě uvedených prací je evidentní, že chlorofyl *b* je nezbytnou součástí světlosběrných komplexů a bez něj jsou antény nestabilní a nekompletní. Tento úkaz vede v mnohých případech k dysfunkci ve sběru světelné energie, aktivitě fotosyntetického aparátu a fotoprotekci s možností vyústit až v produkci reaktivních kyslíkových radikálů a navození fotooxidačního stresu rostliny (Tyutereva *et al.*, 2017; Janečková *et al.*, 2019).

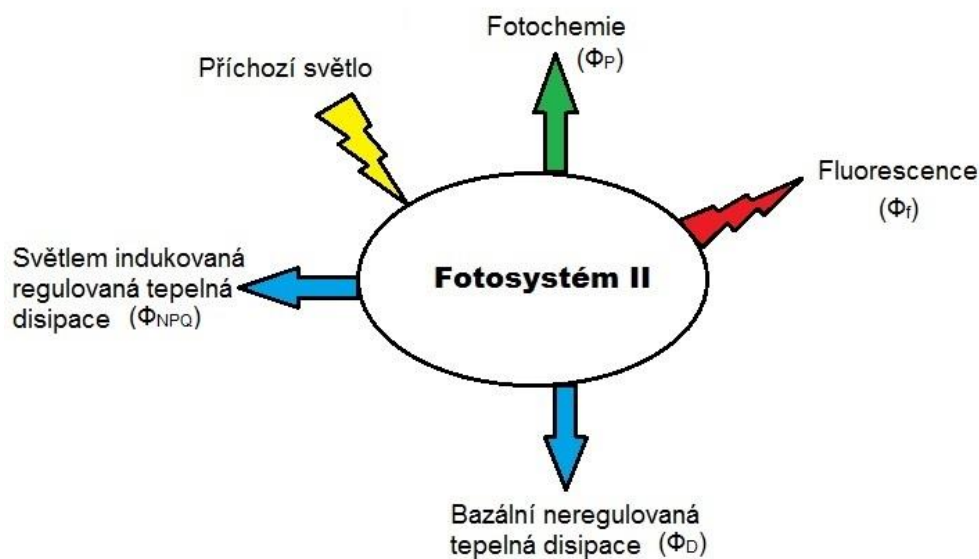
2.3 Fluorescence chlorofylu

Měření kinetiky fluorescence chlorofylu je rozšířeným nástrojem pro hodnocení aktivity fotosyntetického aparátu a jeho funkčního stavu (Krause a Weis, 1991; Lazár, 2015). Z jeho výsledků můžeme vyvozovat i závěry o celkovém stavu rostliny a jak určený jedinec prospívá. Při realizaci měření se využívá indukce fluorescence chlorofylu. Vědecké využití mají tyto metody na poli rostlinné fyziologie, fenotypizace, výzkumu fotosyntézy i v molekulární biologii (Lazár, 2015; Ikeuchi *et al.*, 2016; Janečková *et al.*, 2019). Výhodou fluorescenčních měření je jejich neinvazivnost, můžeme měřit přímo na listech *in vivo*, a v případě přenosných přístrojů je zde i možnost výzkumu přímo na místě růstu rostliny.

Výstupem experimentů je poté hladina fluorescence chlorofylu *a*, jenž je přítomen v reakčním centru fotosystému II (PSII). Při pokojové teplotě je úroveň fluorescence chlorofylu *b* zanedbatelná, tudíž výsledky poukazují na stav PSII, jenž je tímto způsobem hodnocen (Lazár, 2013). Fluorescence je definována jako svítivá deaktivace molekuly v excitovaném singletním stavu do stavu základního, tento proces je charakterizován Jablonského diagramem (Jablonski, 1933). Měřeními je možné získat data, z nichž dalšími výpočty získáme jednotlivé fluorescenční parametry. Na základě jejich hodnocení poté získáváme představu o stavu fotosyntézy, energetické disipace a souvisejících dějů (Kalaji *et al.*, 2014; Lazár, 2015; Stirbet *et al.*, 2018).

Energetická světelná kvanta přijatá rostlinou nejsou zcela využita pro procesy fotosyntézy. Dochází zde k rozdělení energie mezi rozličné procesy v rostlině za účelem zpracování přebytečné energie a ochrany rostliny před poškozením (Lazár, 2015; Stirbet *et al.*, 2018). Po přijetí energie světelného kvanta se PSII dostává do excitovaného stavu, který je nestabilní. Za účelem přechodu zpět na základní energetickou hladinu je třeba zbavit PSII přebytečné energie, k čemuž dochází skrze několik procesů energetické disipace (Obr. 3):

A) Může docházet k fotochemickým procesům, které jsou základem fotosyntézy.



Obr. 3 Zpracování přijaté světelné energie fotosystémem II (PSII). Excitace mohou být zpracovány procesy fotochemie (Φ_p), energie je tak dále přenášena do fotosyntetických procesů. Dále může být přijatá světelná energie vyzářena fluorescencí (Φ_f), nebo může docházet k bazální neregulované tepelné disipaci (Φ_D), či k světlem indukované regulované tepelné disipaci (Φ_{NPQ}). Převzato a upraveno dle Lazára (2015).

B) Také může být emitována fluorescence, kdy je energie vyzářena ve formě světla vyšší vlnové délky (červená oblast), než jakou mělo světlo pohlcené. A právě tohoto jevu využívají experimentální metody založené na fluorescenční indukci chlorofylu.

C) Dále se PSII zbavuje energie pomocí základní neregulovatelné tepelné disipace a světlem indukované regulovatelné tepelné disipace (Kalaji *et al.*, 2014; Lazár, 2015).

Fluorescence, regulovatelná a neregulovatelná tepelná disipace a procesy fotochemie jsou vůči sobě ve vzájemné kompetici, a tak nárůst jedné složky znamená pokles jiné.

Při měření zaznamenávaná hladina fluorescence chlorofylu *a* je velmi citlivá na změny ve fotosyntéze a jejím zachycením získáváme velké množství dat vysoké kvality a přesnosti. Existuje množství procesů, které ovlivňují výtěžek fluorescence i její intenzitu. Tyto procesy je možné studovat na základě využití různých světelných protokolů, přičemž právě použitím různých typů světla, či jejich kombinací, zaznamenáváme a hodnotíme rozličné procesy (Kalaji *et al.*, 2014; Lazár, 2015; Stirbet *et al.*, 2018). V měřicích protokolech jsou zahrnuty krátké světelné záblesky (měřící světlo), intenzivní světelné pulzy (tzv. saturační pulzy) a kontinuální osvětlení (aktinické světlo simulující pěstební podmínky) (Kalaji *et al.*, 2014).

Typický záznam časového průběhu fluorescence se měří na listech adaptovaných na tmu a při osvětlení začíná velmi rychlým nárůstem fluorescence z minimální hodnoty na její maximum. Následně dochází k poklesu fluorescence a poté ke stabilizování hodnot fluorescence v tzv. ustáleném stavu (Kalaji *et al.*, 2014).

2.3.1 Vybrané fluorescenční parametry

2.3.1.1 Velmi rychlá fluorescenční indukce

Při měření velmi rychlé fluorescenční indukce zaznamenáváme tzv. O-J-I-P křivku. V průběhu dochází k postupnému nárůstu fluorescence a jednotlivé fáze křivky odpovídají postupnému zaplňování elektronových akceptorů a jejich redukci v rámci elektronového transportního řetězce (Kalaji *et al.*, 2014). Změny fluorescence jsou zaznamenávány s milisekundovým rozlišením, proto v logaritmickém měřítku můžeme vidět typický kaskádovitý průběh křivek. V bodě O jsou reakční centra PSII otevřená a Q_A je v oxidovaném stavu a zaznamenáváme zde hodnotu minimální fluorescence F_0 . Při spuštění světelného zdroje dochází k absorpci světelné energie molekulami chlorofylu anténních komplexů, energie se však ještě nedostala k reakčním centrům PSII. Poté ve vlně J dochází k redukci primárního chinonového akceptoru Q_A . Při vlně I se akumulují chinonové akceptory v podobě $Q_A^-Q_B^{2-}$ a při vlně P se hromadí $Q_A^-Q_BH_2$ (Kalaji *et al.*, 2014; Stirbet *et al.*, 2018). Když křivka dosáhne maxima, detekujeme maximální fluorescenci chlorofylu *a* (F_m). V tomto bodě jsou všechna reakční centra PSII uzavřená a Q_A je v redukovaném stavu.

Tabulka níže popisuje vybrané důležité parametry velmi rychlé fluorescenční indukce chlorofylu *a* (Tab. 1).

2.3.1.2 Pomalá fluorescenční indukce

Při měření pomalé fluorescenční indukce můžeme kromě nárůstu fluorescence pozorovat i její pokles a aplikovat i přístup zhášecí a relaxační analýzy. Z nich poté získáváme další parametry, které mohou charakterizovat jednotlivé typy zhášení fluorescence, účinnost fotochemie a stav jednotlivých součástí fotosyntetického aparátu. Můžeme popsat a identifikovat i fotoprotektivní mechanismy rostliny a nástup Kalvinova cyklu (Kalaji *et al.*, 2014; Lazár, 2015; Vetoshkina *et al.*, 2019; Janečková *et al.*, 2019). Měření probíhá často v průběhu několika desítek minut tak, aby se vzorky po aplikaci aktinického světla dostaly do ustáleného stavu.

Parametry získané z měření pomalé fluorescenční indukce se využívají pro hodnocení

Tab. 1 Parametry velmi rychlé fluorescenční indukce chlorofylu. Parametry jsou uvedeny v podobě, ve které jsou využity v této práci, spolu s jejich výpočtem a stručným popisem. Převzato a upraveno dle Stirbet *et al.* (2018).

Parametr	Popis parametru
F_0	Minimální fluorescence ve stavu adaptovaném na tmu
F_m	Maximální fluorescence ve stavu adaptovaném na tmu
V_I	Relativní výška vlny I
$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$	Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu
$dV/dt_0 = \frac{F_{300\mu s} - F_0}{F_M - F_0} \cdot \frac{1}{0,25}$	Relativní rychlost fotochemie
$V_j = \frac{F_j - F_0}{F_M - F_0}$	Relativní výška vlny J
$ABS/RC = (M_0/V_j)/((F_m - F_0)/F_m)$	Množství absorbované energie aktivními reakčními centry
$RE_0/ABS = \varphi R_0 = \frac{F_m - F_0}{F_m} \cdot (1 - V_I)$	Kvantový výtěžek elektronového transportu z Q_A^- k finálnímu akceptoru PSI

využití energie přijatých světelných kvant fotosystémem II. Při zhášecí analýze pozorujeme postupnou adaptaci listů rostliny na aplikované aktinické světlo a saturační pulzy. Stav rostliny poté hodnotíme na základě vypočítaných fluorescenčních parametrů (Tab. 2). Po vypnutí aktinického světla se rostlina znovu adaptuje na tmu a při aplikaci saturačních pulzů tak měříme parametry relaxační analýzy (Tab. 2).

Při relaxační analýze můžeme stanovit kvantové výtěžky jednotlivých složek regulovatelného nefotochemického zhášení. Nejprve relaxuje qE (energeticky závislé nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu) s poločasem relaxace 30 s až 1 min, bývá zde určován kvantový výtěžek nefotochemického zhášení závislého na gradientu pH přes tylakoidní membránu (Φ_{qE}) (Tab. 2). Poté dochází k relaxaci složky qT (nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu závislé na stavových přechodech) s poločasem relaxace 5-8 min. Stavový přechod je důsledkem fosforylace světlosběrných komplexů asociovaných s PSII, které ve své fosforylované podobě přechází k PSI. Rovněž zde hodnotíme kvantový výtěžek nefotochemického zhášení souvisejícího se stavovými přechody (Φ_{qT}). Fotoinhibiční nefotochemické zhášení fluorescence qI relaxuje s poločasem 20-40 min a více. qI vzniká v důsledku fotoinhibice fotochemie PSII. Při analýze opět hodnotíme kvantový výtěžek fotoinhibičního nefotochemického

Tab. 2 Parametry zhášecí a relaxační analýzy hodnocené při měření pomalé fluorescenční indukce. Výpočty a popisky byly převzaty a upraveny dle Lazár (2015).

Parametr	Popis parametru
$F'_0 = \frac{F_0}{((F_m - F_0)/F_m) + (F_0/F'_m)}$	Minimální fluorescence při adaptaci na světlo
F'_m	Maximální fluorescence při adaptaci na světlo
$F(t)$	Aktuální hodnota fluorescence v čase t
$qP = \frac{F'_m - F(t)}{F'_m - F_0}$	Fotochemické zhášení (odráží zastoupení otevřených reakčních center)
$\Phi_{PSII} = F'_v / F'_m = \frac{F'_m - F'_0}{F'_m}$	Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII při adaptaci na světlo
$\Phi_P = qP \cdot \Phi_{PSII} = \frac{F'_m - F(t)}{F'_m}$	Aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII při adaptaci na světlo
$\Phi_{NPQ} = \frac{F(t)}{F'_m} - \frac{F(t)}{F_m}$	Kvantový výtěžek regulovatelného světlem indukovaného nefotochemického zhášení
$\Phi_{f,D} = \frac{F(t)}{F_m}$	Kvantový výtěžek konstitutivní neregulovatelné disipace
F''_m	Maximální fluorescence při temnostní relaxaci
$F''_v = F''_m - F''_0 = \frac{F_0}{((F_m - F_0)/F_m) + (F_0/F''_m)}$	Variabilní fluorescence při temnostní relaxaci
$B = 1 - \frac{F''_v / F''_m}{(F_m - F_0) / F_m}$	Míra fotoinaktivovaných center (kvantový výtěžek energie disipované těmito centry)
$F_m^{x''}$	Maximální fluorescence při temnostní relaxaci v čase, kdy je qE kompletně relaxováno
$F_m^{y''}$	Maximální fluorescence při temnostní relaxaci v čase, kdy je qE i qT kompletně relaxováno
$\Phi_{qE} = \frac{F_m^{x''} - F'_m}{F'_m} \cdot \frac{F(t)}{F_m^{x''}}$	Kvantový výtěžek nefotochemického zhášení závislého na gradientu pH přes tylakoidní membránu
$\Phi_{qT} = \frac{F_m^{y''} - F_m^{x''}}{F_m^{y''}} \cdot \frac{F(t)}{F_m^{y''}}$	Kvantový výtěžek nefotochemického zhášení souvisejícího se stavovými přechody
$\Phi_{qI} = \frac{F_m - F_m^{x''}}{F_m^{y''}} \cdot \frac{F(t)}{F_m}$	Kvantový výtěžek fotoinhibičního nefotochemického zhášení

zhášení (Φ_{qI}) (Tab. 2). Součtem kvantových výtěžků $\Phi_{qE} + \Phi_{qT} + \Phi_{qI}$ pak získáme kvantový výtěžek nefotochemického zhášení Φ_{NPQ} (Govindjee, 1995; Lazár, 2015).

2.3.1.3 Pulzní amplitudová modulační technika

Pro určení světlem indukované oxidace primárního elektronového donoru PSI se využívá pulzní amplitudová modulační technika (PAM). Tato technika využívá k popisu dějů na PSI signál I_{820} . Ten je určen jako rozdíl transmitance při 875 nm a 830 nm. Při změně oxidačního stavu P700 dochází ke změně absorpce aplikovaného světla. Můžeme tak určovat účinnost fotochemie a jaký podíl nefotochemického zhášení se přisuzuje limitaci na donorové a akceptorové straně (Lazár, 2013) (Tab. 3).

2.3.2 Fluorescenční parametry u *chloriny*

Navzdory značnému nedostatku chlorofylů oproti přirozenému genotypu ječmene vykazuje *chlorina f2²* pouze mírné snížení maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII a to

jak ve stavu adaptovaném na tmu (F_v/F_m) tak i ve stavu adaptovaném na světlo (F_v'/F_m'). Můžeme pozorovat i snížení aktuálního kvantového výtěžku fotochemie PSII (Φ_P) a zvýšení kvantového výtěžku konstitutivních neregulovatelných disipačních procesů ($\Phi_{f,D}$) a kvantového výtěžku regulovatelného nefotochemického zhášení (Φ_{NPQ}). Z těchto poznatků je zřejmé, že menší množství přijaté světelné energie bylo využito na procesy fotochemie a větší část byla přidělena nefotochemickým procesům. Z průběhu normalizovaných O-J-I-P křivek byl zjištěn pomalejší nárůst vln J a I, což souvisí s pomalejší redukcí Q_A a Q_B kvůli menším rozměrům antén u *clo* (Janečková *et al.*, 2019).

Tab. 3 Parametry hodnocené při měření pulzní amplitudovou modulační technikou Dual-PAM. Je dáno, že $Y(I) + Y(ND) + Y(NA) = 1$. A vyjadřuje soubor všech efektivních elektronových akceptorů PSI. Výpočty a popisky byly přežaty a upraveny dle Lazár (2013); Janečková *et al* (2019).

Parametr	Popis parametru
$Y(I) = \frac{P700A / (P700^+A + P700A + P700A^-)}{(P'_m - P) / (P_m - P_0)}$	Kvantový výtěžek fotochemie PSI
$Y(ND) = \frac{P700^+A / (P700^+A + P700A + P700A^-)}{(P - P_0) / (P_m - P_0)}$	Kvantový výtěžek nefotochemické disipace PSI kvůli limitaci na donorové straně
$Y(NA) = \frac{P700A^- / (P700^+A + P700A + P700A^-)}{(P_m - P_{m'}) / (P_m - P_0)}$	Kvantový výtěžek nefotochemické disipace PSI kvůli limitaci na akceptorové straně

U *chloriny f2^{f2}* se rovněž vyskytuje nižší poměr ABS/RC, jenž souvisí s nedostatkem LHCII proteinů (Stirbet *et al.*, 2018; Janečková *et al.*, 2019). Naopak poměr RE₀/ABS je u *chloriny* vyšší než u WT, což odráží stav, při kterém vidíme, že elektronový transport na straně PSI je plně funkční a elektronový transportní řetězec má snahu elektrony od PSII odčerpávat rychleji a tím vynahrazovat ztráty způsobené menšími anténami a nižší účinností PSII (Stirbet *et al.*, 2018; Janečková *et al.*, 2019).

U mutantního typu ječmene *chlorina f104*, který se vyznačuje pouze sníženým obsahem chlorofylu *b*, pozorujeme, že kvantový výtěžek fotochemie PSII je na podobné úrovni jako u WT. Totéž platí pro hodnotu fotochemického i nefotochemického zhášení (Brestič *et al.*, 2015). Z výsledků vidíme, že fotochemické procesy nejsou zdaleka tolik ovlivněné jako v případě *chloriny* s absencí chlorofylu *b*. Po ozáření silným světlem (1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 60 min; předchozí pěstební intenzita byla 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) dochází u *chloriny f104* i u přirozeného genotypu ječmene k fotoinhibici, která je však u *chloriny* nižší než u WT (Brestič *et al.*, 2015). Měření odhalila, že vystavení osvětlení o vysoké intenzitě může snížit kvantový výtěžek fotochemie PSI i elektronový transportní řetězec PSI a to skrze limitaci na donorové i akceptorové straně. Avšak při porovnání přirozeného genotypu ječmene s *chlorinou* mezi nimi nebyl pozorován signifikantní rozdíl. Tudíž fotochemie PSI nebyla sníženým množstvím chlorofylu u *chloriny* významně ovlivněna (Brestič *et al.*, 2015). Tento tým rovněž zjistil, že po vystavení listů vysoké intenzitě světla (1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 60 min), dochází k fotoinhibici některých reakčních center a ta jsou tak inaktivní. Počet těchto inaktivních center byl vyšší u WT než u *chloriny*. Rovněž došlo ke snížení elektronové transportní kapacity reakčních center po vystavení listů světlu o vysoké intenzitě. Opět byl ječmen přirozeného genotypu více ovlivněn než *chlorina f104*.

Krol *et al.* (2009) srovnávali WT ječmene s *chlorinou f2²⁸⁰⁰*. Hodnotili citlivost listů vůči fotoinhibici monitorováním kvantového výtěžku fotochemie PSII. U *chloriny* po aplikaci světla o vysoké intenzitě (1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) zaznamenali výraznější pokles množství proteinu D1 než u přirozeného genotypu ječmene. Čím vyšší byl pokles, tím nižší byla účinnost fotochemie PSII. Při osvětlení pouze nízkou intenzitou světla (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) došlo u přirozeného genotypu ječmene k navrácení k původním hodnotám účinnosti fotochemie PSII po 1 hodině, avšak u *chloriny* nebylo původních hodnot dosaženo ani po 4 hodinách. U *chloriny f2²⁸⁰⁰*, již chybí hlavní Lhcb světlosběrné podjednotky byla její reakční centra citlivější k fotoinhibici při vystavení osvětlení o vysoké intenzitě.

Tyutereva *et al.* (2017) zkoumali u *chloriny f2³⁶¹³* vliv absence chlorofylu *b* na laterální mobilitu fotosyntetických komplexů v granálních membránách. Pomocí fluorescenční zobrazovací metody FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) zjistili, že fluorescence chlorofylu byla u ječmene přirozeného genotypu regenerována rychleji než u *chloriny*. Tudíž podíl mobilní frakce pigment-proteinových komplexů je u *chloriny* menší než u přirozeného genotypu. U *chloriny f2³⁶¹³* bylo prokázáno snížení minimální i maximální fluorescence (F_0 a F_m) a to kvůli sníženému obsahu chlorofylů a menším světlosběrným komplexům. Avšak maximální efektivita fotochemie PSII (F_v/F_m) byla u *chloriny* srovnatelná s WT. Množství absorbované energie na reakční centrum (ABS/RC) bylo signifikantně sníženo u *chloriny*, tato data poukazují na fakt, že k reakčnímu centru PSII se u *chloriny* dostane méně energie než u WT, a to právě kvůli menším světlosběrným komplexům.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Použité chemikálie

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES; Sigma-Aldrich, Německo); aceton (VWR chemicals, USA); akrylamid (Bio-Rad, USA); aminokapronová kyselina (Fluka, Německo); askorbát sodný (Sigma-Aldrich, Německo); Bis-Tris (Sigma-Aldrich, USA); Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, USA); deoxycholát sodný (Sigma-Aldrich, USA); dihydrogenfosforečnan amonný (Lachema, ČR); dithiotreitol (DTT; Bio-Rad, USA); dodecylsulfát sodný (SDS; Bio-Rad, USA); dusičnan drasený (Lachema, ČR); dusičnan vápenatý (PENTA, ČR); glycerol (Lach-ner, ČR); glycin (Sigma-Aldrich, Německo); heptahydrát síranu hořečnatého (Lachema, ČR); heptahydrát síranu zinečnatého (Lachema, ČR); heptahydrát síranu železnatého (Lachema, ČR); hexahydrát chloridu hořečnatého (Lach-ner, ČR); hovězí sérový albumin (BSA; Sigma-Aldrich, USA); chlorid sodný (Lach-ner, ČR); kyselina boritá (Lach-ner, ČR); kyselina chlorovodíková (PENTA, ČR); kyselina octová (Sigma-Aldrich, Německo); kyselina sírová (Lach-ner, ČR); methanol (MERC, USA); močovina (Fluka, Německo); monohydrát síranu manganatého (Sigma-Aldrich, USA); n-dodecyl- β -D-maltosid (Sigma-Aldrich, USA); N,N'-metylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA); N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED; Bio-Rad, USA); pentahydrát síranu měďnatého (Lachema, ČR); peroxodisíran amonný (APS; Bio-Rad, USA); Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein standards (Bio-Rad, USA); sacharosa (Lach-ner, ČR); sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na₂EDTA; Sigma-Aldrich, USA); tetrahydrát molybdenanu amonného (Lachema, ČR); Tricin (Bio-Rad, USA); Tris (Trizma base; Sigma-Aldrich, USA); uhličitan hořečnatý (Sigma-Aldrich, USA).

3.1.2 Použité přístroje a pomůcky

Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5430R (Eppendorf, ČR); centrifuga Sigma 3-30 K (Sartorius, Německo); dvoupaprskový spektrometr Unicam UV550 (Unicam, UK); elektroforetická komora Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, USA); fluorescenční a absorpční systém Dual-PAM-100 (Walz, Německo); fluorimetr FluorCam (Photon Systems Instruments, ČR); fluorimetr PEA (Plant Efficiency Analyser; Hansatech, UK); fytokomora Microclima MC 1750 (Snijders Scientific, USA); homogenizátor IKA Labortechnik T25 basic (IKA, USA); papírek GE healthcare paper Wicks (Sigma-Aldrich, USA); peristaltická pumpa s komorou pro nalévání gradientových gelů PCD 21

(čerpadla Kouřil, ČR); pH metr WTW inoLab 7110 (WTW, ČR); skener Umax U9908-HAR0 (Amersham Bioscience Corp, USA); třepačka Infors Wavetec (Infors AG, Švýcarsko); váhy (Sartorius, Německo); vortex MS2 Minishaker (IKA, USA); zdroj pro elektroforézu POWERPAC 1000 (Bio-Rad, USA); zobrazovací systém Amersham Imager 600 (Cytiva, USA).

3.1.3 Rostlinný materiál a podmínky pěstování

Byla použita semena přirozeného genotypu ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a semena ječmene mutantního typu *chlorina f2²* (*clo*). Semena byla zaseta do květináčů s perlitem a byla zalévána Hoaglandovým roztokem (Tab. 4) po celou dobu růstu. Květináče byly umístěny do fytokomory do kontrolovaného prostředí s 16 h světla ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); 8 h tmy; 22/20 °C na 8 dnů.

3.1.4 Použité metody

3.1.4.1 Stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů

Pro stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů byly použity osmidenní rostliny přirozeného genotypu ječmene setého a jeho mutantní formy *clo*. Za pěstební intenzity osvětlení byly z primárních listů odděleny 5cm segmenty, které byly posléze obkresleny na průhlednou

fólii pro zaznamenání jejich plochy. Tyto vzorky byly následně uloženy do mikroskopavek a zamrazeny v tekutém dusíku. Pro následné experimenty byly uchovány v mrazáku při -80 °C. Fólie s obkreslenými segmenty byla naskenována a pomocí programu Image J byly zjištěny velikosti ploch jednotlivých vzorků.

Tab. 4 Návod na přípravu Hoaglandova roztoku.

Chemikálie	Použité množství [mg·l ⁻¹]
Makroprvky	
Ca(NO ₃) ₂	940
MgSO ₄ ·7H ₂ O	520
KNO ₃	660
NH ₄ H ₂ PO ₄	120
Mikroprvky	
H ₃ BO ₃	2,80
MnSO ₄ ·H ₂ O	3,40
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,10
Na ₂ EDTA	37
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27
	Použité množství [μl·l ⁻¹]
H ₂ SO ₄ (koncentrovaná)	25

Zamrazené segmenty byly při zeleném světle homogenizovány tloučkem ve třecí misce. Ke vzorku ve třecí misce byla přidána špetka MgCO₃ a 450 µl vychlazeného 80% (v/v) roztoku acetonu. Listy byly rozmělněny do homogenní podoby. Vzorek byl poté kvantitativně přenesen do 2ml mikrozkušavky za použití dalšího acetonu k získání veškerého vzorku z třecí misky i tloučku.

Vzorky byly poté centrifugovány při 4600g po dobu 10 min v centrifuze vychlazené na 4 °C. Supernatant byl posléze kvantitativně převeden do čisté kalibrované 2ml mikrozkušavky a byl zaznamenán jeho objem. V tomto acetonovém extraktu byly následně spektrofotometricky stanoveny obsahy rostlinných barviv. Byla měřena jejich absorbance při vlnové délce 470 (A₄₇₀); 646,8 (A_{646,8}); 663,2 (A_{663,2}) a 750 nm (A₇₅₀). Byl použit dvoupaprskový spektrometr Unicam UV550 a skleněné 1cm kyvety. Jako blank sloužil 80% (v/v) roztok acetonu. Vzorek byl dále zředěn 80% (v/v) acetonem tak, aby výsledná absorbance při 663,2 nm byla v rozmezí 0,4-0,8.

K výpočtu výsledného obsahu chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů bylo využito Lichtenthalerových rovnic (Lichtenthaler, 1987) uvedených níže.

Rovnice pro obsah chlorofylu *a*

$$\frac{(12,25 \cdot (A_{663,2} - A_{750}) - 2,79 \cdot (A_{646,8} - A_{750})) \cdot V}{S}$$

chlorofylu *b*

$$\frac{(21,5 \cdot (A_{646,8} - A_{750}) - 5,1 \cdot (A_{663,2} - A_{750})) \cdot V}{S}$$

a karotenoidů

$$\frac{((1000 \cdot (A_{470} - A_{750}) - 1,82 \cdot (Chl a) - 85,02(Chl b)) / 198) \cdot V}{S}$$

Přičemž *A* prezentuje absorbanci vzorku při uvedených vlnových délkách (470; 646,8; 663,2 a 750 nm) oproti 80% (v/v) roztoku acetonu jako blanku. *V* zastupuje objem acetonového extraktu v ml a *S* je plocha listového segmentu v cm². Získáme tak obsah pigmentů v µg·cm⁻².

3.1.4.2 Velmi rychlá fluorescenční indukce

Tato metoda byla realizována měřením pomocí fluorimetru PEA (Plant Efficiency Analyser) při okolním slabém zeleném světle a při laboratorní teplotě *in vivo* na intaktních listech po 25 minutách zatemnění. Fluorescence byla měřena vždy na adaxiální straně listu, přibližně 3 cm od jeho špičky. Doba měření byla 3 s při intenzitě excitačního světla

270 a 440 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Při intenzitě 1110; 1670; 1720 a 2050 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ byla doba měření zkrácena na 2 s (Tab. 5).

3.1.4.3 Pomalá fluorescenční indukce

Přístrojem FluorCam byly měřeny zhášecí a relaxační parametry fluorescence chlorofylu listů ječmene. Listy byly zatemněny po dobu 25 minut. Tato metodika opět probíhala při slabém zeleném světle a za laboratorní teploty. Intaktní rostliny ječmene byly umístěny na podložku adaxiální stranou listů nahoru pod kameru přístroje. Před začátkem měření bylo provedeno zaostření kamery a listy byly srovnány a vycentrovány do středu zorného pole snímací kamery. Přístroj poskytuje 3 typy světla (měřicí, aktinické a saturační pulzy) a kamera, která je součástí přístroje, snímá fluorescenci vyzařovanou vzorkem.

Relaxační a zhášecí analýza byla měřena při různých intenzitách aplikovaného aktinického světla. A to při 50; 100 a 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Měřicí a aktinické světlo a saturační pulzy byly aplikovány dle následujícího měřicího protokolu.

Na začátku měření byla určena hodnota F_0 (minimální fluorescence ve stavu adaptovaném na tmu) za spuštění záblesků červeného měřicího světla, které je dostatečně slabé, aby nedocházelo k uzavírání reakčních center PSII. Délka měřicích pulzů je 10 μs , těchto pulzů bylo na začátku aplikováno 10 v rozmezí 3 s. Poté následoval saturační pulz o trvání 800 ms, v jehož průběhu byla určena hodnota F_m (maximální fluorescence ve stavu adaptovaném na tmu). Dále následoval časový úsek 90 s, kdy docházelo k relaxaci ve tmě. Následně v čase 93,8 s po začátku měřicího protokolu byly vzorky vystaveny aktinickému světlu na 25 min, v jehož průběhu byly měřeny zhášecí parametry. Abychom byli schopni určit hodnotu F_m' (maximální fluorescence ve stavu adaptovaném na světlo), byly během spuštěného aktinického světla rovněž aplikovány saturační pulzy.

Tab. 5 Specifika měření velmi rychlé fluorescenční indukce chlorofylu s pomocí fluorimetru PEA. Nastavení intenzity a doby trvání excitačního světla.

% výkonu přístroje	Intenzita světla [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]	Doba měření [s]
10	270	3
20	440	3
40	1110	2
55	1670	2
70	1790	2
80	2050	2

Saturačních pulzů bylo 32. První se spustil 9 s po spuštění aktinického světla, dalších 9 pulzů bylo aplikováno v 20s intervalech. A následujících 22 pulzů bylo spuštěno vždy po 59 s od začátku předchozího pulzu.

Poté následovala část relaxační analýzy trvající opět 25 min. 10 s po vypnutí aktinického světla byl opět aplikován 800 ms saturační pulz. Po něm vždy v 59s intervalech následovalo dalších 25 saturačních pulzů. Saturační pulzy byly použity pro získání hodnot F_m'' (maximální fluorescence během temnostní relaxace po předchozím osvětlení).

3.1.4.4 Měření redoxního stavu PSI a plastocyaninu

K měření byl použit přístroj Dual-PAM-100 (Pulse Amplitude Modulation; Walz, Německo). Osmidenní rostliny byly na 25 min zatemněny. Poté byly uříznuty primární listy a ty byly vloženy do kádinky s destilovanou vodou a umístěny do svorky přístroje adaxiální stranou směrem ke zdroji světla. Byl spuštěn měřicí protokol. Měření probíhalo za okolního slabého zeleného světla.

Při měření se používají různé typy světel. Patří mezi ně měřící světlo, světlo ze vzdálené červené oblasti (far-red), saturační pulzy a aktinické světlo. Přičemž P_0 je určeno při zapnutém měřícím světle po temnostní adaptaci listu. P_m se určuje po aplikaci far-red světla, při jeho vypnutí se ihned aplikuje saturační pulz, přičemž P_m se určuje v době vypnutí far-red světla a spuštění saturačního pulzu při zapnutém měřícím světle. P se zaznamenává při spuštěném aktinickém a měřícím světle. A P_m' je určeno při zapnutém měřícím, aktinickém světle a saturačním pulzu.

Měřicí protokol byl následující. Po dobu prvních 9 s svítilo pouze měřící světlo. Poté byl aplikován bílý saturační pulz trvající 1 s. V čase 20 s bylo zapnuto aktinické světlo ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), které svítilo po dobu 10 min. V čase 43 s byl aplikován další saturační pulz, po němž následovala série pulzů vždy po 20 s až do času 623 s (do vypnutí aktinického světla). Poté byly aplikovány další saturační pulzy pro zjištění temnostní relaxace (v časech 643, 687, 715, 748, 787, 813 a 888 s).

3.1.4.5 Izolace tylakoidních membrán

- **Pufr A, pH 7,2:** 34,2 g sacharosu; 2,1 g HEPES; 5,84 g NaCl; 0,2 g $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g askorbátu sodného a 1 g BSA bylo rozpuštěno v destilované vodě bylo upraveno pH a roztok byl doplněn destilovanou vodou do 250 ml.

- **Pufir B, pH 7,5:** 0,6 g HEPES; 0,88 g NaCl; 0,16 g MgCl₂·6H₂O a 0,037 g Na₂EDTA bylo rozpuštěno v destilované vodě, bylo upraveno pH a roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml.
- **Pufir C, pH 7,2:** 13,7 g sacharosu; 1,2 g HEPES; 0,09 g NaCl a 0,1 g MgCl₂·6H₂O bylo rozpuštěno v destilované vodě, bylo upraveno pH a roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml.

Před izolací byly připraveny pufrы A, B a C a byly vychlazeny na 0-4 °C. Květináče s osmidenními rostlinami ječmene setého (WT) a *chloriny (clo)* byly na 20 minut umístěny do tmy. Následné kroky probíhaly při okolním slabém zeleném světle a vzorky byly při zpracování uchovávány na ledu. Po temnostní adaptaci byly odstříženy horní zelené části listů, ty byly přeneseny do kádinky s přibližně 200 ml pufru A. Pro snadnější homogenizaci byly listy v pufru rozstříhány na menší segmenty. Následně byly rozstříhané listy homogenizovány v pufru A s pomocí tyčového homogenizátoru při 13000 rpm. Přičemž kádinka s homogenizovanou směsí byla umístěna na ledu a homogenizace proběhla v 5 až 10 desetisekundových intervalech, mezi nimiž byly vloženy asi patnáctisekundové pauzy.

Homogenát byl poté přefiltrován přes 2 vrstvy nylonové sítky do čisté kádinky umístěné na ledu. Filtrát byl posléze rovnoměrně rozdělen do čtyř 50ml cetrifugačních kyvet a zcetrifugován při 5000g a 4 °C po dobu 6 minut. Supernatant byl odstraněn a pelet byl pomocí štětce resuspendován v pufru B, přičemž vždy 2 a 2 suspenze byly spojeny a přelity do 1 cetrifugační kyvety a doplněny pufrem B do přibližně 40 ml. Výsledkem byly získány 2 cetrifugační kyvety se suspenzemi vzorků v pufru B, které byly následně cetrifugovány při 5000g a 4 °C po dobu 10 minut.

Po cetrifugaci byly znovu odlity supernatanty a pelety byly resuspendovány tentokrát v pufru C. Získané 2 suspenze byly spojeny a byla tak získána 1 cetrifugační zkumavka se suspenzí vzorku. Následovala cetrifugace vzorků (5000g, 4 °C, 10 min). Supernatant byl opět oddělen a pelet byl resuspendován s pomocí pipety v 0,5 ml pufru C. Výsledná suspenze tylakoidních membrán byla zabalena do alobalu a ponechána v nádobě s ledem, dokud nebyl zjištěn obsah chlorofylů v suspenzi a vzorek nebyl rozdělen na alikvóty s obsahem chlorofylů 100 µg·ml⁻¹.

Obsah chlorofylů byl zjištěn spektrofotometricky pomocí dvoupráskového spektrometru Unicam UV550 a skleněných 1cm kyvet a to následujícím postupem.

Do 2ml mikrozkuvek byly napipetovány 2 ml 80% (v/v) roztoku acetonu vychlazeného na 4 °C, do něhož bylo přidáno 10 µl suspenze tylakoidních membrán.

Obsah mikrozkuumavek byl promíchán na vortexu a zcentrifugován (10000g, 4 °C, 10 min). Pro měření obsahu chlorofylů byl odebrán supernatant.

Byla změřena absorbance supernatantu při vlnových délkách 450; 646,2; 663,2 a 750 nm oproti blanku (80% (v/v) vychlazený roztok acetonu). Obsah chlorofylů $a+b$ byl z výsledných absorbancí vypočten s pomocí Lichtenthalerových rovnic (Lichtenthaler, 1987).

Obsah chlorofylů:

$$7,15 \cdot (A_{663,2} - A_{750}) + 18,71 \cdot (A_{646,8} - A_{750}),$$

kde A představuje absorbanci vzorků při daných vlnových délkách (646,8; 663,2 a 750 nm). Pro zjištění výsledné koncentrace chlorofylů v $\mu\text{g/ml}$ u tylakoidních suspenzí byl tento výsledek následně vynásoben ředícím koeficientem 200 (suspenze tylakoidních membrán byla v acetonovém extraktu 200x zředěna).

Suspenze tylakoidních membrán, která byla uchovávána v alobalu na ledu, byla následně rozdělena do alikvótů. Suspenze byly rozpipetovány do 0,5ml mikrozkuumavek a každý vzorek obsahoval 100 μg chlorofylů. Tyto vzorky byly zmrazeny v tekutém dusíku a následně uchovávány v mrazáku při $-80\text{ }^\circ\text{C}$ pro další měření.

3.1.4.6 Elektroforetická separace proteinů tylakoidní membrány

Proteinové komplexy vyizolovaných tylakoidních membrán byly rozděleny s pomocí nativní gelové polyakrylamidové elektroforézy (CN-PAGE, clear native polyacrylamide gel electrophoresis) a následně bylo využito i dvojrozměrné polyakrylamidové gelové elektroforézy (2D SDS-PAGE). Při 2D elektroforéze byly proteiny v prvním rozměru rozděleny pomocí CN-PAGE a při druhém rozměru bylo provedeno rozdělení s pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy za použití dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). V prvním rozměru dochází k rozdělení jednotlivých proteinových komplexů a v druhém se už dělí samotné podjednotky komplexů.

3.1.4.6.1 Nativní elektroforéza proteinů tylakoidní membrány

- **Roztok akrylamidu/bisakrylamidu (AA/BIS; 50% T/2,6% C):** 122 g akrylamidu a 3,3 g N,N'-metylenbisakrylamidu bylo doplněno destilovanou vodou do 250 ml a rozpuštěno.
- **4% zásobní roztok AA/BIS (50 ml):** bylo smícháno 8,33 ml zředěného gelového pufru (gelový pufr 6x koncentrovaný, pH 7,0); 37,67 ml destilované vody a 4 ml roztoku AA/BIS 50% T/2,6% C.

- **8% zásobní roztok AA/BIS (50 ml):** bylo smícháno 10 ml glycerolu; 8,33 ml zředěného gelového pufru (gelový pufr 6x koncentrovaný, pH 7,0); 23,67 ml destilované vody a 8 ml roztoku AA/BIS 50% T/2,6% C.
- **Gelový pufr 6x koncentrovaný, pH 7,0** ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ aminokapronová kyselina; $0,3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Bis-Tris/HCl): 39,4 g aminokapronové kyseliny a 6,3 g Bis-Tris bylo doplněno destilovanou vodou do 100 ml a rozpuštěno. Poté bylo upraveno pH chlorovodíkovou kyselinou.
- **Zásobní katodový (horní) pufr 10x koncentrovaný** ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ tricin; $0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Bis-Tris/HCl): 22,4 g tricinu a 7,8 g Bis-Tris bylo doplněno do 250 ml destilovanou vodou a rozpuštěno.
- **Katodový (horní) pufr pro CN-PAGE, pH 7,0:** bylo smícháno 150 ml zředěného zásobního katodového pufru s 43 mg n-dodecyl- β -D-maltosidu a 86 mg deoxycholátu sodného. Po rozpuštění bylo přidáno 48 μl 35% (w/w) kyseliny chlorovodíkové pro úpravu pH.
- **Anodový (dolní) pufr pro CN-PAGE 1x koncentrovaný, pH 7,0** ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Bis-Tris/HCl): 20,9 g Bis/Tris bylo doplněno destilovanou vodou do 2 l. Po rozpuštění bylo upraveno pH chlorovodíkovou kyselinou.
- **C pufr pro elektroforézu, pH 7,2** ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ sacharosa; $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HEPES/NaOH; $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 10% glycerol): pro přípravu 20 ml roztoku bylo použito 2,7 g sacharosy; 20 mg $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 240 mg HEPES a 20 mg NaCl, vše bylo rozpuštěno v destilované vodě. Bylo upraveno pH a roztok byl doplněn 2 ml glycerolu do 20 ml celkového objemu roztoku.

Gradientový gel pro nativní elektroforézu se naléval do 1mm skel (9 x 5,5 cm). Dělení proteinů probíhalo bez přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS, sodium dodecyl sulfate) za použití šetrnějších detergentů β -dodecylmaltosidu a deoxycholátu sodného. β -dodecylmaltosid se využívá pro šetrnou solubilizaci membránových komplexů, je však bez náboje. Záporný náboj dodává deoxycholát sodný, který se vmezeřuje mezi detergenty micel (membránové komplexy obalené β -dodecylmaltosidem) a umožňuje tak pohyb komplexů v elektrickém poli.

Na začátku byla 1mm skla umístěna do stojánku pro přípravu gelů. Komůrky pro přípravu gradientových gelů byla umístěna na míchačku a připojena na peristaltickou pumpu. Komponenty pro 4% AA/BIS gel byly napipetovány do L komory (vzdálenější od vyústění) a roztoky potřebné pro 8% AA/BIS gel byly přidány do H komory (bližší

k vústění). Do každé komůrky byly napipetovány 3 ml 4% roztoku AA/BIS respektive 8% roztoku AA/BIS. Poté byla zapnuta míchačka na 200 rpm a do každé komůrky bylo přidáno 5 μ l TEMEDu. Poslední přidávanou komponentou byl peroxidisíran amonný (APS), které startuje polymerizaci gelu. Do každé komůrky bylo v rychlém sledu napipetováno 20 μ l 10% (w/w) roztoku APS. Byl otevřen ventil komůrky, byla provedena kontrola, zda je komůrka průchozí a byla zapnuta peristaltická pumpa na 250 rpm. Takto byl nalit gradientový gel do skel asi 1 mm pod okraj a mezi skla byl vložen hřebínek. Stojan se skly byl poté zabalen do igelitové fólie spolu s navlhčeným ubrouskem a gely se nechaly polymerizovat přes noc v lednici při - 4°C.

Příprava vzorků pro CN-PAGE probíhala za okolního slabého zeleného světla a vzorky byly uchovávány na ledu. Vzorky byly připraveny do 0,5ml mikrozkuavek. Do každé mikrozkuavky byl napipetován C pufr pro elektroforézu, 5% roztok β -dodecylmaltosidu a vzorek vyizolovaných tylakoidních membrán dle Tab. 6. Množství vyizolovaných tykaloidních membrán ve vzorku bylo voleno tak, aby v každé jamce bylo množství odpovídající 10 μ g chlorofylů. Poté byly vzorky 10 min inkubovány při 4 °C za občasného promíchávání. Po inkubaci byly zcentrifugovány (10 min, 4 °C, 20000 g).

Mezitím byla nachystána elektroforetická komůrka spolu s pufrý a gely. Byl namíchán a vychlazen katodový (horní) pufr pro CN-PAGE a anodový (dolní) pufr pro CN-PAGE.

Skla s gely byla vyjmuta ze stojánku a byla sestavena elektroforetická komora. Z gelů byly vyjmuty hřebínky a mezi skla s gely byl nalit katodový (horní) pufr po zkontrolování těsnosti skel ve stojanu. Do nádoby elektroforetické komory byl nalit anodový (dolní) pufr. Celá komora byla umístěna do nádoby se směsí ledu a destilované vody.

Po centrifugaci byly supernatanty solubilizovaných vzorků napipetovány do jamek gelů (30 μ l vzorku) a byla spuštěna elektroforéza. Při použití 2 gelů byl na zdroji nastaven program, kdy 15 min byl proud udržován na 7 mA a poté elektroforéza běžela 1 hod

Tab. 6 Rozpis pipetování chemikálií do mikrozkuavek a pořadí pro nanášení vzorků na gel. Vzorky obsahují vyizolované tylakoidní membrány ječmene setého (WT) a jeho mutantní formy *chlorina f2²* (*clo*). Použitým detergentem je n-dodecyl- β -D-maltosid.

Jamky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorek	WT	WT	<i>clo</i>	WT	<i>clo</i>	WT	<i>clo</i>	WT	<i>clo</i>	<i>clo</i>
C pufr	23	23	21,3	21	19,3	19	17,3	17	15,3	15,3
[μ l]										
5% detergent	1	1	1	3	3	5	5	7	7	7
[μ l]										
Vzorek	6	6	7,7	6	7,7	6	7,7	6	7,7	7,7
[μ l]										

při 15 mA. Po doběhnutí programu byly gely vyjmuty z aparatury a ze skel, opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do hladké eurofólie. Gely byly skenovány ve 2 módech na skeneru. Bylo využito kolorimetrického a fluorescenčního módu. Gely ve fólii byly umístěny do přístroje na odpovídající podložky pro jednotlivé módy. Při fluorescenčním skenování byla vybrána vlnová délka excitačního světla odpovídající modré oblasti pro fluorescenci chlorofylu *a* o vlnové délce 420-450 nm. Chlorofyl *a* vyzařuje fluorescenci v červené oblasti, proto bylo nastaveno použití filtru CY5 a byla detekována fluorescence o vlnové délce 690 nm.

Gely byly pro případné další použití zamrazeny a uchovány v -20°C .

3.1.4.6.2 Dvojměrná elektroforéza proteinů tylakoidní membrány

- **Roztok akrylamidu/bisakrylamidu (AA/BIS; 50% T/2,6% C):** 122 g akrylamidu a 3,3 g N,N'-metylenbisakrylamidu bylo doplněno destilovanou vodou do 250 ml a rozpuštěno.
- **Gelový pufr 4x koncentrovaný, pH 8,6** ($2,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris/HCl): 33,9 g Tris bylo doplněno do 100 ml destilovanou vodou.
- **Katodový (horní) pufr 10x koncentrovaný** ($0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris; $1,92 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycin; $35 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS): 30,3 g Tris; 144,2 g glycinu a 10 g SDS bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno do 1 l.
- **Anodový (dolní) pufr 20x koncentrovaný** ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris/HCl): 61 g Tris bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno do 1 l.
- **SDS denaturační pufr, pH 7,5** ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris/HCl; $35 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS): 300 mg Tris bylo rozpuštěno v destilované vodě, bylo upraveno pH a přidán 1 g SDS, roztok byl doplněn do 100 ml destilovanou vodou. Před použitím bylo přidáno $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT (45 mg na 10 ml pufru).

Na začátku byl připraven gradientový denaturační gel do 1,5mm skel. Ten se skládá z gelu separačního a zaostřovacího. Na začátku byla skla umístěna do stojánku a byla označena 1 cm od horní hrany menšího sklíčka a 1,5 cm od horní hrany.

Poté byl namíchán 12% a 19,5% separační a 5% zaostřovací roztok dle Tab. 7. Přičemž močovina přidávaná do roztoku se pomalu rozpouští, proto byla rozpuštěna na teplé vodní lázni, po jejím rozpuštění byl roztok opět vychlazen. Gradient byl připraven s pomocí gradientové komůrky a peristaltické pumpy. Do L komůrky bylo vpraveno 4,65 ml připraveného 12% roztoku a do H komůrky 4,65 ml 19,5% roztoku. Bylo spuštěno míchání při 200 rpm. Do obou komůrek bylo napipetováno 5 μl TEMEDu a 25 μl 10%

Tab. 7 Rozpis chemikálií pro namíchání separačních a zaostřovacích roztoků pro přípravu gradientového denaturačního gelu. AA/BIS je roztok akrylamidu/bisakrylamidu (50% T/2,6% C).

	12% separační roztok	19,5% separační roztok	5% zaostřovací roztok
Sacharosa [g]	-	1,8	-
Močovina [g]	7,7	7,7	-
Gelový pufr [ml]	4,2	4,2	1,2
Voda [ml]	3,9	-	3,25
AA/BIS	4,45	7,2	0,5

APS. Po přidání APS byl otevřen ventilek a po zkontrolování průtoku byla zapnuta peristaltická pumpa na 300 rpm. Skla byla naplněna po nižší značce. Tuhnoucí gel byl převrstven destilovanou vodou a 45 min byl ponechán polymerizovat za laboratorní teploty. Po ukončení polymerizace bylo k připravenému 5% zaostřovacímu roztoku za stálého míchání přidáno 5 μ l TEMEDu a 25 μ l 10% roztoku APS. Po promíchání byl roztok napipetován na separační gel do úrovně horní značky. Gel byl opět převrstven vodou a ponechán ztuhnout. Stojan s gely byl spolu s vlhkým ubrouskem zabalen do igelitové fólie a ponechán přes noc v 4 °C.

Po proběhnutí CN-PAGE byl z gelu vyřezán pás, ten byl umístěn do denaturačního SDS pufru v Petriho misce, kde byl inkubován za mírného třepání po dobu 30 min. Byl namíchán katodový (horní) a anodový (spodní) pufr. Gely ve sklech byly uchyceny do aparatury a po kontrole těsnění skel byl na zaostřovací gel vpraven vyřezaný pás gelu z 1. rozměru. Vedle pásu gelu byl umístěn ústřížek papírku GE healthcare paper Wicks, jehož okraj byl napuštěn 5 μ l markeru. Mezi skla s gely byl nalit katodový (horní) pufr a do nádoby elektroforetické komory byl nalit anodový (dolní) pufr.

Poté byla spuštěna elektroforéza. Na zdroji byl nastaven program, kdy na začátku běžela elektroforéza 30 min při proudu 10 mA a poté další 4,5 hod při 20 mA. Po proběhnutí elektroforézy byly proteiny v gelu obarveny za použití koloidního roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue G-250. Bylo připraveno 50 ml barvicího roztoku smícháním 40 ml zásobního roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 s 10 ml methanolu.

Gel byl opláchnut v Petriho misce s destilovanou vodou. Po slítí vody byl ke gelu přidán barvicí roztok. Gel byl za stálého míchání inkubován v barvicím roztoku přes noc. Po ukončení inkubace byl barvicí roztok z Petriho misky odstraněn. Ke gelu byla přidána destilovaná voda. Po 5 min třepání s vodou byla voda odlita. Poté bylo do Petriho misky s gelem přidáno 50 ml 5% (v/v) kyseliny octové. Gel byl v kyselině octové za stálého míchání na třepačce odbarvován 30 min. Poté byl roztok kyselin vyměněn za čerstvý

a postup byl opakován, dokud nebylo pozadí gelu odbarveno a na gelu byly viditelné pouze modré proteinové spoty. Gel byl poté opláchnutý destilovanou vodou a oskenovaný.

3.1.5 Použité programové vybavení

Amersham Imager 600 software (Cytiva, USA); Biolyzer 2.0 (Hansatech, UK); FluorCam 5.1 (Photon Systems Instruments, ČR); ImageJ 1.x (vytvořené přispěvateli po celém světě); ImageMaster (GE Healthcare, USA); OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, USA); Software Dual-PAM-Instruments (Walz, Německo); VisionPro (Fisher, USA).

3.1.6 Statistická analýza dat

U všech výsledků byla nejdříve data testována na normalitu (Kolmogorov-Smirnov test). Data vyhovující normálnímu rozdělení byla porovnána Studentovým t-testem. Soubory dat s nenormálním rozdělením byla porovnána s pomocí Mann-Whitney testu.

4 VÝSLEDKY

U osmidenních rostlin přirozeného genotypu ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a ječmene mutantního typu *chlorina f2^{f2}* (*clo*) byla provedena řada experimentů za účelem prozkoumání jejich rozdílů ve stavbě a funkci fotosyntetického aparátu.

4.1 Obsah chlorofylů a karotenoidů

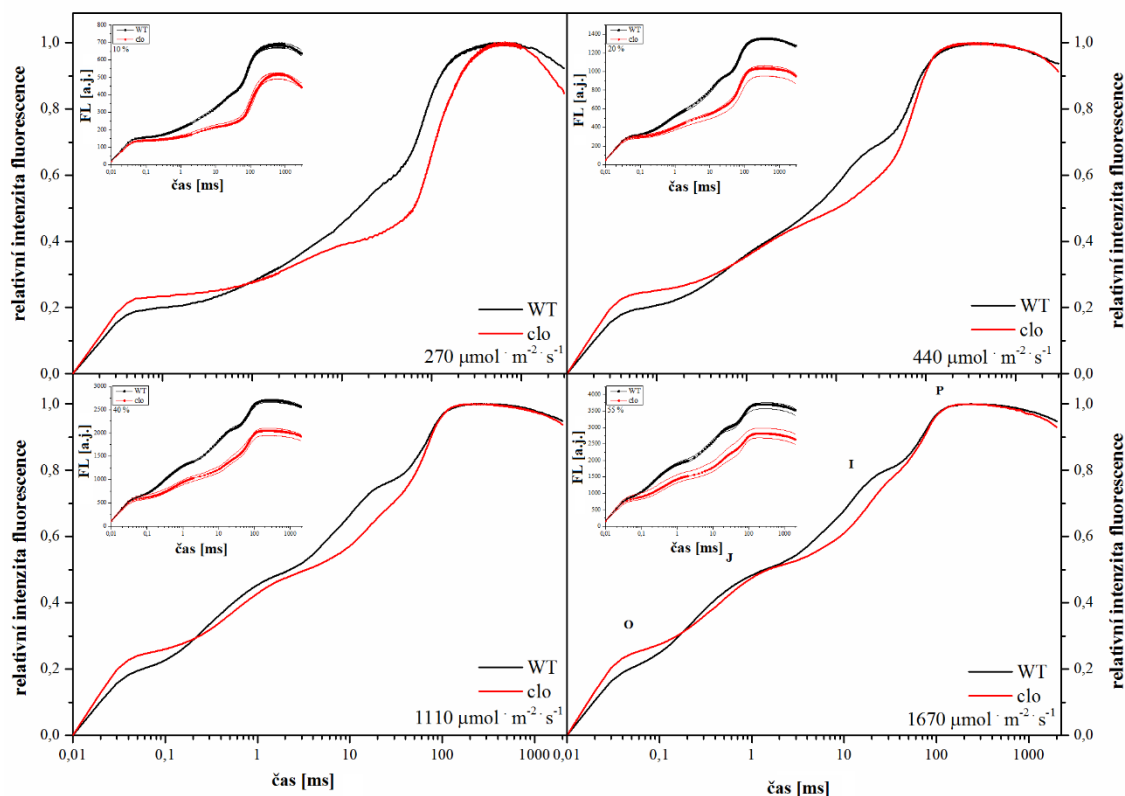
Celkový obsah chlorofylů u *chloriny* byl oproti WT o více než 50 % menší (Tab. 8). Přičemž obsah chlorofylu *a* byl u *clo* snížen přibližně o 34 %, v případě chlorofylu *b* bylo snížení mnohem markantnější, a to o více než 97 %. U *chloriny f2^{f2}* byla očekávána úplná absence chlorofylu *b* (Janečková *et al.*, 2019). Výsledné hodnoty poměru obsahu chlorofylu *a/b* byly vzhledem k předchozím výsledkům několikanásobně vyšší u *chloriny* než u WT. Obsah karotenoidů byl u *clo* o 40 % menší než u WT. Rozdíl v poměru obsahu chlorofylů/karotenoidům nebyl mezi oběma variantami statisticky významný.

4.2 Velmi rychlá fluorescenční indukce

Průběh fluorescence chlorofylu *a* (Obr. 4) a parametry velmi rychlé fluorescenční indukce (Obr. 5, Obr. 6) byly u WT i *chloriny* hodnoceny při použití excitačního světla o intenzitách 270, 440, 1110 a 1670 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Měření bylo realizováno i při vyšších intenzitách (1790 a 2050 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), avšak při takovém osvětlení byly výsledky hodnot fluorescence získány pouze pro *chlorinu*, jelikož při aplikaci světla tak vysokých intenzit byla fluorescence chlorofylu *a* u WT tak vysoká, že přístroj ji nebyl schopen vyhodnotit. Kdežto u *chloriny*, která má nižší obsah chlorofylů (Tab. 8), fluorescence zaznamenána byla a mohly tak být vyhodnoceny její parametry (Obr. 5, Obr. 6).

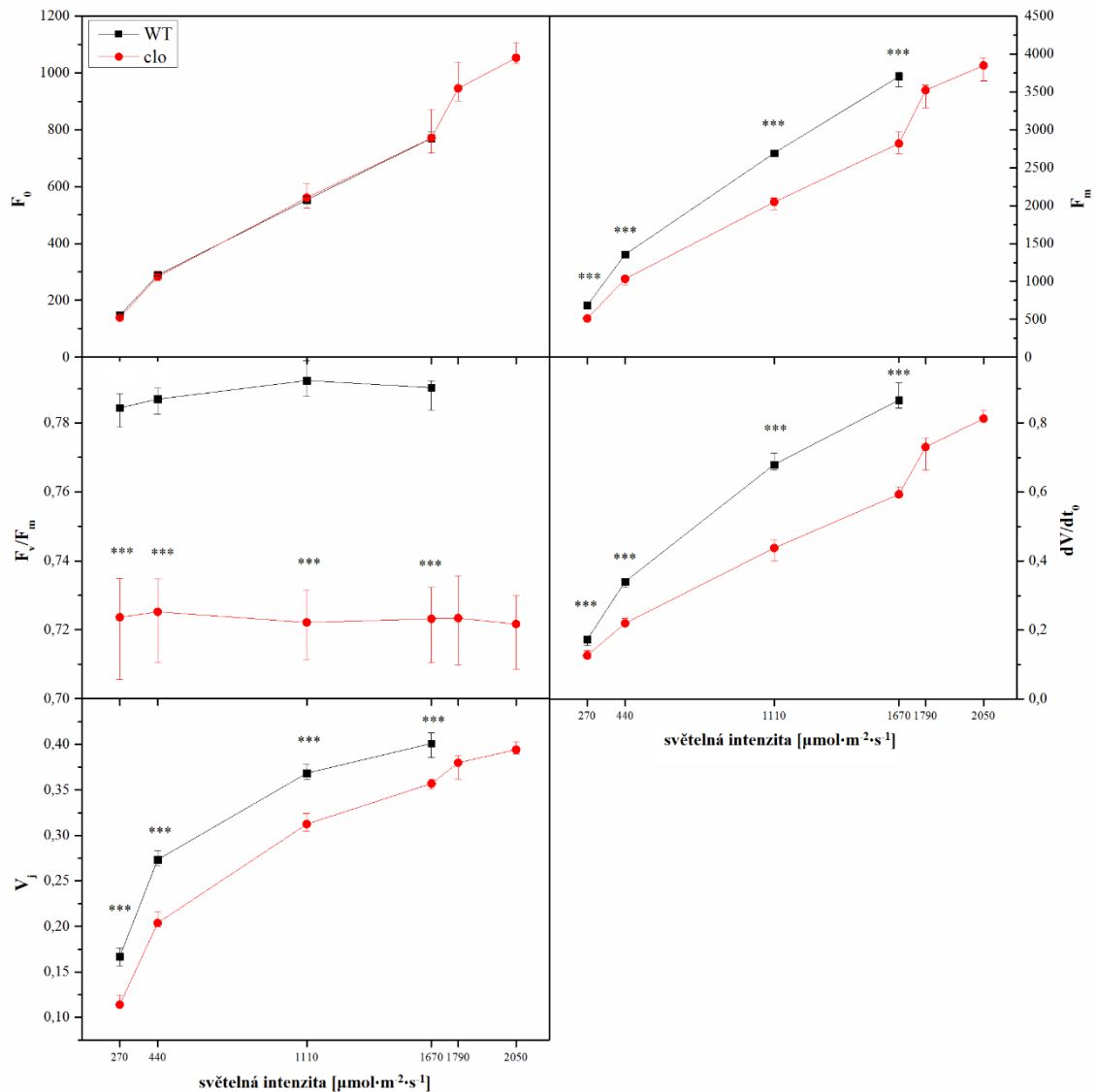
Z časového průběhu prvních 2 s fluorescenční indukce můžeme hodnotit rychlost redukce jednotlivých elektronových akceptorů PSII. U *clo* i WT mají fluorescenční Tab. 8 Výsledné obsahy pigmentů v osmidenních listech ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a jeho mutantní formy *chlorina f2^{f2}* (*clo*). Uvedeny jsou výsledné průměry a SD, počet vzorků n=6. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl (* pro P<0,05; ** pro P<0,01; *** pro P<0,001).

Pigmenty	WT	<i>clo</i>
Chl <i>a</i> [$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$]	102 ± 19	67 ± 20 *
Chl <i>b</i> [$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$]	37 ± 5	0,9 ± 0,5 **
Chl <i>a+b</i> [$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$]	139 ± 22	68 ± 21 **
Chl <i>a/b</i>	2,7 ± 0,5	90 ± 53 **
Car [$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$]	30 ± 3	18 ± 3 **
Chl/car	4,7 ± 0,8	3,8 ± 0,9



Obr. 4 Křivky časového průběhu relativní intenzity fluorescence (O-J-I-P křivky) osmidenních listů ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a jeho mutantní formy *chlorina f2²* (*clo*) při různých světelných intenzitách. V hlavních grafech jsou zaznamenány mediány a křivky jsou normovány na výchozí hodnotu a hodnotu maximální fluorescence F_m . V náhledech se nachází O-J-I-P křivky intenzity fluorescence (FL[a. j.]), jsou zde uvedeny mediány spolu s horními a dolními kvartily. Počet vzorků $n=13-14$.

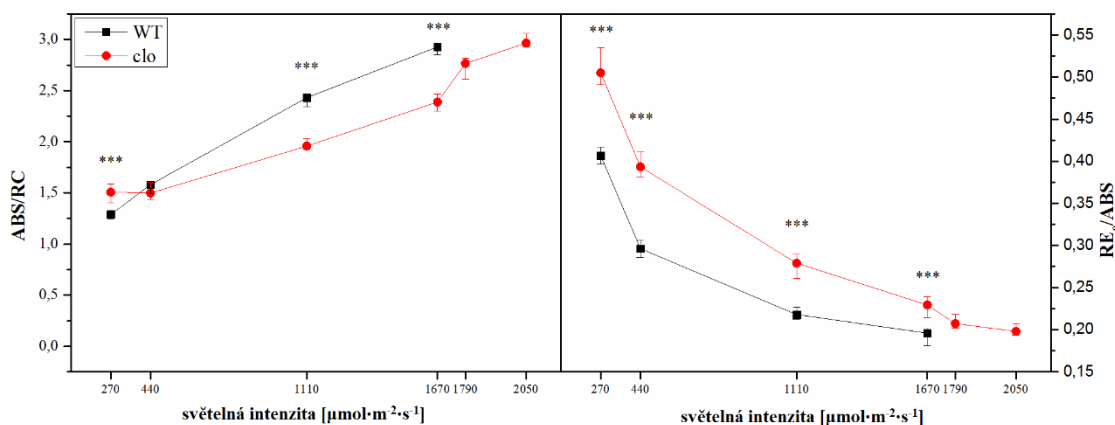
křivky typický průběh, avšak u *chloriny* vidíme nižší hodnoty fluorescence a pomalejší nárůst křivky v prvních 50 ms (Obr. 4). U *clo* pozorujeme, že vlny J a I, vedle toho že jsou nižší, dosahují svého maxima později než u WT. Tento výsledek znamená, že u *chloriny* se chinonové akceptory elektronů Q_A a Q_B redukují pomaleji než u WT (Schansker *et al.*, 2005; Kalaji *et al.*, 2014). Tento fakt odpovídá signifikantně snížené hodnotě dV/dt_0 , která odráží rychlost akumulace Q_A^- (Schansker *et al.*, 2005). Z pomalejšího nárůstu vlny J můžeme soudit, že přísun excitací do reakčních center je u *clo* pomalejší než u WT. Uvedená skutečnost naznačuje, že relativní zastoupení antén je u *chloriny* nižší. Tento fakt potvrzuje i parametr ABS/RC (Obr.6), který určuje množství absorbované energie vztahované na aktivní reakční centra, jelikož hodnota ABS/RC byla u *chloriny* nižší než u WT (Obr. 6). Avšak při nízkých světelných intenzitách tomu bylo naopak. Nižší hodnota ABS/RC odráží menší množství absorbované energie připadající na reakční centrum, a tak se nepřímo vztahuje i na velikost antén reakčních center. U *clo* proto při nižších intenzitách patrně dochází k účinnějšímu přenosu excitační energie k reakčním centrům.



Obr. 5 Vybrané parametry velmi rychlé fluorescenční indukce osmidenních listů ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a jeho mutantní formy chlorina $f2^{f2}$ (*clo*) při různých světelných intenzitách. F_0 představuje hodnotu minimální fluorescence, F_m maximální fluorescence, F_v/F_m je maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu, dV/dt_0 určuje změnu intenzity fluorescence s časem na počátku indukčního jevu, V_j reprezentuje relativní výšku vlny J. Body grafu představují hodnoty mediánů, chybové úsečky jsou horní a dolní kvartily, počet vzorků $n=13-14$. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl (* pro $P<0,05$; ** pro $P<0,01$; *** pro $P<0,001$).

Můžeme také vidět, že *chlorina* má plošší vlnu I (Obr. 4), což souvisí s pomalejší redukcí rychle se redukujících plastochinonů (Q_A). Tento efekt není pozorován u pomalu se redukujících plastochinonů (Q_B), jelikož vlna P u *chloriny* není plochá a objevuje se ve stejném čase jako u WT (Stirbet *et al.*, 2018).

Vyšší hodnota RE_0/ABS (Obr. 6) u *clo* nám naznačuje, že přenos elektronů z PSII k PSI je u *chloriny* účinnější než u přirozeného genotypu ječmene. Z tohoto výsledku



Obr. 6 Vybrané parametry velmi rychlé fluorescenční indukce osmidenních listů ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a jeho mutantní formy *chlorina f2^{f2}* (*clo*) při různých světelných intenzitách. ABS/RC představuje množství absorbované energie vztáhnuté na aktivní reakční centra RE₀/ABS prezentuje kvantový výtěžek elektronového transportu z Q_A⁻ k finálnímu akceptoru PSI. Body grafu představují hodnoty mediánů, chybové úsečky jsou horní a dolní kvartily, počet vzorků n= 13-14. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl (* pro P<0,05; ** pro P<0,01; *** pro P<0,001).

usuzujeme, že účinnost fotochemie přes PSI je u *clo* redukována méně než u PSII a fotosyntetický aparát *clo* tak odčerpává elektrony z PSII účinněji než u WT.

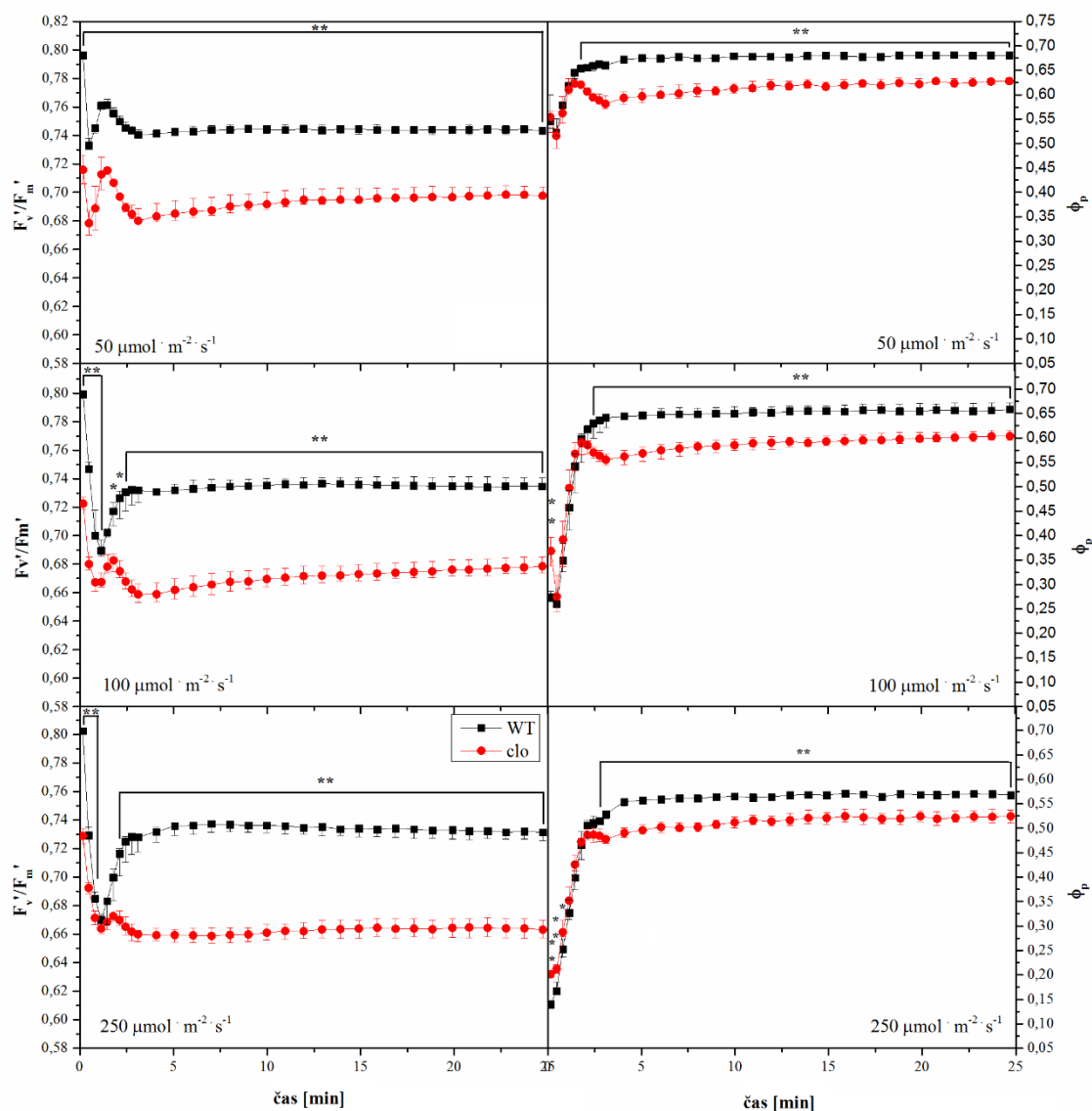
Hodnoty minimální fluorescence F₀ (Obr. 5) jsou u *clo* i WT srovnatelné. U obou jedinců byla reakční centra po 25 min adaptace na tmu připravena přijmout excitace. U maximální fluorescence F_m (Obr. 5) už můžeme pozorovat rozdíly mezi WT a *clo*. U *clo* jsme pozorovali snížení maximální fluorescence oproti WT. Tento rozdíl se prohlubuje spolu s narůstající intenzitou aplikovaného světla. Při 1670 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ je parametr F_m u *clo* snížen o více než 20 %. Z těchto výsledků můžeme usuzovat, že *chlorina* měla změněnou spíše maximální účinnost reakčních center než jejich relativní zastoupení, protože maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu (F_v/F_m) je u *chloriny* snížený, a to jak při nižších, tak i vyšších intenzitách světla (Obr. 5). Snížení účinnosti fotochemie u *clo* je cca 7-8% oproti WT.

4.3 Pomalá fluorescenční indukce

4.3.1 Zhášecí analýza

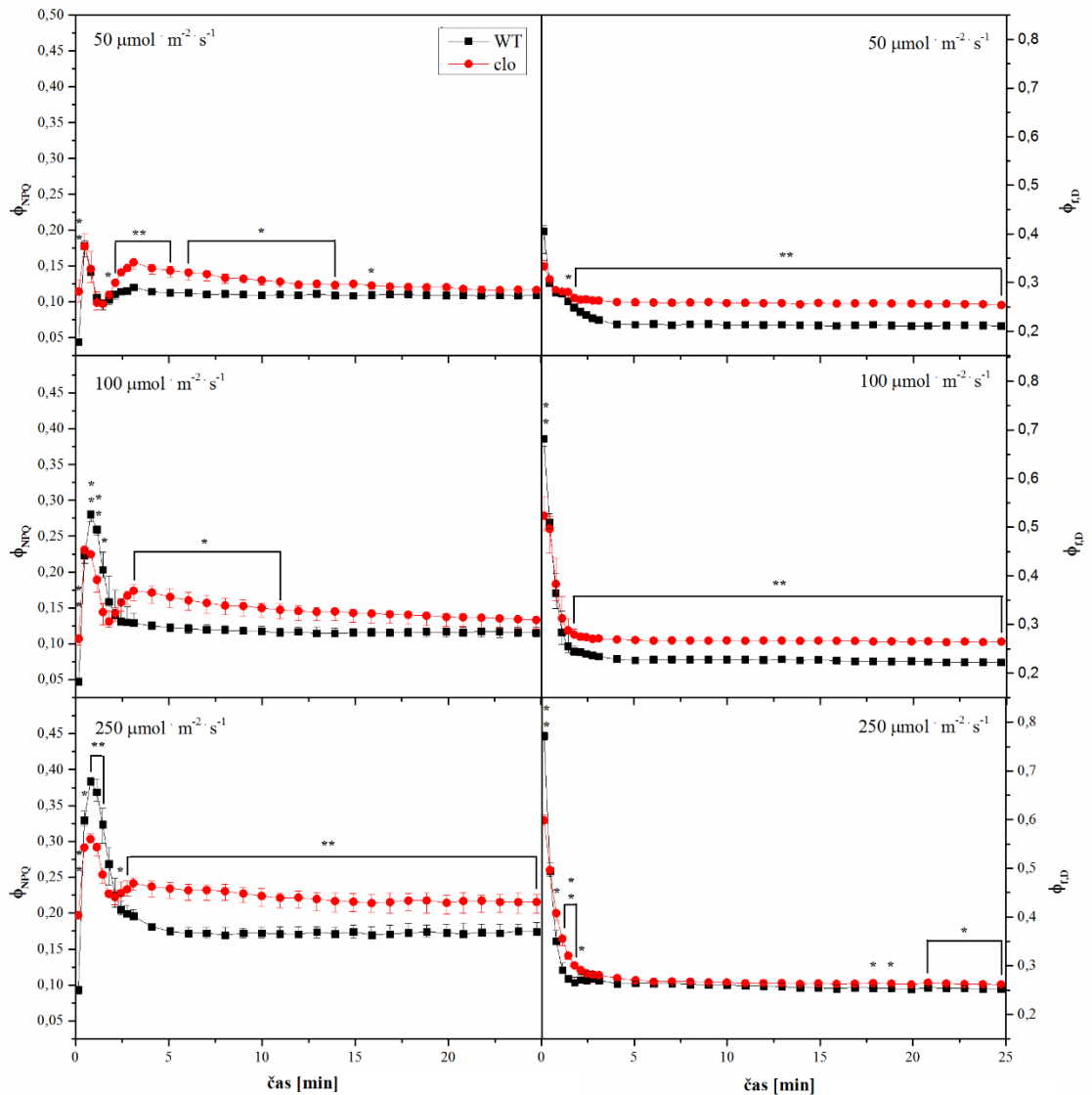
U zhášecí analýzy pozorujeme velmi zajímavou kinetiku složek zhášení fluorescence chlorofylu u *chloriny* odlišnou než byla u WT (Obr. 7, Obr. 8, Obr. 9).

Parametr F_v'/F_m' odrážející maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII v průběhu adaptace na světlo vykazuje při spuštěném aktinickém světle o intenzitě 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ podobnou kinetiku u *clo* a WT, avšak u *clo* je tento parametr po celou dobu měření udržován na nižších hodnotách (Obr. 7). Avšak u intenzit vyšších



Obr. 7 Maximální (F_v/F_m) a aktuální (Φ_p) kvantový výtěžek fotochemie PSII v průběhu adaptace na různé světelné intenzity. Zhášecí analýzy fluorescence chlorofylu byly provedeny na osmidenních listech ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a jeho mutantní formy *chlorina f2^{f2}* (*clo*) v průběhu adaptace na různé světelné intenzity. Body grafu představují hodnoty mediánů, chybové úsečky jsou horní a dolní kvartily, počet vzorků $n=5-7$. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl v hodnotách parametru mezi *chlorinou* a WT (* pro $P<0,05$; ** pro $P<0,01$; *** pro $P<0,001$).

(100 a 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) už je i kinetika u *clo* a WT odlišná. U *chloriny* je mezi 2. a 4. min aklimace na aktinické světlo patrný výraznější pokles F_v/F_m , který si *clo* zachovala i při zvýšení intenzity aktinického světla z 50 na 100 a 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, přičemž u WT byl tento pokles pozorován pouze u 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. U 100 a 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ byl patrný mnohem méně. Při aktinickém světle o intenzitě 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ byl u WT v 2. až 3. min zaznamenán velmi výrazný nárůst F_v/F_m , od 5. min se hodnota F_v/F_m držela více méně na ustálené hodnotě (v na světlo adaptovaném stavu). Tato hodnota byla s rostoucí intenzitou stále výrazněji vyšší u WT než u *clo*. Hodnoty F_v/F_m jsou u *chloriny* podle

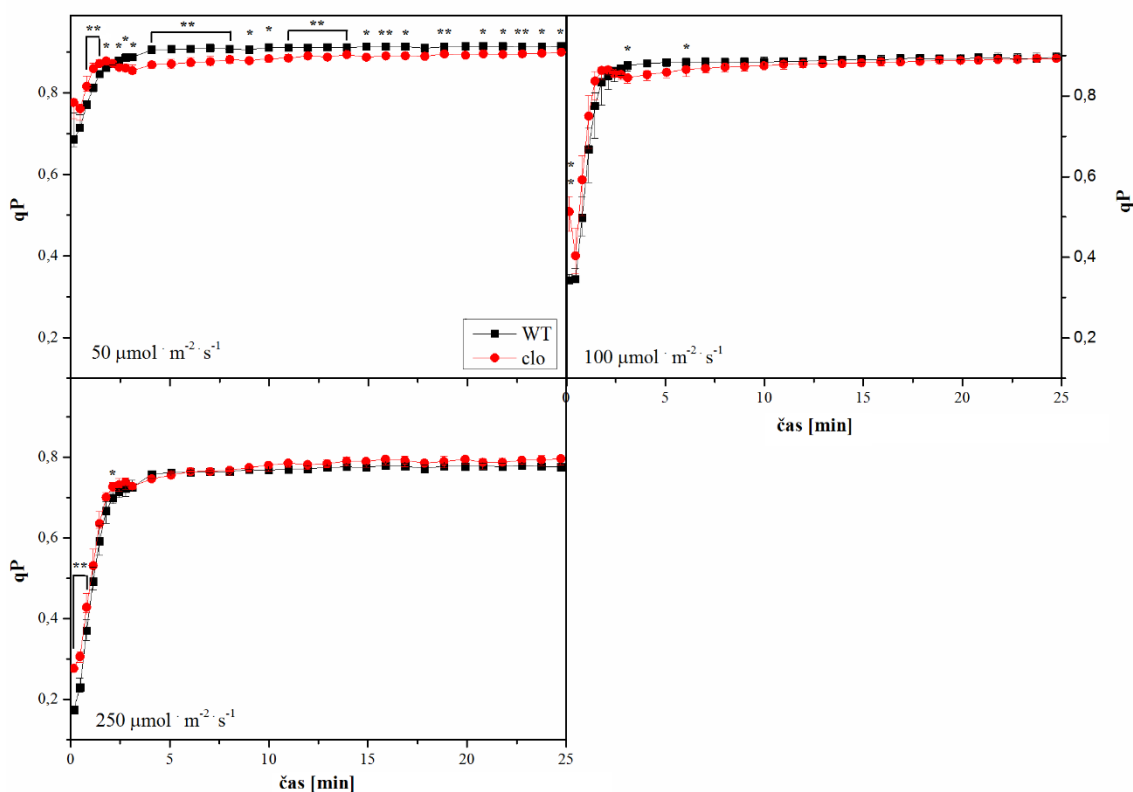


Obr. 8 Kvantový výtěžek regulovatelného světlem indukovaného nefotochemického zhášení (Φ_{NPQ}) a kvantový výtěžek konstitutivní neregulovatelné disipace (Φ_{FD} , fluorescence a tepelná disipace). Zhášečí analýzy fluorescence chlorofylu byly provedeny na osmidenních listech ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a jeho mutantní formy *chlorina f2²* (*clo*) v průběhu adaptace na různé světelné intenzity. Body grafu představují hodnoty mediánů, chybové úsečky jsou horní a dolní kvartily, počet vzorků $n=5-7$. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl v hodnotách parametru mezi *chlorinou* a WT (* pro $P<0,05$; ** pro $P<0,01$; *** pro $P<0,001$).

očekávání nižší než u WT vzhledem k nižšímu obsahu chlorofylů v listech *clo*. U aktuálního kvantového výtěžku fotochemie v průběhu adaptace na světlo (Φ_p) pozorujeme u *chloriny* oproti WT při $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzitě aktinického světla pokles fotochemie mezi 2. a 4. min (Obr. 7). Tento pokles však je při 100 a $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzitách aktinického světla méně strmý. Pokles účinnosti fotochemie u *chloriny* mezi druhou a čtvrtou minutou odráží nárůst regulovatelných nefotochemických procesů Φ_{NPQ} (Obr. 8).

U WT dochází při aktinickém světle o intenzitě 100 a 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ v prvních 2 minutách k výraznějšímu nárůstu Φ_{NPQ} než u *chloriny*. Při 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ je počáteční kinetika u *clo* a WT podobná. Okolo 2. min dochází u *clo* při všech použitých intenzitách aktinického světla k prudkému vzrůstu regulovaného nefotochemického zhášení, který nevidíme u WT. Toto zjištění ukazuje na jinou kinetiku nefotochemického zhášení u *chloriny*. Hodnoty fluorescence a tepelné disipace $\Phi_{\text{f,D}}$ (Obr. 8) jsou u *clo* na počátku zhášecí analýzy nižší u všech použitých intenzit osvětlení, avšak poté je klesání hodnot pomalejší u *clo* při 50 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a v ustáleném stavu má *chlorina* v těchto případech vyšší podíl fluorescence a tepelné disipace než WT. Při použití aktinického světla o intenzitě 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ byla hodnota $\Phi_{\text{f,D}}$ na konci relaxační analýzy překvapivě podobná u *clo* jako u WT.

Co se počtu otevřených reakčních center (qP) týká, rozdíly u *clo* a WT nejsou tolik výrazné (Obr. 9). Hodnoty parametru qP jsou u nich na podobné úrovni. U intenzity

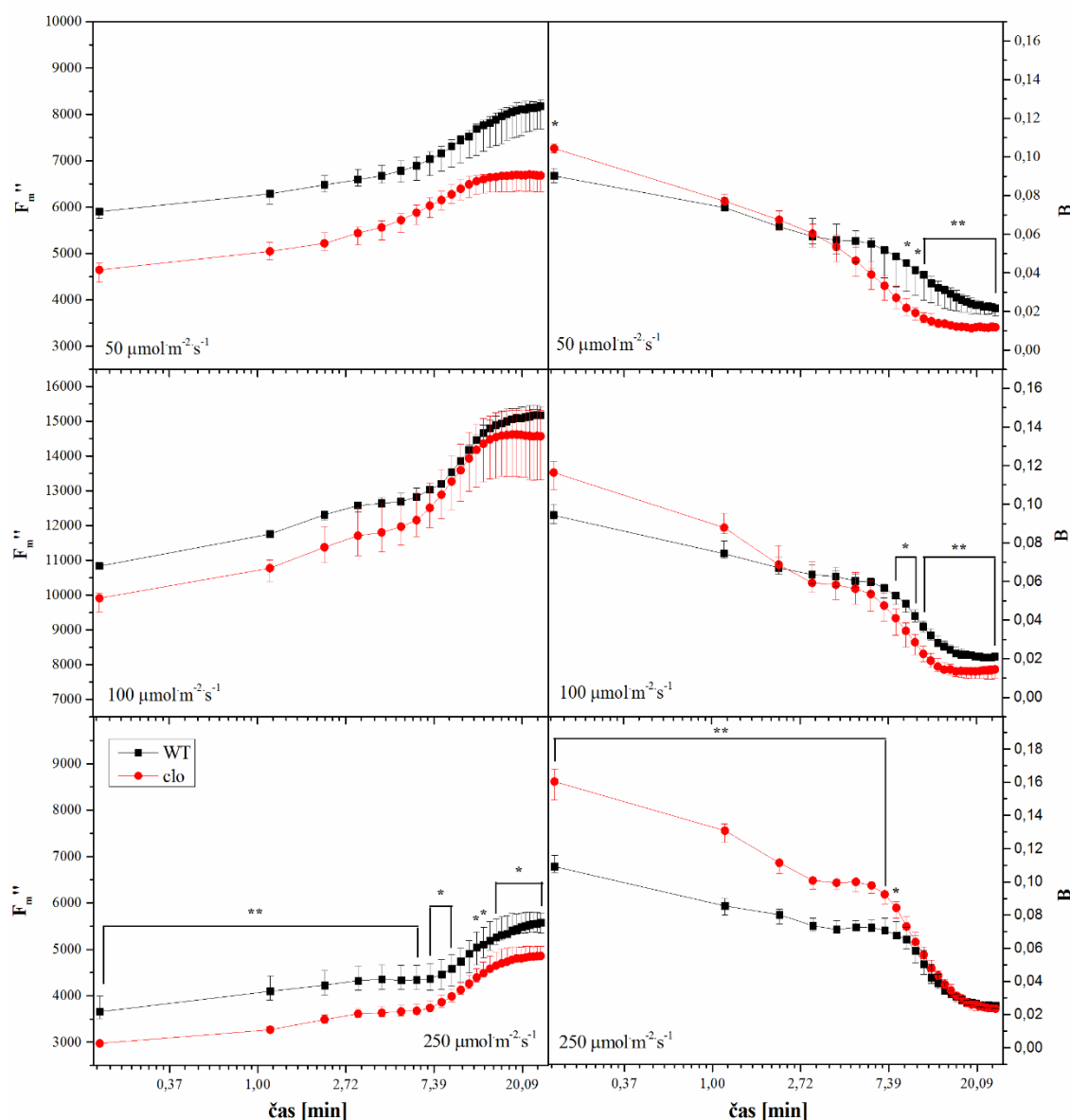


Obr. 9 Fotochemické zhášení fluorescence chlorofylu (qP) osmidenních listů ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a jeho mutantní formy *chlorina f2^{f2}* (*clo*) v průběhu adaptace na různé světelné intenzity. Body grafu představují hodnoty mediánů, chybové úsečky jsou horní a dolní kvartily, počet vzorků n= 5-7. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl v hodnotách parametru mezi *chlorinou* a WT (* pro P<0,05; ** pro P<0,01; *** pro P<0,001).

50 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ opět můžeme pozorovat odlišnou kinetiku parametru u *chloriny*, přičemž v časech okolo 2 min se u *clo* vyskytuje pík, který nepozorujeme u WT.

4.3.2 Relaxační analýza

Hodnoty maximální fluorescence ve tmě po předchozím osvětlení (F_m'') byly v průběhu celé relaxační analýzy u *clo* mutantních rostlin nižší než u přirozeného genotypu ječmene (Obr. 10). Po předchozím vystavení vyšším intenzitám světla tento rozdíl není tak výrazný jako po 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Počet fotoinaktivovaných reakčních center (B) je



Obr. 10 Maximální fluorescence v průběhu adaptace na tmu po předchozím osvětlení (F_m'') o uvedených intenzitách a kvantový výtěžek energie disipované fotoinaktivovanými centry (B). Relaxační analýzy fluorescence chlorofylu byly realizovány na osmidenních listech ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a jeho mutantní formy *chlorina f2²* (*clo*). Body grafu představují hodnoty mediánů, chybové úsečky jsou horní a dolní kvartily, počet vzorků n= 5-7. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl mezi *chlorinou* a WT (* pro $P<0,05$; ** pro $P<0,01$; *** pro $P<0,001$).

na počátku temnostní relaxace u *chloriny* vyšší u všech intenzit použitého aktinického světla. To se však v případech přechozího osvětlení o intenzitách 50 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ v průběhu temnostní relaxace mění a *chlorina* má na konci měření nižší počet fotoinaktivovaných center než WT. Můžeme tak usuzovat vyšší míru fotoinhibice u WT. Tento trend se však nevyskytuje při předchozím osvětlení o intenzitě 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, kdy je na konci měření hodnota B na srovnatelné úrovni u *clo* i WT.

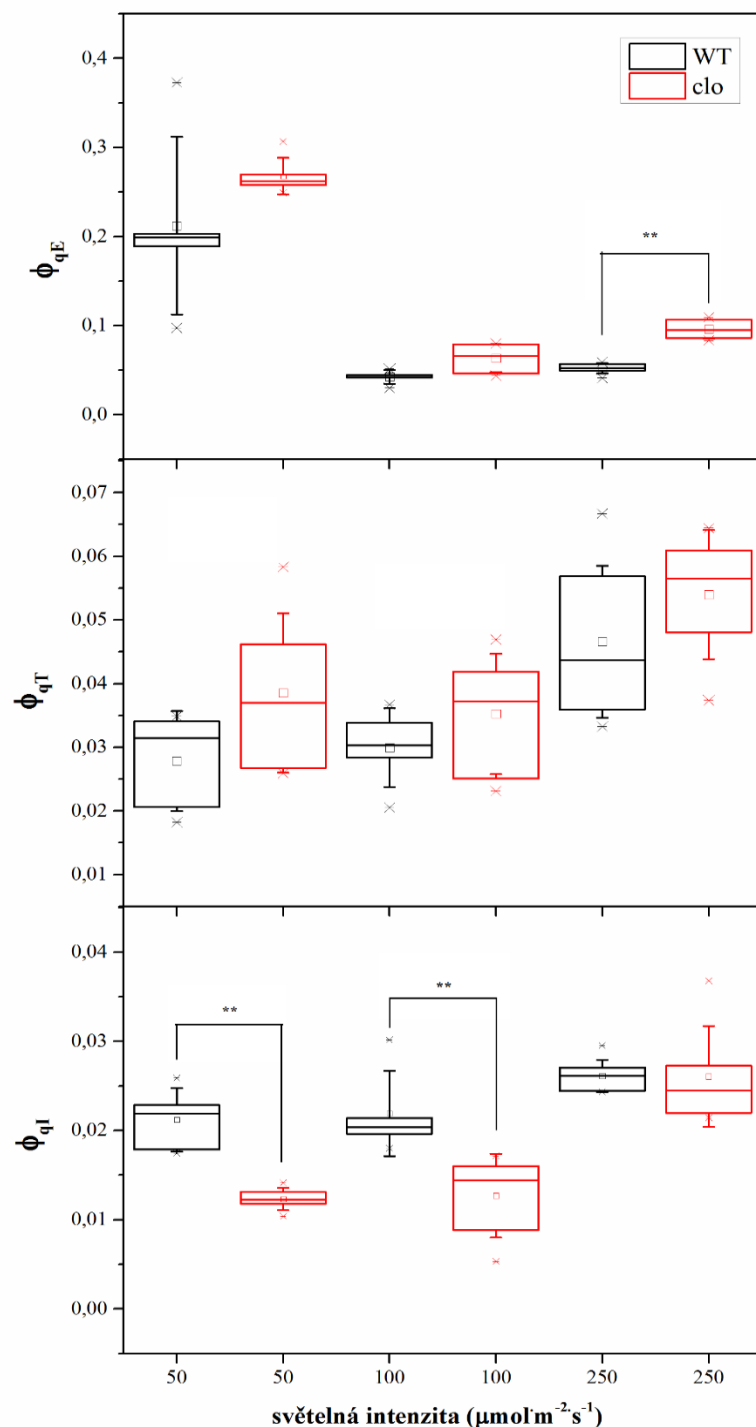
Kinetický průběh parametrů relaxační analýzy je u *chloriny* odlišný oproti WT. Různé kinetiky naznačují, že u *clo* se složky zhášení uplatňují v odlišné míře i v odlišných časech. Pravděpodobně u *chloriny* pozorujeme složku zhášení, která není u WT patrná.

Z kinetik relaxace F_m'' (Obr. 10) můžeme vyhodnotit zastoupení jednotlivých složek světlem indukovaného nefotochemického zhášení. Na grafech (Obr. 11) už můžeme vidět jednotlivé složky regulovaného nefotochemického zhášení (NPQ) u WT a *chloriny*. Tyto parametry byly hodnoceny při temnostní relaxaci po osvětlení listů aktinickým světlem o různých intenzitách (50, 100 a 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Pro výpočet hodnot kvantových výtěžků těchto složek bylo z kinetik relaxace F_m'' třeba nejprve stanovit časy $F_m^{x''}$ a $F_m^{y''}$ (Tab. 2), kdy exponenciální průběh jedné složky přechází v druhou. Za rozbor průběhu relaxací F_m'' a stanovení $F_m^{x''}$ a $F_m^{y''}$ dle výpočtů publikované práce (Roháček, 2010) děkujeme Doc. Lazárovi z katedry biofyziky.

Když se zaměříme na parametr Φ_{qE} (Obr. 11), který odpovídá kvantovému výtěžku nefotochemického zhášení závislého na gradientu pH, můžeme vidět, že statisticky významný rozdíl mezi *chlorinou* a WT se nachází pouze v případě předešlé aplikace aktinického světla o intenzitě 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Hodnota Φ_{qE} je při této intenzitě osvětlení u *chloriny* vyšší než u WT. U kvantového výtěžku nefotochemického zhášení souvisejícího se stavovými přechody (Φ_{qT}) nepozorujeme statisticky významné rozdíly mezi *chlorinou* a WT. U *chloriny* při předešlé aplikaci aktinického světla o intenzitě 50 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ byl zaznamenán nižší kvantový výtěžek fotoinhibičního nefotochemického zhášení (Φ_{qI}) než u WT.

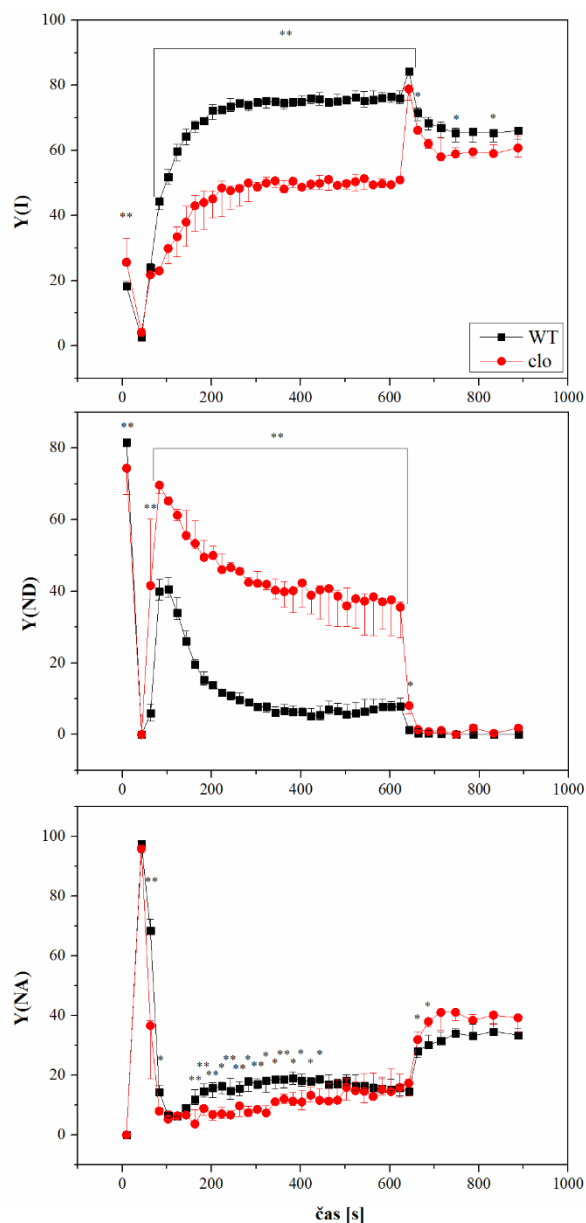
4.4 Redoxní stav PSI a plastocyaninu

Při měření pulzní amplitudové modulace měly listy *clo* v 1. pulzu po přechodu ze stavu adaptovaného na tmu účinnější fotochemii PSI (Y(I)) a nižší limitaci fotochemie PSI na donorové straně (Y(ND)) než přirozený genotyp ječmene (Obr. 12). Tento výsledek koresponduje s výsledky parametru RE_0/ABS naměřenými při analýze velmi rychlé indukce fluorescence chlorofylu (Obr. 6). U *chloriny* byla oproti WT zaznamenána vyšší



Obr. 11 Jednotlivé složky nefotochemického zhášení listů ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a jeho mutantní formy *chlorina f2^{f2}* (*clo*) při temnostní relaxaci po předchozí aplikaci aktinického světla o uvedených intenzitách. Φ_{qE} odpovídá kvantovému výtěžku nefotochemického zhášení závislého na gradientu pH přes tylakoidní membránu, Φ_{qT} je kvantový výtěžek nefotochemického zhášení souvisejícího se stavovými přechody a Φ_{qI} představuje kvantový výtěžek fotoinhibičního nefotochemického zhášení. Okraje boxů odpovídají hornímu a dolnímu kvartilu, vnitřní čáry v boxech jsou hodnoty mediánů. Chybové úsečky prezentují hodnoty SD, čtverečky uvnitř boxů jsou průměry a křížky odpovídají minimální a maximální hodnotě parametru souboru dat. Počet vzorků $n=5-7$. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl mezi *chlorinou* a WT (* pro $P<0,05$; ** pro $P<0,01$; *** pro $P<0,001$).

hodnota RE_0/ABS , jež odráží kvantový výtěžek elektronového transportu z Q_A^-



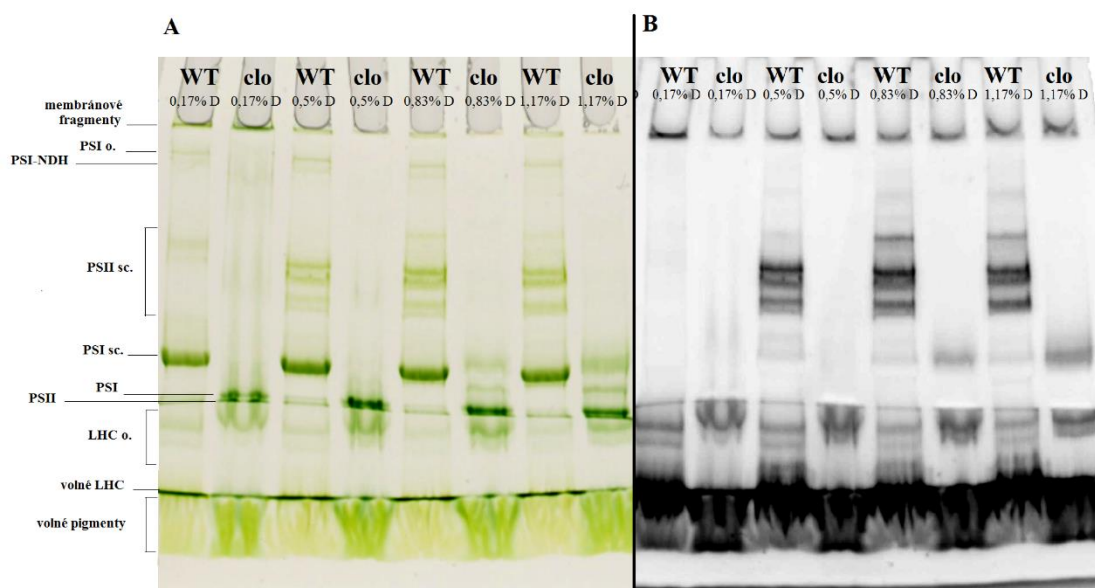
Obr. 12 Časový průběh hodnot parametrů pulzní amplitudové modulační techniky osmidenních listů ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a jeho mutantní formy *chlorina f2^{f2}* (*clo*). Parametr Y(I) popisuje kvantový výtěžek fotochemie PSI, Y(ND) představuje kvantový výtěžek nefotochemické disipace PSI kvůli limitaci na donorové straně a Y(NA) je kvantový výtěžek nefotochemické disipace PSI kvůli limitaci na akceptorové straně. Body grafu představují hodnoty mediánů, chybové úsečky jsou horní a dolní kvartily, počet vzorků n= 5-6. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl mezi hodnotou parametru u *chloriny* a WT (* pro P<0,05; ** pro P<0,01; *** pro P<0,001).

k finálnímu akceptoru PSI. Výsledky nezávislých analýz Y(I) a RE₀/ABS se tedy navzájem podporují. V průběhu adaptace na světlo se však fotochemie PSI u *chloriny* podobně jako u WT snížila a při následném nárůstu už pak hodnoty Y(I) u *clo* zůstávaly významně pod úrovní hodnot fotochemie PSI naměřených u WT (Obr. 12). Kvantový výtěžek nefotochemické disipace v PSI kvůli limitaci na donorové straně (Y(ND)) pak

byl u *clo* výrazně vyšší než u WT. Avšak nefotochemické procesy, které vznikly v důsledku limitace na akceptorové straně (Y(NA)) jsou u *chlorina* a WT na srovnatelných hodnotách. Z těchto výsledků plyne, že nedostatek chlorofylu *b* u *chlorina* mutanta ovlivňuje podstatně více donorovou stranu elektronového transportního řetězce PSI, u akceptorové strany nebyla zaznamenána rozdílná inhibice oproti WT. Snížené hodnoty fotochemie PSI tedy souvisely s tokem elektronů ze směru od PSII. PSII pravděpodobně nestíhá dodávat elektrony, aby mohl být využit plný potenciál PSI. PSI a plastocyanin nebyly nedostatkem chlorofylu *b* tak výrazně ovlivněny na efektivitě jako PSII.

4.5 Nativní gelová elektroforéza

Na elektroferogramech (Obr. 13) můžeme vidět pigment-proteinové komplexy a jejich podjednotky. Rozdíl mezi kolorimetrickým (část A) a fluorescenčním (část B) zobrazením spočívá v tom, že za laboratorní teploty fluoreskuje převážně chlorofyl *a*, který je součástí PSII. Ve fluorescenčním zobrazení tedy chybí pásy, které náleží PSI. Rozdělené pigment-proteinové komplexy WT a *clo* jsou na první pohled rozdílné. U obou



Obr. 13 Elektroferogramy pigment-proteinových komplexů tylakoidních membrán osmidenních listů ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT) a jeho mutanti formy *chlorina f2²* (*clo*). Pigment-proteinové komplexy byly rozděleny s pomocí nativní gelové polyakrylamidové elektroforézy (CN-PAGE), jako detergent (D) byl použit β -dodecylmaltosid v uvedených koncentracích v záhlaví obrázku. Obrázek A představuje kolorimetrické zobrazení gelu a B fluorescenční. PSI o. jsou oligomery fotosystému I, PSI-NDH představuje spojený komplex fotosystému I s NADH dehydrogenasa-like komplexem, PSII sc. jsou superkomplexy fotosystému II, PSI sc. znázorňuje superkomplex fotosystému I, PSI je fotosystém I a PSII je fotosystém II. LHC o. představují oligomerní světlosběrné komplexy a volné LHC jsou volné světlosběrné komplexy.

vzorků můžeme těsně pod jamkami gelu pozorovat pás membránových fragmentů. U WT se pod tímto pásem nachází další 2, které patří oligomerům PSI a komplexu PSI-NDH. Ty u *chloriny* nebyly viditelné, chlorofyl *b*, který je u ní v nedostatku, má pravděpodobně vliv na uspořádání těchto komplexů a u *chloriny* se tudíž v této podobě nenachází. Dále se v dráze proteinů u WT nachází superkomplexy PSII. Jsou to PSII s navázanými LHCI anténami v různých podobách. Lehčí superkomplexy doputovaly v dráze dál, na obrázku gelu se vyskytují níže, mají na sobě navázán menší podíl LHCI antén. Tyto PSII superkomplexy nejsou u *chloriny* pozorovány, čímž potvrzujeme, že chlorofyl *b* je stěžejní pro uspořádání superkomplexů PSII-LHCI (Wang a Grimm, 2016).

Pod PSII superkomplexy se v elektroforetické dráze u WT nachází superkomplex PSI. Pruh náležící PSI se u *chloriny* nachází na gelu níž. Z této skutečnosti usuzujeme, že LHCI antény, které jsou u WT navázány na PSI, se u *chloriny* vyskytují v nižším množství nebo nejsou navázány vůbec. Proto má pás příslušící PSI u *chloriny* nižší molekulovou hmotnost a doputoval na gelu dál. Nemůžeme si však být jistí, zda se jedná o čistý jaderný komplex PSI, nebo na něm jsou navázány nějaké přídavné antény. Spolu s vyšší koncentrací β -dodecylmaltosidu (0,83% a 1,17%) ve vzorcích se u *chloriny* nad pásem náležícím PSI objevují další 2 pruhy. Z výsledků následné SDS-PAGE v druhém rozměru lze usoudit, že tyto pásy pravděpodobně náleží dimeru PSII a komplexu PSI-LHCI.

U *chloriny* se těsně pod PSI nachází pruh odpovídající jaderné části PSII. V dolní části elektroferogramů se poté nachází světlosběrné komplexy, a to v podobě oligomerů, či jako volné LHC. U *chloriny* se nachází menší množství LHC, jelikož pruhy jim náležící mají u *chloriny* zřetelně nižší denzitu.

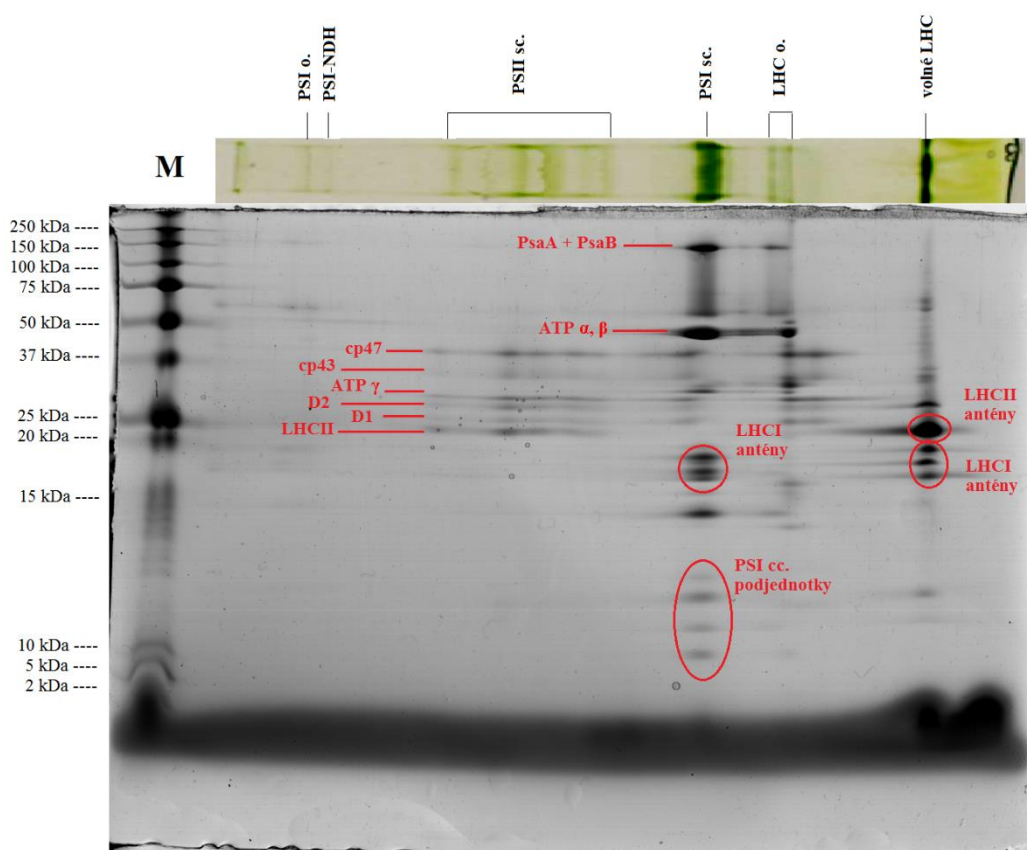
Z prezentovaných výsledků můžeme tedy vyvozovat, že *chlorina* má menší množství antén a tyto antény jsou také v menší míře vázány na fotosystémy. Celkově se u *chloriny* nachází pigment-proteinové komplexy s nižšími molekulovými hmotnostmi. Složitější struktury, které jsou rozměrnější a těžší, jsou pozorovatelné pouze u ječmene přirozeného genotypu. U *chloriny* nejsou fotosystémy asociovány se světlosběrnými komplexy takovou měrou jako u WT. Tento jev zřejmě souvisí s menším množstvím světlosběrných komplexů *chloriny*.

4.6 Dvojměrná gelová elektroforéza

Pro druhý rozměr elektroforézy byly vybrány dráhy se vzorky s 0,83% obsahem detergentu. Při tomto obsahu detergentu jsou na gelu nativní elektroforetické separace

pigment-proteinových komplexů nejlépe viditelné analyzované pásy (Obr. 13). Výsledky separace podjednotek pigment-proteinových komplexů byly hodnoceny na základě specifického vzoru rozmístění spotů na SDS gelu, dle již dříve publikovaných prací (Caffarri *et al.*, 2009; Järvi *et al.*, 2011; Wang a Grimm, 2016; Grebe *et al.*, 2019).

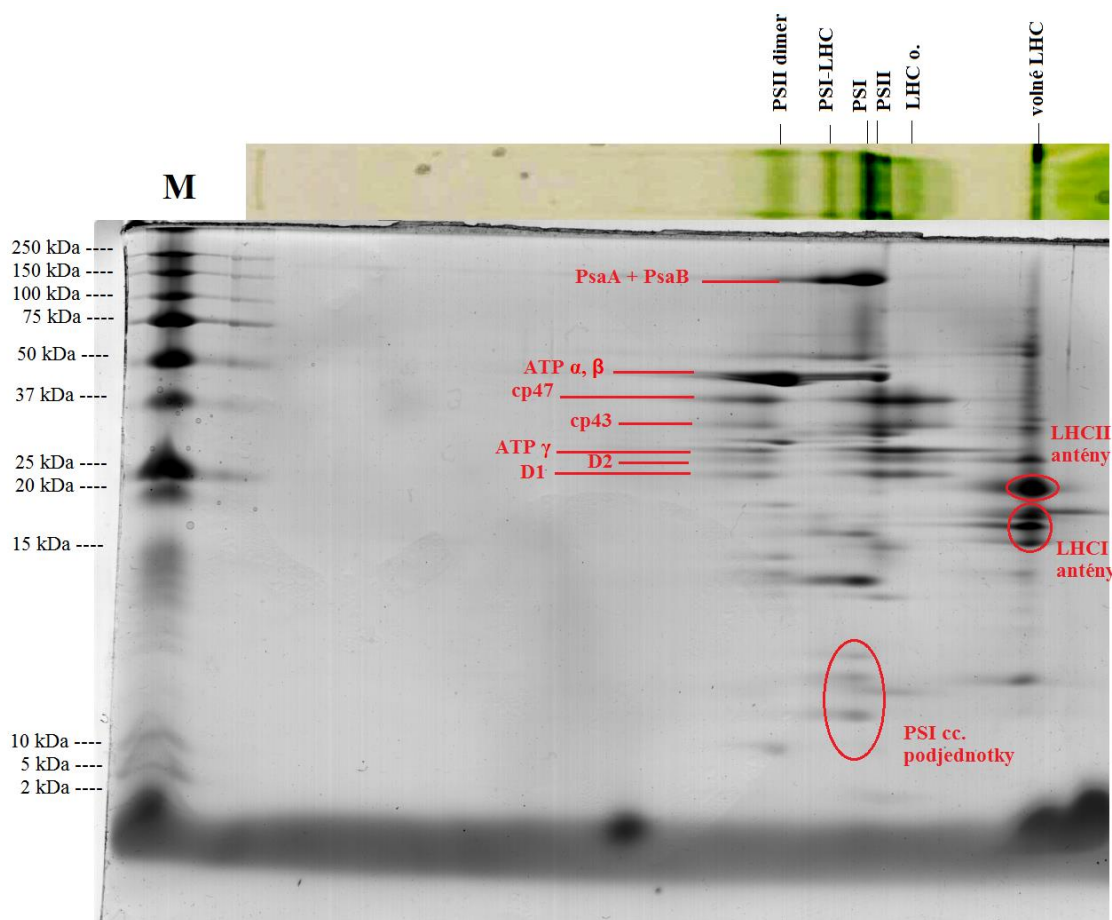
Na elektroferogramu náležícímu WT (Obr. 14) můžeme vidět, že pruhy superkomplexů PSII se rozdělili na odpovídající podjednotky jaderné části PSII a světlosběrné komplexy. Identifikovali jsme jaderné podjednotky cp47, cp43, D2 a D1 a světlosběrné komplexy. Identifikovali jsme jaderné podjednotky cp47, cp43, D2 a D1



Obr. 14 Výsledná separace podjednotek pigment-proteinových komplexů tylakoidních membrán osmidenních listů ječmene setého (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus; WT). Pigment-proteinové komplexy byly rozděleny s pomocí dvojrozměrné gelové polyakrylamidové elektroforézy, prvním rozměrem byla nativní gelová polyakrylamidová elektroforetická separace (CN-PAGE) a druhým rozměrem byla denaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza za použití dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), jako detergent (D) byl použit β -dodecylmaltosid (0,83% koncentrace detergentu ve vzorku). M je hmotnostní marker. PSI o. jsou oligomery fotosystému I, PSI-NDH představuje spojený komplex fotosystému I s NADH dehydrogenasa-like komplexem, PSII sc. jsou superkomplexy fotosystému II, PSI sc. znázorňuje superkomplex fotosystému I, LHC o. představují oligomerní světlosběrné komplexy a volně LHC jsou volné světlosběrné komplexy. PsaA + PsaB jsou proteinové podjednotky jaderné části fotosystému I, ATP α , β a ATP γ jsou podjednotky ATP syntasy. Cp 47 a cp43 představují vnitřní anténní podjednotky jaderné části fotosystému II, D1 a D2 jsou podjednotky jaderného komplexu fotosystému II. LHCI a LHCII prezentují světlosběrné komplexy fotosystému I a II. LHCI a LHCII antény jsou světlosběrné komplexy fotosystému I a II. PSI cc. podjednotky jsou proteinové podjednotky jaderné části fotosystému I.

a rovněž γ -podjednotku ATP syntasy. V superkomplexu PSI se u WT nachází hlavní podjednotky jaderného komplexu PSI PsaA a PsaB, dále se zde nachází α a β podjednotka ATP syntasy. Jednoznačně můžeme říci, že na PSI jsou u WT navázány LHCI antény, pod nimi jsou na elektroferogramu přítomny další podjednotky jaderného komplexu PSI. V sekci volných světlosběrných komplexů můžeme vidět jak antény LHCI, tak LHCI.

Na první pohled je zřejmé, že elektroferogramy podjednotek pigment-proteinových komplexů tylakoidních membrán WT (Obr. 14) a *chlorina* (Obr. 15) jsou rozdílné.



Obr. 15 Výsledná separace podjednotek pigment-proteinových komplexů tylakoidních membrán osmidenních listů mutantní formy ječmene *chlorina f2²* (*clo*). Pigment-proteinové komplexy byly rozděleny s pomocí dvojrozměrné gelové polyakrylamidové elektroforézy, prvním rozměrem byla nativní gelová polyakrylamidová elektroforetická separace (CN-PAGE) a druhým rozměrem byla denaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza za použití dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), jako detergent (D) byl použit β -dodecylmaltosid (0,83% koncentrace detergentu ve vzorku). M je hmotnostní marker. PSII dimer je dimerní podoba fotosystému II, PSI-LHC představuje fotosystém I s navázanými světlosběrnými komplexy. PSI a PSI jsou fotosystémy I a II, LHC o. představují oligomerní světlosběrné komplexy a volné LHC jsou volné světlosběrné komplexy. PsaA + PsaB jsou proteinové podjednotky jaderné části fotosystému I, ATP α , β a ATP γ jsou podjednotky ATP syntasy. Cp 47 a cp43 představují vnitřní anténní podjednotky jaderné části fotosystému II, D1 a D2 jsou podjednotky jaderného komplexu fotosystému II. LHCI a LHCI prezentují světlosběrné komplexy fotosystému I a II. PSI cc. podjednotky jsou proteinové podjednotky jaderné části fotosystému I.

Pigment-proteinové komplexy *chloriny* jsou totiž odlišné, netvoří se zde tak rozměrné struktury.

U *chloriny* v dimeru PSII (Obr. 15) byly nalezeny jeho jaderné podjednotky cp47, cp43, D2 a D1, nevidíme však žádné světlosběrné komplexy, ty u *chloriny* nejsou asociovány s komplexem PSII, jako jsme mohli vidět u WT (Obr. 14). Identifikovali jsme zde však α , β i γ podjednotky ATP syntasy. U PSI komplexu *chloriny* (Obr. 15) vidíme, že jsme zde byli schopni zaznamenat proteinové podjednotky jaderného komplexu (PsaA, PsaB a další PSI cc. podjednotky) PSI, přičemž podíl LHCI antén navázaných v komplexu s PSI je u *clo* nižší než u WT (Obr. 14). Avšak volné LHCI a LHCII antény se nachází jak u WT (Obr. 14), tak i u *clo* (Obr. 15).

Pro jednoznačnější identifikaci a popis podjednotek pigment-proteinových komplexů byly během experimentální části diplomové práce rovněž vyřezány peptidové pásy z gelů a byly připraveny vzorky pro analýzu hmotnostním spektrometrem. Nedošlo však už k jejich zpracování.

5 DISKUSE

Snížené množství chlorofylu *b* nemá vliv pouze na organizaci fotosyntetizujících komplexů, ale rovněž na jejich mobilitu v tylakoidní membráně (Tyutereva *et al.*, 2017). U čajovníku bylo zjištěno, že v důsledku nedostatku chlorofylu *b* se mění nejen složení pigment-proteinových komplexů, ale dochází zde i k abnormálnímu vývoji chloroplastů a odlišné expresi genů a proteinů souvisejících s fotosyntézou, metabolickými drahami biosyntézy glutathionu, fenylpropanoidů, fenylalaninu a flavonoidů. Změny exprese těchto genů tedy u mutantu čajovníku vedly ke zvýšení obsahu aminokyselin a snížení obsahu chlorofylu a flavonoidů (Wang *et al.*, 2016).

V naší práci jsme se zaměřili na vliv nedostatku chlorofylu *b* na efektivitu a strukturu fotosyntetického aparátu. U rostlin ječmene setého a jeho mutantní formy *chlorina f2^{f2}* byl zjišťován obsah pigmentů, na listech byly provedeny analýzy velmi rychlé a pomalé fluorescenční indukce chlorofylu. Dále byl zjišťován redoxní stav PSI a plastocyaninu a elektroforeticky byly analyzovány pigment-proteinové komplexy tylakoidních membrán WT a *chloriny*.

5.1 Obsah pigmentů

U mutantního typu ječmene *chlorina f2^{f2}* byl naměřen snížený obsah chlorofylu *b* i *a* a rovněž byl zaznamenán snížený obsah karotenoidů (Tab. 8). Byla očekávána absence chlorofylu *b* vzhledem k typu mutace v genu pro chlorofylid *a* oxygenasu (Mueller *et al.*, 2012). Snížený obsah chlorofylu *b* byl pak znovu potvrzen při nezávislém opakování testu. Janečková *et al.* (2019) rovněž u tohoto mutantu zaznamenali statisticky významný pokles obsahu chlorofylu *a* a karotenoidů. Avšak chlorofyl *b* v jejich vzorcích nebyl detekován vůbec. Štroch *et al.* (2004) došli k podobným výsledkům jako Janečková *et al.* (2019), Nezval *et al.* (2017) detekovali výrazně snížené množství chlorofylu *b* u *clo*. Navzdory stejnému typu mutace byly naše výsledky rozdílné. U semen použitých při diplomové práci tedy pravděpodobně nebyla biosyntéza chlorofylu *b* kompletně zastavena a nedostatek chlorofylu *b* tak byl pouze částečný, obsah chlorofylu *b* byl u *chloriny* nižší o více než 97 % oproti WT. Snížený obsah chlorofylu *a* i *b* byl zaznamenán i u mutantu *chlorina f¹⁰⁴* (Brestič *et al.*, 2015). Podobný trend byl pozorován i u mutantních typů pšenice (ANK-32A a ANK-32B), které mají nedostatečnou syntézu chlorofylu *b* (Brestič *et al.*, 2016). Rovněž zde byl zaznamenán vliv i na obsah karotenoidů, který byl u mutantních rostlin snížený. Snížení obsahu chlorofylů *a* i *b* bylo rovněž zaznamenáno u dalších mutantních typů rostlin se sníženou biosyntézou

chlorofylu *b*, a to např. u sóji (Du *et al.*, 2018), pšenice (Kunderlikova *et al.*, 2016; Živčák *et al.*, 2019), rýže (Yamazaki, 2010) a sladkých brambor (Weng *et al.*, 2011).

5.2 Světlosběrné komplexy

Kromě sníženého obsahu fotosyntetických pigmentů, dochází u *chloriny* i ke změně funkčnosti fotosyntetického aparátu. Nedostatek chlorofylu *b* má mimo jiné vliv na množství a velikost světlosběrných komplexů a tím na další aspekty fotosyntézy (Krol *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2018). Dochází zpravidla k poklesu efektivity fotochemie PSII a dalšímu využití absorbované světelné energie zhašecími procesy (Štroch *et al.*, 2004; Tyutereva *et al.*, 2017; Janečková *et al.*, 2019).

Křivky velmi rychlé indukce fluorescence chlorofylu měly u *clo* (oproti WT) nižší výšku a pozdější výskyt vln J a I (Obr. 4). Tuto skutečnost zaznamenali u *chloriny* i Janečková *et al.* (2019), zaznamenané výsledky si vysvětlují pomalejší redukcí chinonových akceptorů Q_A a Q_B u *chloriny*. Možným vysvětlením by mohl být pomalejší přísun excitací do reakčních center PSII, a tedy menší relativní zastoupení světlosběrných komplexů dodávajících excitace do reakčních center PSII. A skutečně, v pracích Krol *et al.* (2009) a Tyutereva *et al.* (2017) bylo prezentováno snížené množství i rozměry světlosběrných komplexů v důsledku nedostatku chlorofylu *b*.

V této práci zaznamenané snížení relativní výšky vlny J (V_j) a snížená relativní rychlost fotochemie PSII (dV/dt_0) (Obr. 5) u *clo* odráží menší míru a rychlost akumulace redukovaného chinonového akceptoru Q_A^- , a tak i nižší přísun excitací (Stirbet *et al.*, 2018). Z čehož usuzujeme menší relativní zastoupení světlosběrných komplexů u *chloriny*. Rovněž byla zjištěna nižší hodnota parametru ABS/RC u *clo* (Obr. 6). ABS/RC určuje množství absorbované energie připadající na aktivní reakční centra (Stirbet *et al.*, 2018). Tato skutečnost souhlasí s výsledky předchozích parametrů (V_j a dV/dt_0) a můžeme tedy říct, že *chlorina* měla pomalejší přísun excitací k reakčním centrům v důsledku menších antén. Podobné výsledky byly zaznamenány i v dřívějších výzkumech *chloriny* (Tyutereva *et al.*, 2017; Janečková *et al.*, 2019).

Výsledky elektroforéz pigment-proteinových komplexů a jejich podjednotek u *chloriny* a WT (Obr. 13, Obr. 14, Obr. 15) nás vedou k potvrzení, že u *chloriny* vede nedostatek chlorofylu *b* k odlišnému uspořádání fotosyntetizujících komplexů (Bossmann *et al.*, 1997; Krol *et al.*, 2009; Tyutereva *et al.*, 2017). U *chloriny* jsme zaznamenali menší množství světlosběrných komplexů (Obr. 13). *Chlorina f2^{f2}* má dle literatury snížené množství Lhcb2, Lhcb3 a Lhcb4 a také nedisponuje proteiny Lhca4,

Lhcb1 a Lhcb6 (Bossmann *et al.*, 1997). Snížené množství všech podjednotek LHCI i LHCI^{II} bylo zaznamenáno i u *chloriny f2³⁶¹³* (Tyutereva *et al.*, 2017). U *chloriny f2²⁸⁰⁰* bylo zaznamenáno snížené množství Lhcb2, Lhcb3 a Lhcb4 a nepřítomnost Lhcb1 a Lhcb6 (Krol *et al.*, 1995; Krol *et al.*, 2009). Bylo zjištěno, že u *chloriny f2³⁶¹³* vede nedostatek chlorofylu *b* v konečném důsledku i ke změnám v kontrole otevírání a zavírání stomat. Byla nalezena souvislost mezi sníženým množstvím proteinu Lhcb6 a ztrátou kontroly zavírání stomat (Tyutereva *et al.*, 2018).

Nedostatek či absence podjednotek světlosběrných komplexů má vliv na organizaci fotosyntetizujících komplexů do supramolekulárních struktur (Bossmann *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 2011; Grebe *et al.*, 2019; Wang a Grimm, 2016). Tato skutečnost byla potvrzena i při nativní gelové elektroforéze pigment-proteinových komplexů (Obr. 13).

5.3 Fotosystém II

Chlorina mutanti ječmene mají typicky snížený výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu (Štroch *et al.*, 2004; Brestič *et al.*, 2015; Tyutereva *et al.*, 2017; Janečková *et al.*, 2019), což bylo potvrzeno i v našem případě (Obr. 5). Tento trend byl pozorován i u mutantů pšenice a *Arabidopsis* s nedostatečnou biosyntézou chlorofylu *b* (Kunderlikova *et al.*, 2016; Tyutereva *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Živčák *et al.*, 2019). Rovněž maximální a aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na světlo (F'_v/F'_m a Φ_P) (Obr. 7) jsme u *clo* zaznamenali nižší než u WT. Mírné snížení efektivity fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na světlo bylo zaznamenáno i při některých předešlých výzkumech, a to u *chloriny f104* a *f2²* (Brestič *et al.*, 2015; Janečková *et al.*, 2019).

Přijatá světelná energie, která není využita fotochemickými procesy, bývá disipována procesy regulovatelného světlem indukovaného a neregulovatelného nefotochemického zhášení (Φ_{NPQ} a $\Phi_{f,D}$). Kvantový výtěžek regulovatelného nefotochemického zhášení je zvyšován při nadměrném osvětlení rostlin, tímto způsobem je energie ze systému odváděna. Rostlina je tak chráněna proti akumulaci přebytečné energie a tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů (Lazár, 2015). V průběhu měření parametrů zhášecí analýzy jsme pozorovali odlišnou kinetiku zhášecích procesů u *clo* a WT (Obr. 7, Obr. 8, Obr. 9). Tento rozdíl by mohl být projevem jiné složky nefotochemického zhášení, která se u WT neprojevuje tak výrazně jako u *chloriny*. Mohlo by se jednat o účinněji vyvinutý obranný proces proti fotoinhibici u *chloriny*. Spolu s mírným snížením fotochemie PSII (Φ_P) (Obr. 7) jsme dle očekávání u *clo* zaznamenali mírné zvýšení nefotochemických

procesů (Φ_{NPQ} a $\Phi_{\text{f,D}}$) (Obr. 8). Nárůst neregulovatelných i regulovatelných nefotochemických procesů byl u *clo* potvrzen již dříve (Brestič *et al.*, 2015; Janečková *et al.*, 2019). Zvýšení regulovatelného nefotochemického zhášení bylo zaznamenáno i u mutantů pšenice s nedostatkem chlorofylu *b* (Živčák *et al.*, 2019).

Při relaxační analýze jsme u *chloriny f2^{f2}* zaznamenali menší míru fotoinhibice než u WT. V dřívější studii byla zjištěna nižší míra fotoinhibice i u mutantní rýže s deficitem chlorofylu *b* oproti WT (Dai *et al.*, 2003). Avšak u sladkých brambor a čínského zelí s nedostatkem chlorofylů nebyla fotoinhibice snížena oproti přirozeným genotypům těchto rostlin (Weng *et al.*, 2011). Když byly tyto žluto-zelené kultivary vystaveny osvětlení o vysoké intenzitě ($1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) došlo u nich k výrazné fotoinhibici, po noční periodě se rostliny zotavily. Vzhledem k zaznamenaným výsledkům temnostní relaxace (Obr.10) a nižší míře fotoinhibice u *chloriny* (Obr. 11) bychom mohli usuzovat, že kinetika relaxace je u *chloriny* odlišná. Vzhledem k výraznějšímu poklesu B (míra fotoinaktivovaných center) (Obr. 10) u *chloriny* bychom mohli říct, že *chlorina* relaxuje rychleji než WT. A jelikož jsme u ní nezaznamenali světlosběrné komplexy navázané na fotosystém II (Obr. 14; Obr. 15), tak tato rychlejší relaxace pravděpodobně nesouvisí se stavovými přechody. Teoreticky bychom tedy mohli u *chloriny* očekávat jinou složku zhášení, jež není u WT viditelná a která by měla na svědomí tuto rychlejší relaxaci a odlišnou kinetiku fluorescenčních parametrů *chloriny*. Avšak je to pouze hypotéza, na jejímž potvrzení, či vyvrácení ještě bude třeba pracovat.

Hodnocením elektroferogramů jsme odhalili rozdílnou velikost komplexů PSII u *chloriny f2^{f2}* a ječmene přirozeného genotypu. Supramolekulární uspořádání a organizace fotosyntetizujících komplexů tylakoidních membrán má vliv na důležité procesy fotosyntézy. Jako např. na transfer elektronů i energie a rovněž na opravné procesy po fotoinhibici (Krol *et al.*, 2009; Kirchhoff, 2014). U přirozeného genotypu ječmene jsme zaznamenali přítomnost superkomplexů PSI-LHCI i PSII-LHCII (Obr. 14). U *chloriny* se však organizace superkomplexů PSII-LHCII nepotvrdila (Obr. 15), světlosběrné komplexy nebyly s fotosystémem asociovány stejným způsobem jako u WT. U *clo* se všechny LHCII antény vyskytovaly volně a nebyly asociovány s fotosystémy.

5.4 Fotosystém I

Navzdory menším světlosběrným komplexům *chloriny* se účinnost fotochemie PSI ve stavu adaptovaném na tmu nezmenšila oproti WT (Y(I); Obr. 12). Menší limitace fotochemie PSI na donorové straně (Y(ND)) (Obr. 12) u *clo* odpovídá vyšší účinnosti

přenosu elektronů z PSII k PSI (RE₀/ABS) (Obr. 6). Účinnější elektronový přenos k PSI zjistili u *chloriny* rovněž Janečková *et al.* (2019). Podobný kvantový výtěžek fotochemie PSI, jako u přirozeného genotypu ječmene, byl zaznamenán rovněž u *chloriny f¹⁰⁴* (Brestič *et al.*, 2015).

Elektroforetickými separacemi jsme odhalili rozdílnou velikost komplexu PSI u *chloriny f²* a ječmene přirozeného genotypu (Obr. 13). U mutantů *Arabidopsis* s částečně porušenou biosyntézou chlorofylu *b* (*chl-2* mutant) byla potvrzena přítomnost stabilních LHCI komplexů a PSI-LHCI superkomplexů, které byly podobné jako u WT. Avšak obsah LHCI komplexů zde byl značně snížen (Wang a Grimm, 2016). Kdežto v případě *chlorina f²* mutanta ječmene jsme sice zaznamenali přítomnost LHCI navázaných na PSI, avšak množství světlosběrných komplexů navázaných na PSI bylo velmi malé a tento komplex měl odlišné složení než u WT (Obr. 14, Obr. 15). Komplex PSI-LHCI u *clo* měl i odlišnou elektroforetickou mobilitu než superkomplex PSI-LHCI u WT (Obr. 13).

Snížené množství světlosběrných komplexů v důsledku nedostatku chlorofylu *b* má tedy dalekosáhlé následky na celý rostlinný organismus a jeho fungování.

6 ZÁVĚR

V diplomové práci byl zkoumán vliv nedostatku chlorofylu *b* u mutantního genotypu ječmene *chlorina f2^{f2}* na strukturu a funkčnost fotosyntetického aparátu. Výsledky byly porovnávány s ječmenem setým (*Hordeum vulgare* L., cv. Bonus) s přirozeným genotypem.

Na základě analýzy pigmentů jsme potvrdili, že *chlorina* má snížený obsah chlorofylů a karotenoidů oproti ječmeni přirozeného genotypu. U *chloriny* byla očekávána absence chlorofylu *b*, v našem případě, při uvedených podmínkách pěstování, jsme navzdory očekáváním byli schopni zaznamenat nikoli absenci, ale výrazně snížené množství chlorofylu *b* u *chloriny* (méně než 3% obsah v porovnání s WT).

Analýzou parametrů velmi rychlé fluorescenční indukce chlorofylu byla u *chloriny* zjištěna snížená účinnost fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu. Data získaná měřením parametrů pulzní amplitudové modulační techniky ukázala, že ve stavu adaptovaném na tmu má *chlorina* vyšší účinnost fotochemie PSI než ječmen přirozeného genotypu. V průběhu adaptace na světlo převládla limitace na donorové straně PSI, která byla způsobena nižším kvantovým výtěžkem fotochemie PSII, a účinnost fotochemie PSI u *chloriny* oproti WT signifikantně klesla. Výsledky měření dále prokázaly, že limitace v účinnosti elektronového transportu nebyla na akceptorové straně PSI.

U parametrů zhášecí a relaxační analýzy byla u *chloriny f2^{f2}* odhalena jejich odlišná kinetika, přičemž aplikace aktinického osvětlení různých intenzit (50, 100 a 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) měla na průběh hodnot parametrů rozdílný vliv. Zajímavou skutečností je jiná kinetika nefotochemického zhášení u *chloriny*, neobvyklý průběh hodnot parametrů relaxační analýzy a nižší podíl fotoinhibice u *chloriny* (v případě předcházející aplikace aktinického světla o intenzitě 50 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Zjištěné skutečnosti by mohly znamenat přítomnost jiného typu zhášení u *chloriny*, který není u ječmene přirozeného genotypu pozorovatelný. Tuto hypotézu máme v plánu prozkoumat při dalších experimentech.

Výsledky elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů a jejich podjednotek odhalily odlišné složení těchto komplexů u *chloriny* a ječmene přirozeného genotypu. Bylo zaznamenáno, že u *chloriny* světlosběrné komplexy LHCI neasociují s fotosystémy. Není zde tudíž přítomen superkomplex PSII-LHCI. Při elektroforetických analýzách bylo rovněž potvrzeno, že *chlorina* má menší množství světlosběrných komplexů než ječmen přirozeného genotypu. Tento fakt podporují i výsledky analýzy

parametrů velmi rychlé fluorescenční indukce, kdy u *chloriny f2^{f2}* byla potvrzena přítomnost světlosběrných komplexů menších rozměrů, než je tomu u WT.

Během experimentální části diplomové práce byly rovněž peptidové pásy z gelů vyřezány a byly připraveny vzorky pro analýzu hmotnostním spektrometrem. Nedošlo však už k jejich zpracování, je v plánu se tomuto tématu dále věnovat a v experimentech pokračovat.

Chlorina f2^{f2} je účinným nástrojem výzkumu fotosyntetického aparátu a můžeme říci, že odhaluje důležitost chlorofylu *b* pro efektivní rostlinný růst a vývoj. Zjištěné rozdíly v kinetice parametrů zhášecí a relaxační analýzy jsou pohnutkou k dalšímu výzkumu mutantních rostlin s nedostatkem chlorofylu *b*.

7 LITERATURA

- Albanese P., Nield J., Tabares J.A.M., Chiodoni A., Manfredi M., Gosetti F., Marengo E., Saracco G., Barber J., Pagliano C. (2016): Isolation of novel PSII-LHCII megacomplexes from pea plants characterized by a combination of proteomics and electron microscopy. *Photosynthesis Research* **130**, 19–31.
- Bossmann B., Knoetzel J., Jansson S. (1997): Screening of chlorina mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) with antibodies against light-harvesting proteins of PS I and PS II: Absence of specific antenna proteins. *Photosynthesis Research* **52**, 127–136.
- Brestič M., Živčák M., Ďatko M., Olšovská K., Sytar O., Shao H. (2015): Novel resistance mechanism of barley *chlorina fl04* antenna mutant against photoinhibition: possible role of new identified chloroplastic cpNrp protein. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* **27**, 75–85.
- Brestič M., Živčák M., Kunderliková K., Allakhverdiev S.I. (2016): High temperature specifically affects the photoprotective responses of chlorophyll b-deficient wheat mutant lines. *Photosynthesis Research* **130**, 251–266.
- Caffarri S., Kouřil R., Kerešiče S., Boekema E.J., Croce R. (2009): Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO Journal* **28**, 3052–3063.
- Dai X., Xu X., Lu W., Kuang T. (2003): Photoinhibition characteristics of a low chlorophyll b mutant of high yield rice. *Photosynthetica* **41**, 57–60.
- Du H., Qi M., Cui X., Cui Y., Yang H., Zhang J., Ma Y., Zhang S., Zhang X., Yu D. (2018): Proteomic and functional analysis of soybean chlorophyll-deficient mutant *cd1* and the underlying gene encoding the CHLI subunit of Mg-chelatase. *Molecular Breeding* **38**:71. <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0819-9>.
- Govindjee (1995): Sixty-Three Years Since Kautsky: Chlorophyll *a* Fluorescence. *Functional Plant Biology* **22**, 131–160.
- Grebe S., Trotta A., Bajwa A.A., Suorsa M., Gollan P.J., Jansson S., Tikkanen M., Aro E.M. (2019): The unique photosynthetic apparatus of pinaceae: Analysis of photosynthetic complexes in *Picea abies*. *Journal of Experimental Botany* **70**, 3211–3225.
- He J., Yang W., Qin L., Fan D.J., Chow W.S. (2015): Photoinactivation of Photosystem II in wild-type and chlorophyll *b*-less barley leaves: which mechanism dominates depends on experimental circumstances. *Photosynthesis Research* **126**, 399–407.
- Ikeuchi M., Sato F., Endo T. (2016): Allocation of absorbed light energy in photosystem II in NPQ mutants of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **57**, 1484–1494.
- Jablonski A. (1933): Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes. *Nature* **131**, 839–840.
- Janečková H., Husičková A., Lazár D., Ferretti U., Pospíšil P., Špundová M. (2019): Exogenous application of cytokinin during dark senescence eliminates the acceleration of photosystem II impairment caused by chlorophyll *b* deficiency in barley. *Plant Physiology and Biochemistry* **136**, 43–51.
- Järvi S., Suorsa M., Paakkarinen V., Aro E.M. (2011): Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: Novel super- and mega-complexes. *Biochemical Journal* **439**, 207–214.
- Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Brestič M., Bussotti F., Calatayud A., Dąbrowski P., Elsheery N.I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S.W., Jajoo A., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Poli D., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Serôdio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yanniccari M., Živčák M. (2014): Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: Practical issues. *Photosynthesis Research* **122**, 121–158.
- Kirchhoff H. (2014): Diffusion of molecules and macromolecules in thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1837**, 495–502.
- Kouřil R., Strouhal O., Nosek L., Lenobel R., Chamrád I., Boekema E.J., Šebela M., Ilík P. (2014): Structural characterization of a plant photosystem I and NAD(P)H dehydrogenase supercomplex. *Plant Journal* **77**, 568–576.
- Krause G.H., Weis E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **42**, 313–349.

- Krol M., Ivanov A.G., Booij-James I., Mattoo A.K., Sane P. V., Hüner N.P.A. (2009): Absence of the major light-harvesting antenna proteins alters the redox properties of photosystem II reaction centres in the *chlorina F2* mutant of barley. *Biochemistry and Cell Biology* **87**, 557–566.
- Krol M., Spangfort M.D., Hüner N.P.A., Oquist G. (1995): Chlorophyll *a/b*-Binding Proteins, Pigment Conversions, and Early Light-Induced Proteins in a Chlorophyll *b*-less Barley Mutant. *Plant Physiology*, 873–883.
- Kunderliková K., Brestič M., Živčák M., Kusniarová P. (2016): Photosynthetic responses of sun- and shade-grown chlorophyll *b* deficient mutant of wheat. *Journal of Central European Agriculture* **17**, 950–956.
- Lambrev P.H., Akhtar P. (2019): Macroorganisation and flexibility of thylakoid membranes. *Biochemical Journal* **476**, 2981–3018.
- Lazár D. (2015): Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology* **175**, 131–147.
- Lazár D. (2013): Simulations show that a small part of variable chlorophyll *a* fluorescence originates in photosystem I and contributes to overall fluorescence rise. *Journal of Theoretical Biology* **335**, 249–264.
- Lichtenthaler H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigment of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350–382.
- Lin Z.F., Lin G.Z., Peng C.L. (2009): Enhancement of susceptibility to photoinhibition and photooxidation in rice chlorophyll *b*-less mutants. *Photosynthetica* **47**, 46–54.
- Liu Z., Yan H., Wang K., Kuang T., Zhang J., Gui L., An X., Chang W. (2004): Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**, 287–292.
- McKenzie S.D., Ibrahim I.M., Aryal U.K., Puthiyaveetil S. (2020): Stoichiometry of protein complexes in plant photosynthetic membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1861**:148141.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148141>.
- Mueller A.H., Dockter C., Gough S.P., Lundqvist U., Von Wettstein D., Hansson M. (2012): Characterization of mutations in barley *fch2* encoding chlorophyllide *a* oxygenase. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1232–1246.
- Nath K., Phee B.K., Jeong S., Lee S.Y., Tateno Y., Allakhverdiev S.I., Lee C.H., Nam H.G. (2013): Age-dependent changes in the functions and compositions of photosynthetic complexes in the thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research* **117**, 547–556.
- Neilson J.A.D., Durnford D.G. (2010): Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes. *Photosynthesis Research* **106**, 57–71.
- Nezval J., Štroch M., Materová Z., Špunda V., Kalina J. (2017): Phenolic compounds and carotenoids during acclimation of spring barley and its mutant *Chlorina f2* from high to low irradiance. *Biologia Plantarum* **61**, 73–84.
- Nickelsen J., Rengstl B. (2013): Photosystem II Assembly: From Cyanobacteria to Plants. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 609–635.
- Pan X., Li M., Wan T., Wang L., Jia C., Hou Z., Zhao X., Zhang J., Chang W. (2011): Structural insights into energy regulation of light-harvesting complex CP29 from spinach. *Nature* **18**, 309–315.
- Ramel F., Ksas B., Akkari E., Mialoundama A.S., Monnet F., Krieger-Liszka A., Ravanat J.L., Mueller M.J., Bouvier F., Havaux M. (2013): Light-induced acclimation of the *Arabidopsis chlorina1* mutant to singlet oxygen. *Plant Cell* **25**, 1445–1462.
- Rochaix J., Lemeille S., Shapiguzov A., Samol I., Fucile G., Willig A., Goldschmidt-clermont M., Rochaix J., Lemeille S., Shapiguzov A., Samol I., Fucile G., Willig A., Goldschmidt-clermont M. (2012): Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment. *Philosophical transactions of the royal society b-biological sciences* **367**, 3466–3474.
- Roháček K. (2010): Method for resolution and quantification of components of the non-photochemical quenching (qN). *Photosynthesis Research* **105**, 101–113.
- Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J. (2005): Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1706**, 250–261.

- Stirbet A., Lazár D., Kromdijk J., Govindjee (2018): Chlorophyll *a* fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? *Photosynthetica* **56**, 86–104.
- Štroch M., Čajánek M., Kalina J., Špunda V. (2004): Regulation of the excitation energy utilization in the photosynthetic apparatus of *chlorina f2* barley mutant grown under different irradiances. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **75**, 41–50.
- Štroch M., Lenk S., Navrátil M., Špunda V., Buschmann C. (2008): Epidermal UV-shielding and photosystem II adjustment in wild type and *chlorina f2* mutant of barley during exposure to increased PAR and UV radiation. *Environmental and Experimental Botany* **64**, 271–278.
- Su X., Wei X., Zhu D., Chang W., Liu Z., Zhang X., Li M. (2017): Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex. *Science* **820**, 815–820.
- Tyutereva E. V., Dmitrieva V.A., Shavarda A.L., Voitsekhovskaja O. V. (2018): Stomata control is changed in a chlorophyll *b*-free barley mutant. *Functional Plant Biology* **45**, 453–463.
- Tyutereva E. V., Evkaikina A.I., Ivanova A.N., Voitsekhovskaja O. V. (2017): The absence of chlorophyll *b* affects lateral mobility of photosynthetic complexes and lipids in grana membranes of *Arabidopsis* and barley *chlorina* mutants. *Photosynthesis Research* **133**, 357–370.
- Vetoshkina D. V., Kozuleva M.A., Terentyev V. V., Zhurikova E.M., Borisova-Mubarakshina M.M., Ivanov B.N. (2019): Comparison of State Transitions of the Photosynthetic Antennae in *Arabidopsis* and Barley Plants upon Illumination with Light of Various Intensity. *Biochemistry (Moscow)* **84**, 1065–1073.
- Wang L., Cao H., Chen C., Yue C., Hao X., Yang Y., Wang X. (2016): Complementary transcriptomic and proteomic analyses of a chlorophyll-deficient tea plant cultivar reveal multiple metabolic pathway changes. *Journal of Proteomics* **130**, 160–169.
- Wang P., Grimm B. (2016): Comparative analysis of light-harvesting antennae and state transition in *chlorina* and *cpSRP* mutants. *Plant Physiology* **172**, 1519–1531.
- Wang Y., Zheng Wei, Zheng Weijun, Zhu J., Liu Z., Qin J., Li H. (2018): Physiological and transcriptomic analyses of a yellow-green mutant with high photosynthetic efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Functional and Integrative Genomics* **18**, 175–194.
- Wei X., Su X., Cao P., Liu X., Chang W., Li M., Zhang X., Liu Z. (2016): Structure of spinach photosystem II – LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. *Nature* **534**, 69–74.
- Weng J.H., Chien L.F., Jiang C.Y., Shih F.C., Chen H.Y. (2011): A comparison between yellow-green and green cultivars of four vegetable species in pigments, ascorbate, photosynthesis, energy dissipation, and photoinhibition. *Photosynthetica* **49**, 361–370.
- Yadav K.N.S., Semchonok D.A., Nosek L., Kouřil R., Fucile G., Boekema E.J., Eichacker L.A. (2017): Supercomplexes of plant photosystem I with cytochrome b6f, light-harvesting complex II and NDH. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1858**, 12–20.
- Yamazaki J. (2010): Changes in the photosynthetic characteristics and photosystem stoichiometries in wild-type and Chl *b*-deficient mutant rice seedlings under various irradiances. *Photosynthetica* **48**, 521–529.
- Yang H., Liu J., Wen X., Lu C. (2015): Molecular mechanism of photosystem I assembly in oxygenic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1847**, 838–848.
- Živčák M., Brestič M., Botyanszka L., Chen Y.E., Allakhverdiev S.I. (2019): Phenotyping of isogenic chlorophyll-less bread and durum wheat mutant lines in relation to photoprotection and photosynthetic capacity. *Photosynthesis Research* **139**, 239–251.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2D SDS-PAGE	dvojměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza za použití dodecylsulfátu sodného
AA/BIS	roztok akrylamidu a bisakrylamidu
ABS/RC	množství absorbované energie aktivními reakčními centry
APS	peroxodisíran amonný
ATP α , β	α a β podjednotky ATP syntasy
ATP γ	γ podjednotka ATP syntasy
B	kvantový výtěžek energie disipované fotoinaktivovanými centry
BSA	hovězí sérový albumin
car	karotenoidy
<i>clo</i>	<i>chlorina</i>
CN-PAGE	nativní gelová polyakrylamidová elektroforéza
cv.	kultivar
cyt <i>b₅₅₉</i>	cytochrom <i>b₅₅₉</i>
cyt <i>b_{6f}</i>	cytochrom <i>b_{6f}</i>
chl	chlorofyl
D	detergent
DTT	dithiotreitol
dV/dt_0	relativní rychlost fotochemie fotosystému II
F_0	minimální hodnota fluorescence chlorofylu <i>a</i> ve stavu adaptovaném na tmu
F'_0	minimální fluorescence chlorofylu při adaptaci na světlo
Fd	ferredoxin
F_m	maximální hodnota fluorescence chlorofylu <i>a</i> ve stavu adaptovaném na tmu
F'_m	maximální fluorescence chlorofylu při adaptaci na světlo
F^c_m	maximální fluorescence chlorofylu při temnostní relaxaci
$F_m^{x''}$	maximální fluorescence chlorofylu při temnostní relaxaci v čase, kdy je qE kompletně relaxováno
$F_m^{y'}$	maximální fluorescence chlorofylu při temnostní relaxaci v čase, kdy je qE i qT kompletně relaxováno
FNR	ferredoxin-NADP ⁺ reduktasa

FQR	ferredoxin-plastochinon reduktasa
F(t)	aktuální fluorescence chlorofylu v čase t
F''_v	variabilní fluorescence chlorofylu při temnostní relaxaci
F_v/F_m	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ve stavu adaptovaném na tmu
Φ_D	kvantový výtěžek bazální neregulovatelné tepelné disipace
Φ_f	kvantový výtěžek fluorescence
$\Phi_{f,D}$	kvantový výtěžek konstitutivní neregulovatelné disipace
Φ_{NPQ}	kvantový výtěžek regulovatelného světlem indukovaného nefotochemického zhášení
Φ_P	aktuální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II při adaptaci na světlo
$\Phi_{PSII} = F'_v/F'_m$	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II při adaptaci na světlo
Φ_{qE}	kvantový výtěžek nefotochemického zhášení závislého na gradientu pH přes tylakoidní membránu
Φ_{qI}	kvantový výtěžek fotoinhibičního nefotochemického zhášení fluorescence
Φ_{qT}	kvantový výtěžek nefotochemického zhášení fluorescence souvisejícího se stavovými přechody
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
Lhca*	příslušné proteinové podjednotky světlosběrného komplexu I vázající chlorofyl <i>a</i> a <i>b</i>
Lhcb*	příslušné proteinové podjednotky světlosběrného komplexu II vázající chlorofyl <i>a</i> a <i>b</i>
LHCI	světlosběrný komplex I
LHCII	světlosběrný komplex II
LHC o.	oligomery světlosběrných komplexů
lpBN-PAGE	modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza na gelech s velkými póry
NDH	NADH dehydrogenasa-like komplex
PQ	plastochinon
Psa*	příslušné proteinové podjednotky fotosystému I
Psb*	příslušné proteinové podjednotky fotosystému II

PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
PSII-LHCII	komplex fotosystému II a světlosběrného komplexu II
PSII sc.	superkomplex fotosystému II
PSI cc.	jaderné podjednotky fotosystému I
PSI-LHCI	komplex fotosystému I a světlosběrných komplexů I
PSI-NDH	komplex fotosystému I a NADH dehydrogenasa-like komplexu
PSI o.	oligomerní PSI
PSI sc.	superkomplex fotosystému I
Q _A	primární chinonový elektronový akceptor
Q _B	sekundární chinonový elektronový akceptor
SDS	dodecylsulfát sodný
qE	energeticky závislé nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu
qI	fotoinhibiční nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu
qP	fotochemické zhášení odrážející zastoupení otevřených reakčních center
qT	nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu závislé na stavových přechodech
RE ₀ /ABS	kvantový výtěžek elektronového transportu z Q _A ⁻ k finálnímu akceptoru fotosystému I
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
V _I	relativní výška vlny I
V _J	relativní výška vlny J
WT	wild type, přirozený genotyp
Y(I)	kvantový výtěžek fotochemie fotosystému I
Y(NA)	Kvantový výtěžek nefotochemické disipace fotosystému I kvůli limitaci na akceptorové straně
Y(ND)	kvantový výtěžek nefotochemické disipace fotosystému I kvůli limitaci na donorové straně