

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

BAKALÁRSKA PRÁCA

**Kinetika nefotochemického zhasání excitací u mutantů *Arabidopsis thaliana* so
zniženým množstvím svetlozberných antén**



Vypracovala: Nina Kadášová

Študijný obor: Biofyzika

Vedúci práce: Mgr. Tereza Vánská

Olomouc 2021

Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko autora: Nina Kadášová

Názov práce: Kinetika nefotochemického zhášania excitácií u mutantov *Arabidopsis thaliana* so zníženým množstvom svetlozberných antén

Typ práce: Experimentálna

Pracovisko: Katedra Biofyziky Přírodovědecké fakulty univerzity Palackého v Olomouci

Vedúci práce: Mgr. Tereza Vánská

Rok obhajoby práce: 2021

Abstrakt:

Nefotochemické zhášanie (NPQ) je jedným z typov ochrany rastliny pred fotopoškodením. To nastáva vtedy, keď rastlina nie je schopná previesť všetku prijatú svetelnú energiu do procesov fotosyntézy. Okrem NPQ rastlina bojuje proti nadmernej fotooxidácii aj fluorescenčnými procesmi, neregulovanými stratami tepla alebo tvorbou kyslíkových radikálov (ROS), avšak táto možnosť nie je žiadúca, keďže poškodzuje bunecné štruktúry. Bol zisťovaný vplyv intenzity osvetlenia na priebeh nefotochemického zhášania, a to u rastlín s knock-out mutáciami v génoch pre Lhcb3 a Lhcb6 proteíny svetlozberných antén. Následky týchto mutácií sa preukázali v znížení elektrónového transportu, rovnako aj obsahu asimilačných pigmentov. Výsledky teda naznačujú isté poškodenia vo fotosystéme II a/alebo svetlozberných anténach. Práca popisuje adaptabilitu rastlín s takýmto typom poškodenia na rôzne typy osvetlenia. Ukazuje sa však, že rastliny s daným typom mutácii vykazujú neočakávanú vitalitu, ktorá predtým nebola popísaná.

Kľúčové slová: Lhcb3, Lhcb6, nefotochemické zhášanie, nízka intenzita osvetlenia, normálna intenzita osvetlenia, PSII-LHCII, superkomplex C₂S₂M₂, svetlozberné antény, vysoká intenzita osvetlenia

Počet strán: 59 strán

Počet príloh: 4

Jazyk: Slovenčina

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Nina Kadášová

Title of thesis: Kinetics of non-photochemical quenching of excitations in *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced amount of light-harvesting complexes

Department: Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: Mgr. Tereza Vánská

The year of defence: 2021

Abstract:

Non-photochemical quenching (NPQ) is a type of plant protection against photo-damage, which occurs when the plant is unable to transfer all the absorbed light energy into its photosynthetic processes. In addition to NPQ, the plant also fights excessive photooxidation by fluorescence processes, uncontrollable heat loss or the formation of oxygen radicals (ROS). This reaction is not desirable, since it damages cellular structures of the plant. We investigated the effect of light intensity on the process of non-photochemical quenching in plants with knock-out mutations in the genes for Lhcb3 and Lhcb6 proteins of light-harvesting antennae. The consequences of these mutations have been shown to reduce the transport of electrons as well as the content of assimilation pigments. Therefore, the results suggest that a certain kind of damage in photosystem II and/or light-harvesting antennae occurred. The thesis describes the adaptability of plants with this type of damage to different types of lighting. However, plants with a given type of mutation appear to show unexpected vitality that has not been previously described.

Keywords: high light intensity, Lhcb3, Lhcb6, light-harvesting antennae, low light intensity, non-photochemical quenching, normal light intensity, PSII-LHCII, supercomplex C₂S₂M₂

Number of pages: 59 pages

Number of attachments: 4

Language: Slovak language

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, pod vedením Mgr. Terezy Vánskej a za použitia literatúry uvedenej v závere práce. Týmto chcem slečne Mgr. Vánskej veľmi poďakovať za jej odborné vedenie, rýchle odpovedanie na otázky a najmä za jej čas, ktorý venovala opravám práce, laboratórnemu dozoru a pomoci pri tvorbe určitých častí práce. Rovnako ďakujem pánovi prof. RNDr. Petrovi Ilíkovi, Ph.D. za odbornú konzultáciu k výsledkom práce a pánovi doc. RNDr. Pavlovi Pospíšilovi, Ph.D. za prevedenie HPLC analýzy pigmentov vo vzorkách, ktoré boli diskutované v práci. Za konzultáciu týmto ďakujem aj RNDr. Romanovi Kouřilovi, Ph.D. a Mgr. Ive Ilíkovej, Ph.D.

V Olomouci dňa

.....

Obsah

1. Úvod	1
2. Prehľad problematiky	2
2.1. Princíp fotosyntézy	2
2.1.1. Oxygénna fotosyntéza	2
2.1.2. Asimilačné pigmenty	3
2.1.2.1. Chlorofyly	4
2.1.2.2. Karotenoidy	4
2.1.3. Tylakoidná membrána	5
2.1.3.1. Fotosystém II	6
2.2. Zachytenie svetelnej energie	7
2.2.1. Svetelné žiarenie	7
2.2.2. Proces zachytávania svetla svetlozbernými anténami	7
2.2.2.1. Štruktúra a flexibilita LHCI	7
2.2.3. Svetlom podmienené zmeny v makroorganizácii tylakoidnej membrány	8
2.2.3.1. Aklimácia rastlín na zvýšenú a zníženú intenzitu osvetlenia	9
2.3. Nefotochemické zhasenie fluorescencie	13
2.3.1. Fluorescencia chlorofylu	13
2.3.2. Zložky nefotochemického zhasenia	14
2.3.3. Zmeny v rôznych faktoroch ovplyvňujúcich NPQ pri rastlinách s prirodzeným a mutantným genotypom	16
2.4. <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.4.1. Modelová arábkovka thalová (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	17
2.4.2. Anténne proteíny	17
2.4.2.1. <i>koLhcb3</i> mutant	19
2.4.2.2. <i>koLhcb6</i> mutant	19
2.4.2.3. <i>koLhcb3koLhcb6</i> mutant	20
3. Cieľ práce	21
4. Materiál a metódy	22
4.1. Materiál	22
4.1.1. Chemikálie	22
4.1.2. Prístrojové vybavenie	22
4.1.3. Rastlinný materiál a podmienky pestovania	23

4.1.4	Metódy	23
4.1.4.1.	Spektrofotometrické stanovenie obsahu pigmentov	23
4.1.4.2.	HPLC.....	24
4.1.4.3.	Veľmi rýchla fluorescenčná indukcia	25
4.1.4.4.	Princíp pulznej amplitúdovej modulačnej techniky	26
4.1.4.5.	Izolácia tylakoidných membrán	28
4.1.4.6.	Elektroforéza	29
4.1.5	Softwary pre spracovávanie výsledkov	30
4.1.6	Štatistická analýza dát.....	30
8.	Výsledky	31
8.1	Analýza pigmentov	32
8.2	Veľmi rýchla fluorescenčná indukcia chlorofylu <i>a</i>	35
8.3	Výsledky pulznej amplitúdovej modulácie.....	38
8.4	Výsledky natívnej elektroforézy	46
9.	Diskusia.....	48
10.	Záver.....	54
11.	Zoznam literatúry	55

Zoznam skratiek

- DNA – deoxyribonukleová kyselina
ATP – adenozíntрифосфát
PSI – fotosystém I
PSII – fotosystém II
LHCII – svetlozberný komplex II
PAR – fotosynteticky aktívne žiarenie
LHC, LHA – light harvesting complexes, svetlozberné antény
TM – tylakoidná membrána
LL – low light, nízka intenzita osvetlenia
HL – high light, vysoká intenzita osvetlenia
NL – normal light, normálna kontrolovaná intenzita osvetlenia
Chl – chlorofyl
NPQ – nefotochemické zhášanie fluorescence chlorofylu
 F_0 – minimálna hodnota fluorescence v stave adaptovanom na tmu
 F_m - maximálna hodnota fluorescence v stave adaptovanom na tmu
 F_s - hladina fluorescence v ustálenom stave.
 F_m' - maximálna fluorescencia počas osvetlenia aktinickým svetlom
A. thaliana – *Arabidopsis thaliana*
HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
BSA – hovädzí sérový albumín
EDTA – sodná soľ kyseliny ethylendiamintetraoctovej
Neo – neoxantín
Lut - luteín
Vio – violaxantín
Zea – zeaxantín
Car – karotenoidy
ETR – elektrónový transportný reťazec
 F_v/F_m - maximálny kvantový výťažok fotochémie PSII v stave adaptovanom na tmy

1. Úvod

Najviac známe využitie svetelnej energie v rastlinách je fotosyntéza. Čo sa však stáva v rastline, pokiaľ je vystavená prílišnému osvetleniu a nestíha danú energiu spracovať formou fotosyntetických procesov? Počas dlhej evolúcie si rastliny vyvinuli rôzne typy ochrany proti nadmernému fotosynteticky aktívnemu žiareniu. Medzi ne patrí aj nefotochemické zhášanie (NPQ), nazývané aj svetlom podmienená, regulovaná strata tepla.

NPQ sa odohráva vo svetlozberných anténach, ktoré sú súčasťou fotosystému PSII. Na základe kinetiky relaxácie fluorescencie chlorofylu v tme sú určené najmenej 3 časti NPQ. Sú nimi energeticky závislá zložka qE, ktorá je spustená protónovým gradientom cez tylakoidnú membránu a relaxuje behom niekoľkých sekúnd; druhá zložka, qT, ktorá závisí od stavových prechodov a uvoľní sa do niekoľkých minút; a tretia zložka, qI, ktorá je spôsobená fotoinhibíciou a relaxuje veľmi pomaly.

Rastlina na zber fotónov z prostredia využíva svetlozberné antény (light-harvesting complexes, LHC). Tie sa nachádzajú v membránach tylakoidov v chloroplastoch. Štrukturálnym znakom tylakoidných membrán rastlín je ich stohovanie za vzniku takzvaných grán, ktoré sú navzájom prepojené spojitou sieťou stromálnych lamiel. V tylakoidnej membráne nachádzame napríklad fotosystém I (PSI), fotosystém II (PSII), svetlozberné komplexy II (LHCII) a komplexy cytochrómu b₆f.

V prítomnosti kationov vedú molekulárne interakcie medzi PSII a LHCII k tvorbe superkomplexov zložených z dimérnych komplexov jadra PSII a periférne pripojených LHC. V tylakoidnej membráne (TM) *Arabidopsis thaliana* sa PSII najčastejšie objavuje v podobe superkomplexu C₂S₂M₂. LHCII je periférna anténa a obsahuje rôzne heterotriméry Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3 proteínov, zatiaľ čo komplexy menších antén (Chlorophyll Protein 29 [CP29], CP26 a CP24) sa nachádzajú ako monoméry.

V práci sa zameriame na dva aspekty ovplyvnenia NPQ, a to na odstránenie Lhcb3 a/alebo Lhcb6 a aklimáciu rastlín na rôzne intenzity osvetlenia. Budeme sledovať aj celkové ovplyvnenie rastlín a to v pomere ich asimilačných pigmentov alebo v hodnotách ich maximálneho výťažku fotochémiie. Práca je voľným pokračovaním bakalárskej práce D. Dostálovej z roku 2020 pod vedením Mgr. Ivy Ilíkovej, Ph.D., a rovnako súvisia so zisteniami pripravovanej štúdie katedry Biofyziky Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

2. Prehľad problematiky

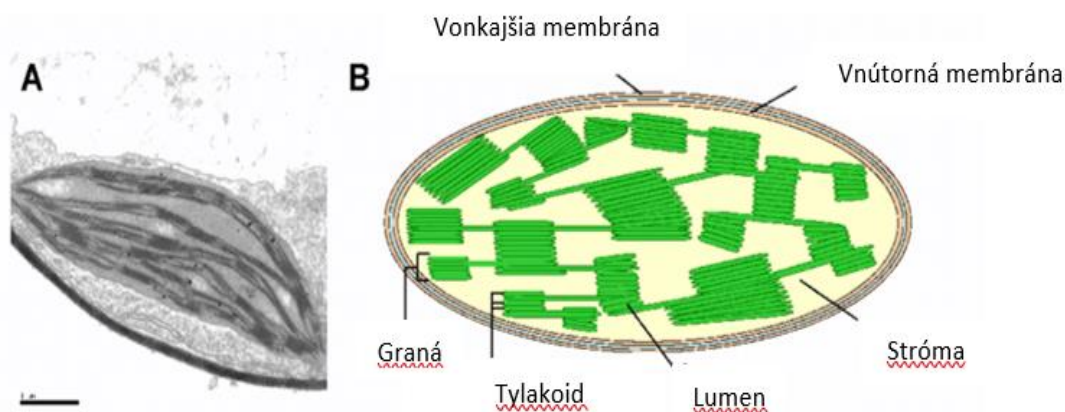
2.1. Princíp fotosyntézy

Fotosyntéza je unikátny proces, ktorý sa uplatňuje nie len u rastlín, ale aj v mikroorganizmoch, ktoré tvoria veľkú časť fotosyntetického sveta. Využíva slnečné žiarenie ku syntéze organických zlúčenín, a to sacharidov z anorganických látok, presnejšie z oxidu uhličitého a vody. Fotosyntéza využíva princíp fototrofie. Fototrofia je spôsob premieňania svetelnej energie na chemickú. Na tento proces sa využívajú asimilačné pigmenty (Hamilton 2019). Fotosyntézu možno na základe princípov, akým sa bude energia zachytávať a premieňať, rozdeliť na fotosyntézu za použitia rodopsínu a fotosyntézu za použitia tetrapyrolových farbív. Pre účely tejto práce bude venovaná pozornosť práve druhému typu. Ten možno rozdeliť ešte na anoxygénnu fotosyntézu a oxygénnu fotosyntézu (Hamilton 2019). Opäť, táto práca bude venovať pozornosť oxygénnemu typu fotosyntézy.

2.1.1. Oxygénna fotosyntéza

Oxygénnu fotosyntézu využívajú sinice, riasy a rastliny. Všetky tieto organizmy využívajú na priebeh oxygéennej fotosyntézy špeciálne organely nazývané chloroplasty, vzniknuté endosymbiózou (Obr. 1). Výnimkou sú prokaryotické organizmy, ktoré využívajú komplexy uložené na intracytoplazmatickej membráne (Kindgren 2010).

Chloroplast patrí do skupiny heterogénnych organel nazývanej plastidy. Od cytoplazmy je oddelený dvojitou membránou a je to semiautonómna organela. Hmota v jeho vnútri sa nazýva stróma. V stróme sa nachádzajú enzýmy Calvinovho cyklu, DNA plastidu a proteosyntetický aparát. Stróma obsahuje diferencovaný systém membrán



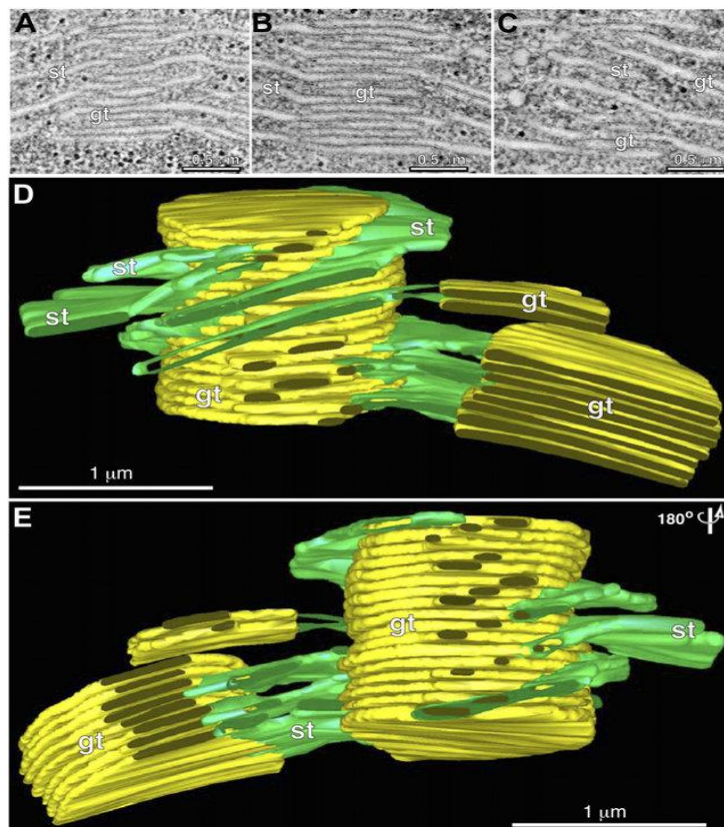
Obr. 1 : Vnútorňá štruktúra chloroplastu z modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana* (Arábkovky thalovej). (A) Obrázok chloroplastu vytvorený pomocou elektrónovej mikroskopie. Pruh predstavuje 1 μm . (B) Štruktúry vo vnútri chloroplastu (prevzaté od Kindgren (2010)).

nazývaný ako vnútorný systém tylakoidov. Tento systém sa delí ešte na tylakoidy grán a tylakoidy strómy (Lindquist a Aronsson 2018).

Tylakoidy grán sú vrstvené na sebe, strómové tylakoidy zas spájajú jednotlivé grána, teda tak susedia so strómou po oboch stranách (Obr. 2). Vnútorný priestor týchto útvarov sa volá lumen. V membránach tylakoidov, sa nachádzajú pigment-proteínové komplexy (Lindquist a Aronsson 2018; Austin a Staehelin 2011).

2.1.2. Asimilačné pigmenty

Asimilačné pigmenty, ktoré sú súčasťou pigment-proteínových komplexov nachádzajúcich sa v tylakoidných membránach, sú nevyhnutné pre priebeh fotosyntézy. Zachytávajú a absorbujú energiu svetelného žiarenia a podieľajú sa na procese prevodu svetelnej energie na chemickú, pričom v tejto podobe sa energia ukladá pre ďalšie využitie. Asimilačné pigmenty sa delia na dve skupiny a to na tetrapyrolové, medzi ktoré radíme chlorofyly, bakteriochlorofyly a bilíny. Druhou skupinou sú izoprenoidy, medzi ktoré patria karotenoidy (Lichtenthaler 1987).



Obr. 2: Prehľad organizácie tylakoidov grán a strómy. (A) až (C) sú tri kompozitné tomografické rezy zobrazujúce pohľady spredu (A), stredu (B) a zozadu (C) na skupinu tylakoidov grán. (D) a (E) sú tomograficky rekonštruované modely grán zobrazené na (A) až (C), pričom tylakoidy grán (gt) sú zafarbené žltou farbou a tylakoidy strómy (st) sú zafarbené nazeleno (prevzaté od Austin a Staehelin

2.1.2.1. Chlorofyly

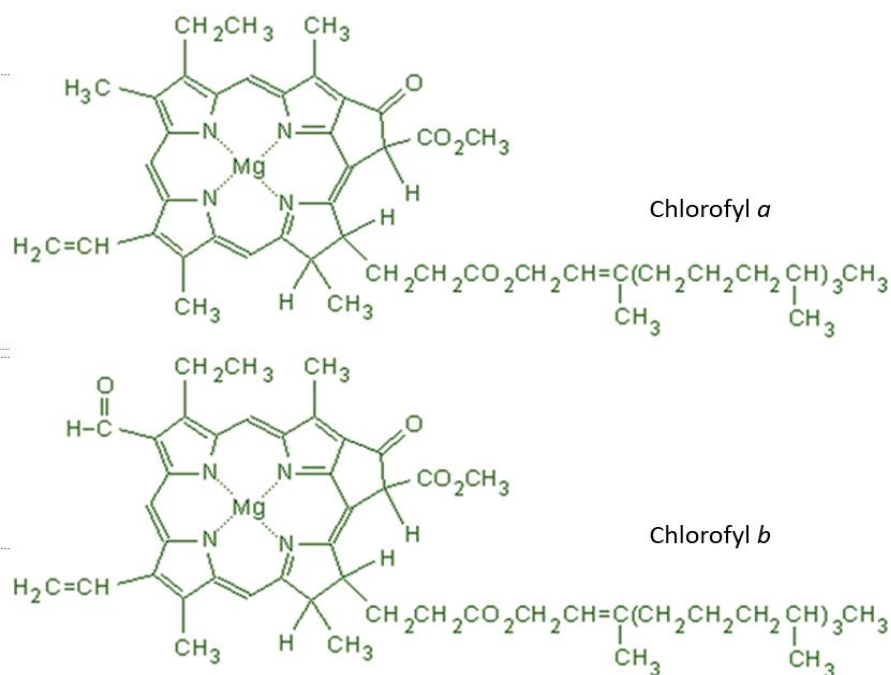
U štruktúrneho chemického vzorca chlorofylu (Obr. 3) je možné si všimnúť atómu horčíka koordinácie viazaného štyrmi atómami dusíku. Dusíkový atóm je súčasťou pyrolového kruhu, a tak možno skupinu asimilačných pigmentov chlorofylov zaradiť medzi tetrapyroly. Možno ich prirovnať ku porfyrínom. Chlorofyly formujú tiež tzv. E- zocyklický piaty kruh (Merritt a Loening 1979; Phu 2014).

Rozoznáva sa päť základných typov molekúl chlorofylov, označované ako *a* až *f* (Vernon a Seely 2014). Miera absorpcie svetla pigmentom sa označuje ako molárny extinkčný koeficient ϵ , ktorý je špecifický nie len pre každú molekulu zvlášť ale aj pre vlnovú dĺžku svetla. Jeho závislosť od vlnovej dĺžky λ sa volá absorpčné spektrum (Shipman a kol. 1976).

Chlorofyl *a* má maximum absorpcie v modrej časti spektra na 430 nm a v červenej oblasti na 662 nm. Chlorofyl *b* sa od predošlého typu chlorofylu líši len náhradou formylovej skupiny za metylovú na uhlíku C7, a jeho absorpčné maximá sú bližšie pri sebe a to na 455 nm a 644 nm. Je najčastejším typom chlorofylu vo svetlozberných anténach eukaryotických organizmov schopných fotosyntézy (Vernon a Seely 2014).

2.1.2.2. Karotenoidy

Tento druh asimilačných pigmentov možno zaradiť medzi tertraterpény pozostávajúce z ôsmich molekúl izoprénu. Možno ich rozdeliť na karotény a xantofyly (Britton 1996).

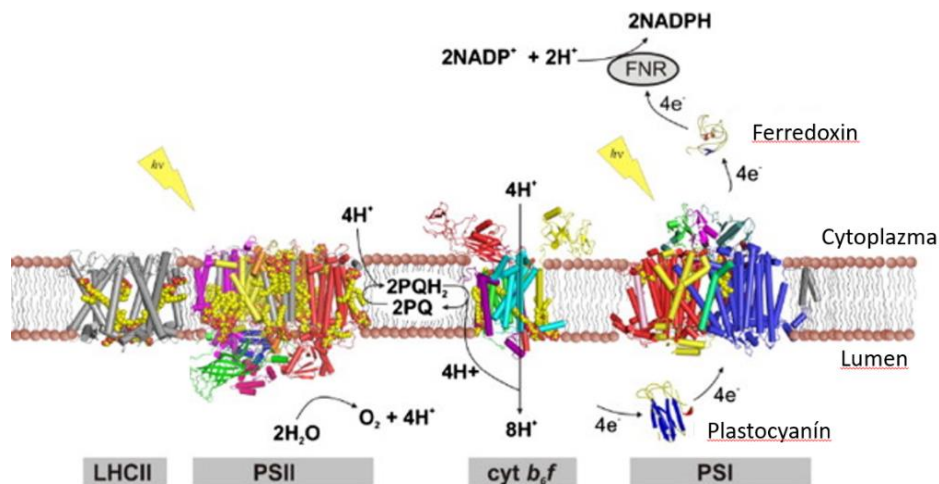


Obr. 3: Štruktúrny vzorec chlorofylu *a* a chlorofylu *b* prevzatý z Phu (2014).

Sú súčasťou svetlozberných systémov. Ich úlohou je prenášať zachytenú energiu svetla na chlorofyly a chrániť fotosystém pred fotooxidáciou (Nettoa kol. 2005).

2.1.3 Tylakoidná membrána

Štrukturálnym znakom tylakoidných membrán rastlín je ich stohovanie za vzniku takzvaných grán, ktoré sú navzájom prepojené spojitou sieťou stromálnych lamiel. Graná sú tvorené vrstvami plochých membránových diskov tylakoidov s priemerom ~ 300 – 600 nm (Kirchhoff a kol. 2011). Rôzne lipidy sú asymetricky distribuované vo vrstvách membrán susediacich so strómou a lumenom. Až 40 % tylakoidných lipidov sa viaže na proteíny (Jost a kol. 1973; Páli a kol. 2003; Najafpour a kol. 2012). Hlavná funkcia lipidov je vytvoriť maticu pre uloženie pigment-proteínových komplexov fotosyntetického aparátu a umožniť tak vznik elektrochemického potenciálu potrebného pre produkciu ATP. Lipidy sa vyskytujú tiež ako štrukturálne zložky (Obr. 4) hlavných fotosyntetických proteínových komplexov – fotosystém I (PSI), fotosystém II (PSII) a svetlozberný komplex II (LHCII) (Mizusawa a Wada 2012). Tylakoidná membrána je husto naplnená proteínmi. Celkové integrálne proteíny a pigment-proteínové



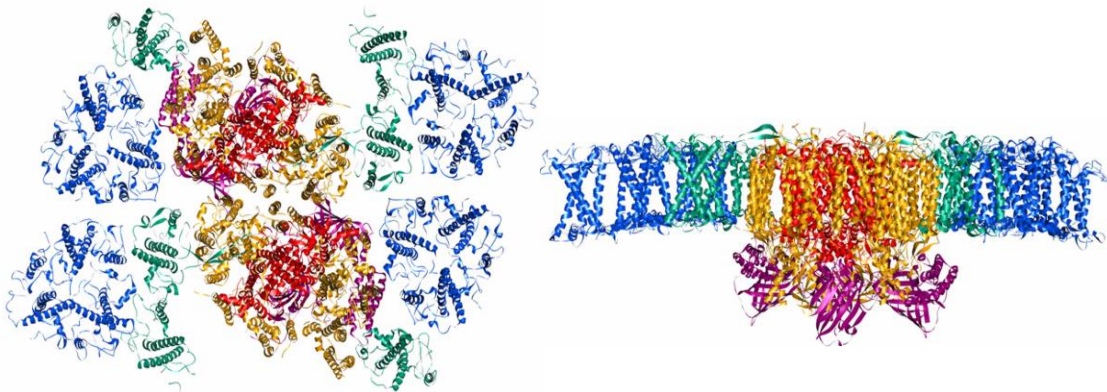
Obr. 4: Schematický pohľad na tylakoidnú membránu s vloženým fotosystémom I (PSI), fotosystémom II (PSII), svetlozberným komplexom II (LHCII) a komplexom cytochrómu b_6f . Pre jednoduchosť je znázornený iba jeden monomér každého komplexu, transmembránové helixy sú zobrazené ako valce, všetky kofaktory okrem lipidov sú vynechané. Lipidy, ktoré sú vlastné štruktúram, sú zobrazené v zastúpení výplne priestoru žltými guľičkami pre uhlík a červenými pre kyslík. Protónové, ako aj elektrónové toky sú označené šípkami. PQ znamená plastochinón, PQH2 pre plastochinol a FNR pre ferredoxín-NADP⁺ reductázu. Žlté blesky značia svetlo. Prevzaté od Najafpour a kol. 2012.

komplexy môžu zaberat' 70 % až 80 % plochy v stlačených granálnych membránach (Haferkamp a kol. 2010).

2.1.3.1. Fotosystém II

Na fotosystém II sa práca zameriava preto, lebo spolu s LHCII svetlozbernou anténou tvorí superkomplex PSII-LHCII, v ktorom budú práve zmeny pri mutantoch arábkovky thalovej, na ktoré bude práca zameraná.

V prítomnosti katiónov vedú molekulárne interakcie medzi PSII a LHCII k tvorbe superkomplexov zložených z dimérnych komplexov jadra PSII a periférne pripojených LHC (Obr. 5). V tylakoidnej membráne (TM) sa PSII najčastejšie objavuje v podobe superkomplexu $C_2S_2M_2$. C_2 je dimérne jadro PSII s malými aditívnymi LHCII anténami (CP29, CP26 a CP24). S_2 sú dva LHCII triméry, ktoré sú silne viazané ku komplexu cez CP26. M_2 sú opäť dva triméry LHCII, ktoré sú v kontakte s CP29 a CP24 a sú mierne viazané ku komplexu $C_2S_2M_2$ (Kouřil a kol. 2013; Dekker a Boekema 2005; Caffarri a kol. 2009). Superkomplex PSII-LHCII je primárnou funkčnou jednotkou PSII vo vyšších rastlinách viažuci väčšinu chlorofylov a nachádza sa výlučne v granách. Superkomplexy PSII-LHCII sú schopné zhromažďovať sa do štruktúr vyššieho rádu v granách vyšších rastlín, ako sú megakomplexy, pozostávajúce z dvoch alebo viacerých superkomplexov alebo rozšírených vysoko usporiadaných semikryštalických polí. O úlohe týchto polí a dokonca aj o ich prítomnosti sa diskutovalo, kým iné štúdie nepreukázali, že ich vzhľad závisí od fyziologických podmienok - semikryštalické domény sa objavujú vo vyššej miere pri slabom osvetlení alebo pri nízkych teplotách a môžu pokryť celý disk grana. Kouřil a kol. (2013) potvrdili, že tvorba semikryštalickej



Obr. 5: Schematický pohľad na podjednotky apoproteínov s hlavnými trimérami LHCII v modrej farbe, malými LHCII v zelenej farbe, komplexom jadra fotosystému II (PSII) v žltej farbe, proteínmi D1 / D2 v červenej farbe a s podjednotkami komplexu vyvíjajúceho kyslík (PsbO, PsbP a PsbQ) vo fialovej farbe. Prevzaté od Lambrev a Akhtar 2019.

domény závisí od svetelných podmienok rastu a rozdielneho skladania superkomplexov PSII-LHCII za rôznych okolností, ako je napríklad prítomnosť alebo absencia menších komplexov antén PSII a proteínu PsbS (Kovács a kol. 2006; Kiss a kol. 2008).

2.2. Zachytenie svetelnej energie

2.2.1. Svetelné žiarenie

Fotosyntetizujúce rastliny zachytávajú tzv. fotosynteticky aktívne žiarenie (PAR), ktoré je v približnom rozsahu spektra ako viditeľné žiarenie (400-700 nm). Žiarenie zo slnka je pri dopade na Zemský povrch čiastočne odfiltrované atmosférou, pričom iba 40 % prejde žiarenia možno označiť za PAR žiarenie. Avšak len 80 % PAR žiarenia je zachyteného asimilačnými pigmentami, a nie všetko zo zachyteného svetla sa spotrebuje na fotosyntézu, keďže sa značná časť stratí vo forme tepla a fluorescencie. Na tvorbu makrozlúčenín sa využije teda len 5 % slnečného žiarenia (Mörtl a kol. 2012).

2.2.2. Proces zachytávania svetla svetlozbernými anténami

Veľká časť pigmentov – chlorofylov je v organizmoch vykonávajúcich fotosyntézu viazaná v tzv. „light harvesting complexes“ (LHC alebo LHA) alebo v preklade, vo svetlozberných anténach. Tieto formácie fungujú na princípe lievika keď sa jedná o prenos energie (excitónu). Časti LHA sa delia na distálne (absorbujú svetlo kratších vlnových dĺžok = s najväčším množstvom energie) a na proximálne (absorbujú svetlo dlhších vlnových dĺžok = s nižším množstvom energie). Prenos excitónov prebieha v smere od tých, čo absorbujú svetlo s najnižšími vlnovými dĺžkami (najvyššou energiou) po tie, ktoré absorbujú svetlo o najvyšších vlnových dĺžkach (s najnižšou energiou), keďže excitón stráca časť svojej energie týmto ireverzibilným transferom, pričom celý posun smeruje k reakčnému centru. Takýto koncept lievika využívajú periférne antény, avšak nemožno ho vždy nájsť pri jadrových alebo fúznych anténach (Neilson a Durnford 2010; Ballottari a kol. 2012).

Princíp lievika využíva Försterov neradiačný rezonančný transfer energie pokiaľ sú molekuly chlorofylu od seba vzdialené viac ako 1 nm. Ak je tomu inak využíva sa excitačné spojenie, ktoré sa však moc od predošlého typu nelíši (Ballottari a kol. 2012). Anténa LHCII (light harvesting complex of photosystem II), ktorá patrí medzi integrálne a nachádza sa u rastlín a rias, predstavuje najvýznamnejšiu svetlozbernú anténu (Lambrev a Akhtar 2019).

2.2.2.1. Štruktúra a flexibilita LHCII

LHCII sa skladá z proteínov a pigmentov. Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3 sú proteíny nachádzajúce sa v LHCII, ktoré tieto pigmenty viažu. Ich výskyt je približne 8:3:1

a navzájom sú takmer identické (van Amerongen a kol. 2007). Každá monoména podjednotka nekovalentne viaže až osem chlorofylov *a*, šesť chlorofylov *b* a štyri xantofyly. Transmembránová časť proteínového komplexu má vysokú štruktúrnu rigiditu, ktorá zaisťuje prísnu geometriu a elektrostatické prostredie pigmentov, ktoré následne určujú vlastnosti komplexu v excitovanom stave (Standfuss a kol. 2005; Dockter a kol. 2011). Chlorofyly sú usporiadané v dvoch vrstvách a to osem chlorofylov v blízkosti N-konca na stromálnej strane TM a šesť na lumenálnej strane (Lambrev a Akhtar 2019).

Ako dôležitá súčasť grana je LHCII tiež kľúčovým hráčom v niekoľkých regulačných funkciách, ktoré granálne membrány vykonávajú, najmä pri vyrovnávaní toku excitačnej energie stavovými prechodmi a nefotochemickým zhasaním. Rozumie sa, že tieto procesy zahŕňajú niektoré riadené zmeny v konformácii a makroorganizácii LHCII (Lambrev a Akhtar 2019).

2.2.3. Svetlom podmienené zmeny v makroorganizácii tylakoidnej membrány

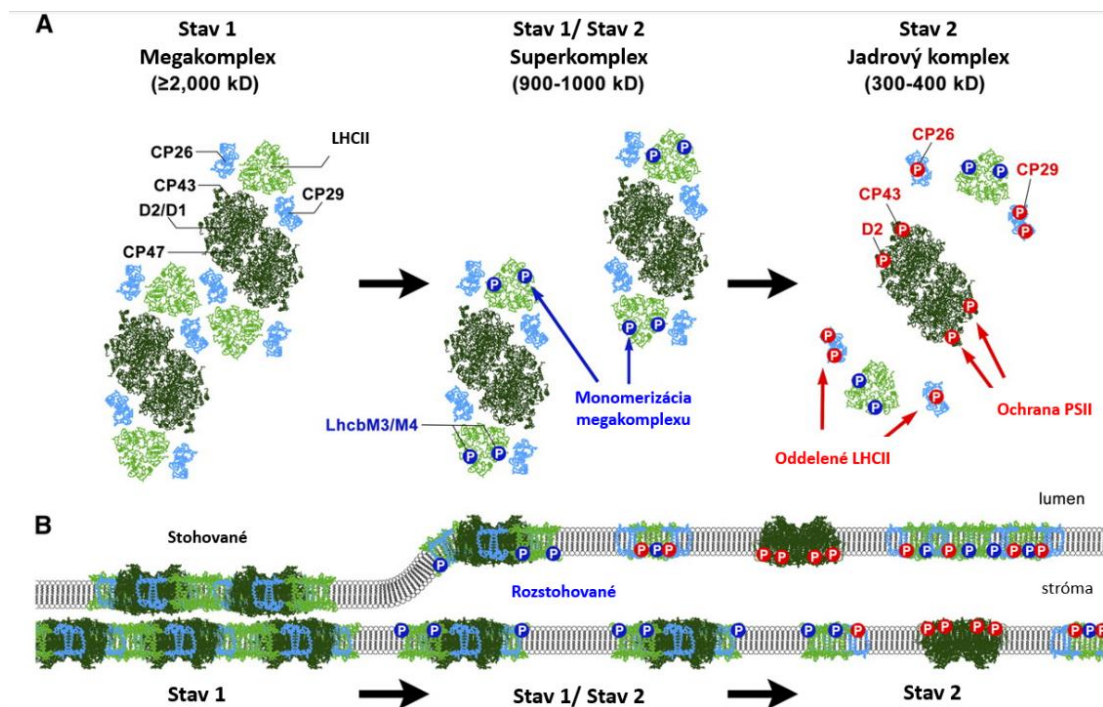
Granálna tylakoidná membrána vysoko flexibilne upravuje svoju štruktúru, zloženie a supramolekulárnu organizáciu na rôznych hierarchických úrovniach, v mikroskopickom aj mezoskopickom meradle a v časových škálach trvajúcich niekoľko sekúnd až dní. Dlhodobá aklimatizácia na fyziologické prostredie zvyčajne zahŕňa zmeny v zložení lipidov, bielkovín a pigmentov a ultraštruktúre chloroplastov. Napríklad listy na slnku a listy v tieni sa líšia svojimi pomermi chlorofylov (Chl) *a/b*. Dlhodobá aklimatizácia prináša reorganizáciu superkomplexov PSII-LHCII, moduláciu veľkosti antén a obsahu špecifických proteínov Lhcb (Albanese a kol. 2016; Anderson 1986).

Schopnosť fotosystému PSII katalyzovať fotooxidáciu vody je spojená s jeho citlivosťou na oxidačné poškodenie. Týka sa to najmä jadrovej podjednotky, proteínu D1. Fotopoškodený PSII prechádza opravou vo viacstupňovom procese zahŕňajúcom reverzibilnú fosforyláciu základných podjednotiek PSII, následne monomerizáciu a bočnú migráciu jadra PSII z grán do strómových tylakoidov. Nasleduje čiastočná demontáž PSII a potom proteolytická degradácia poškodeného proteínu D1. Proteín D1 sa po predošlom kroku nahradí novou kópiou a nasleduje opätovné zostavenie monomérov PSII a migrácia späť na graná, dimerizácia a zostavenie superkomplexu (Theis a kol. 2016).

Ďalšou dynamickou zmenou v makroorganizácii TM sú stavové prechody ktoré pravdepodobne vyžadujú prestavbu superkomplexov fotosystému. Ide hlavne o vyrovnanie toku energie medzi PSII a PSI a tým k vyrovnaní toku elektrónov v elektrónovom transportnom reťazci fotosyntézy. Ako PSII tak aj PSI primajú fotóny a stavové prechody vyrovnávajú množstvo absorbovanej energie skrz tieto dva fotosystémy tým, že trimérny LHCII sa môže presunúť k PSI (prechod zo stavu 1 do stavu 2). Pokiaľ PSII príma veľké množstvo fotónov, môže dôjsť k fosforylácii LHCII, fosforylovaný LHCII sa presúva k PSI. Zároveň sa zmenší svetlozberná anténa na PSII, týmto spôsobom sa zabráni fotopoškodeniu PSII. Bude prichádzať menej energie z antény. Naopak pri zatičení sa vracia do stavu 1. Trimér LHCII sa defosforyluje a presúva sa preč od PSI (Lambrev a Akhtar 2019; Iwai a kol. 2008). Proces bližšie vysvetľuje Obr. 6.

2.2.3.1. Aklimácia rastlín na zvýšenú a zníženú intenzitu osvetlenia

Efektívna aklimatizácia na rôzne intenzity osvetlenia je pre fitness rastlín nevyhnutná. V roku 2017 bola vytvorená štúdia (Schumann a kol. 2017), kedy bola *Arabidopsis thaliana* pestovaná pri troch rôznych konštantných intenzitách svetla



Obr. 6: Navrhovaný model remodelácie PSII počas prechodu zo stavu 1 do stavu 2.

(A) Pohľad zhora nadol zo stromálnej strany membrány ukazujúci rozdelenie megakomplexu PSII a oddelenie periférnej antény. Fosforylácie v prvom a druhom kroku sú označené modrými a červenými kruhmi s písmenom „P“. (B) Bočný pohľad na rovinu membrány zobrazujúci zmeny v tylakoidnej ultraštruktúre (Iwai a kol. 2008).

(LL: 25 $\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; NL: 100 $\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; HL: 500 $\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a za podmienok prirodzeného kolísavého svetla (NatL). Bola vykonaná dôkladná charakterizácia morfológických, fyziologických a biochemických vlastností so zameraním na fotoochranné mechanizmy. Rastliny pestované za konštantných vysokých svetelných podmienok vykazovali zvýšený rast v porovnaní s rastlinami pestovanými za stáleho slabého osvetlenia, ako sa usudzuje z fenotypu 6 týždňov starých rastlín. Ako najmenešie boli vyhodnotené rastliny pestované na LL. Mikroskopická analýza prierezov listov odhalila podobnú hrúbku listov asi 115–30 μm v rastlinách LL a NL, zatiaľ čo rast pod HL viedol k približne dvojnásobne silnejším listom s hrúbkou asi 270–280 μm . Zvýšená hrúbka listov rastlín HL bola spôsobená hlavne predĺženými bunkami parenchýmu a iba čiastočne súvisela so zvýšeným počtom bunkových vrstiev, ktoré sa pohybovali medzi 6 vrstvami v LL rastlinách, 7 vrstvami v NL a 8 vrstiev v rastlinách HL. Počet chloroplastov na mezofylóvu bunku sa zvýšil z približne štyroch v LL rastlinách na šesť v NL rastlinách a osem v HL rastlinách. Iba malý rozdiel bol určený pre obsah *Chl* v chloroplastoch, ktorý mal tendenciu klesať s rastúcou intenzitou svetla a bola najnižšia v rastlinách pestovaných v NatL (Schumann et al. 2017).

V posledných rokoch sa skúmali aj modifikácie svetelného aparátu, obsah asimilačných pigmentov a celkové správanie rastlín po aklimácii na rôzne druhy osvetlenia. Vo výsledkoch štúdie z roku 2016 (Albanese a kol. 2016) prišli s nasledujúcimi závermi. Po dlhodobej aklimácii fotosyntetického aparátu na rôzne druhy osvetlenia bolo možné sledovať zmeny v zložení fotosyntetických pigmentov. Tylakoidy extrahované z rastlín hrachu aklimované na zvyšujúce sa intenzity svetla (slabé svetlo o intenzite 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fotónov, LL; mierne kontrolné svetlo o intenzite 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fotónov, CL; vysoké svetlo o intenzite 750 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fotónov, HL) vykazovali zvýšenie pomeru *Chl a/b* v HL rastlinách (HL 4,0 oproti CL 3,3) a pokles v LL rastlinách (LL 2,9 vs CL 3,3). Vzhľadom k tomu, že *Chl b* sa špecificky viaže na anténne proteíny (LHCb), tieto zmeny v pomere *Chl a/b* naznačujú, že zmeny osvetlenia boli účinné pri indukcii modulácie veľkosti svetlozberných antén. Aby získali prehľad o zložení superkomplexov PSII-LHCII, vykonala sa podrobná proteomická analýza na izolovaných vzorkách PSII-LHCII. Po digescii všetkých zafarbených škvŕn v géli trypsínom odhalila analýza prítomnosť základných podjednotiek PSII CP47, CP43, D2 a D1, šiestich proteínov vonkajšej antény Lhcb (Lhcb1–6) a OEC podjednotky PsbO

v izolovaných superkomplexoch. Proteomická analýza tiež detegovala prítomnosť izoforiem monomérskej antény Lhcb4 (Albanese a kol. 2016).

Následne boli skúmané aj iné anténne podjednotky, ako sú Lhcb3 a Lhb6. Tie patria medzi anténne podjednotky so zvláštnou distribúciou, prvá je zložkou iba M-trimérov LHCII a druhá monomérom LHCII fungujúcim ako špecifický linker pre M-trimér LHCII k C_2S_2 superkomplexu (Albanese a kol. 2016). Tieto podjednotky boli detegované iba v dvoch najťažších superkomplexoch z troch prítomných vo vzorkách PSII-LHCII, ktoré boli takto identifikované ako $C_2S_2M_2$ a C_2S_2M ; v dôsledku toho bola tretia forma s najmenšou veľkosťou a bez M interpretovaná ako typ C_2S_2 . Z týchto analýz bolo zrejmé, že v rastlinách adaptovaných na LL prevládali superkomplexy PSII-LHCII typu $C_2S_2M_2$ a C_2S_2M , zatiaľ čo v prípade rastlín adaptovaných na HL to boli C_2S_2 (Albanese a kol. 2016).

Izolované $C_2S_2M_2$, C_2S_2M a C_2S_2 boli tiež prevažujúcou formou superkomplexov nachádzajúcich sa v natívnych membránach. Prítomnosť zvýšeného množstva C_2S_2 v rastlinách aklimovaných na HL možno považovať za indikáciu vyššej akumulácie degradovaných a/alebo nepripojených foriem superkomplexov v rastlinách adaptovaných na HL. Okrem toho v nich bolo viditeľné väčšie množstvo monomérskeho PSII a voľných LHCII, čo naznačuje že celková organizácia PSII je významne modifikovaná v rastlinách aklimatizovaných na vysoké osvetlenie (Albanese a kol. 2016).

Zmeny v množstve funkčného anténneho komplexu PSII sa ďalej hodnotili v tylakoidných membránach a superkomplexoch PSII-LHCII izolovaných z rastlín dlhodobo aklimovaných na rôzne svetlené podmienky pomocou chlorofylových fluorescenčných techník. Merania fluorescencie ukázali, že analyzované rastliny reagovali na zvýšenie intenzity rastového svetla zmenšením veľkosti ich anténneho systému PSII, s podobným trendom pozorovaným ako v tylakoidných membránach, tak aj v izolovaných vzorkách PSII-LHCII. Pri porovnaní HL rastlín vs rastlín LL bola táto redukcia výraznejšia u tylakoidov ako u izolovaných častíc, pričom dosiahla pokles asi o 45 % v prvých a o 21 % v posledných. Pri zrovnaní veľkostí antény PSII a pomerov Chl *a/b* nameraných vo vzorkách tylakoidov a PSII-LHCII sa pozorovala dobrá korelácia medzi znížením veľkosti antény PSII a zvýšením pomeru Chl *a/b* po zvýšení intenzity osvetlenia.

Skúmaný bol aj proteín PsbS. Ten sa opisuje ako regulačný proteín pre PSII v rastlinách, pričom jeho lokalizácia v tylakoidných membránach je stále nejasná (Gerotto a kol. 2015). Analýza neodhalila PsbS v žiadnom z izolovaných PSII-LHCII,

čo potvrdzujú proteomické analýzy, a to napriek jeho prítomnosti v zodpovedajúcich východiskových tylakoidoch. Aby pochopili (Albanese a kol. 2016), či došlo k inej akumulácii tejto podjednotky v tylakoidoch izolovaných z rastlín pestovaných pri rôznych intenzitách svetla, merali relatívny obsah PsbS imunoblotovaním. Uvedené výsledky kvantifikácie ukazujú, že množstvo PsbS je 1,4 krát vyššie v HL rastlinách vzhľadom na CL rastliny, zatiaľ čo v LL rastlinách je znížená na 0,75 násobok. Tieto údaje podporujú myšlienku, že keď sú rastliny pestované pri vysokom svetle, je PsbS nadmerne exprimovaný, aby sa zvýšila rýchlosť aktivácie NPQ, naopak, pri pestovaní pri slabom osvetlení je hladina PsbS znížená, aby sa zabránilo zbytočnému rozptylu energie. V týchto vzorkách rovnakou metódou kvantifikovali aj jadrovú podjednotku PSII D2. Ak je obsah PsbS normalizovaný na obsah jadra PSII, je zvýšenie množstva PsbS v rastlinách HL ešte väčšie (1,7 násobné) a jeho pokles v LL rastlinách ešte výraznejší (0,6 násobné) (Albanese a kol. 2016).

Najnovšia štúdia (Grinzato a kol. 2020) naznačuje diverzifikovanú stratégiu, ktorú prijali rastliny voči aklimovaniu na rôzne druhy intenzity osvetlenia pri zachovaní stohovania granálnych tylakoidov. V rastlinách pestovaných pri slabom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fotónov) sa na väčšie a hrubšie granálne membrány zместia hlavne spárované superkomplexy s väčšou anténou $(\text{C}_2\text{S}_2\text{M}_2)_2$, ktoré majú usporiadanie, ktoré maximalizuje exponovanú oblasť LHCI_{II} na zber svetla a zvyšuje konektivitu PSII na optimalizáciu svetla a efektívnosť využitia. V týchto rastlinách poskytuje vzájomná interakcia stromálne exponovaných N-koncov dvoch protiľahlých podjednotiek Lhcb4 v $(\text{C}_2\text{S}_2\text{M}_2)_2$ superkomplexu fyzickú kotvu v stromálnej medzere na posilnenie zoskupenia grán. V rastlinách pestovaných na vysokom svetle (HL; $750 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fotónov) sa do užších a tenších granálnych membrán zместia väčšinou spárované superkomplexy s menšou anténou $(\text{C}_2\text{S}_2)_2$, ktoré majú usporiadanie, ktoré zmenšuje oblasť LHCI_{II} vystavenú svetlu zvýšením prekrytia trimérov S-S. Toto takmer úplné prekrytie trimérov LHCI_{II} v superkomplexe $(\text{C}_2\text{S}_2)_2$ môže hrať kľúčovú úlohu pri udržiavaní stohovania granálnych tylakoidov v rastlinách dlhodobo aklimovaných na vysoké osvetlenie. Okrem toho v týchto rastlinách môže čiastočné obsadenie polohy Lhcb4 v $(\text{C}_2\text{S}_2)_2$ izoformou Lhcb4.3 konštitutívne znížiť väzbovú afinitu pre ďalšie triméry M-LHCI_{II}, a tým pôsobiť fotoprotektívne funkcie na PSII pri nadmernom konštantnom osvetlení (Grinzato a kol. 2020).

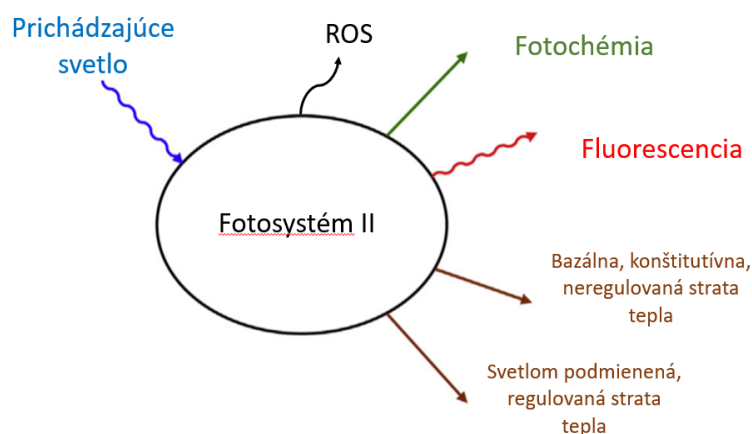
2.3. Nefotochemické zhášanie fluorescence

2.3.1. Fluorescencia chlorofylu

K procesu absorpcie svetla v rastlinách sa využívajú chlorofyly. Tie absorbujú najlepšie v červenej a modrej oblasti. Po absorpcii svetla dôjde ku excitácii molekuly chlorofylu. Excitované molekuly chlorofylu nie sú stabilné a snažia sa nadbytočnej energie zbaviť a vrátiť sa do základného stavu. Po absorpcii modrého svetla sa molekula chlorofylu dostáva do vyššieho excitovaného stavu, následne však klesne na nižší excitovaný stav podobný tomu, pri absorpcii svetla z červenej oblasti. Prijatá svetelná energia sa vyžiarí vo forme tepla. Z nižšieho excitovaného stavu sa molekula však následne dostáva na základný stav pričom existuje niekoľko možností využitia energie (Lazár 2015).

Prvým z nich je fluorescencia (Obr. 7). Ďalej to môže byť formou tepla. Tiež si môžu molekuly chlorofylu medzi sebou excitačnú energiu predávať a teda uvádzať do excitovaného stavu molekuly okolo seba. Takisto dochádza aj ku separácii náboja v reakčnom centre. Tento proces je kľúčový pre fotosyntézu, keďže sa pri ňom premieňa energia zo žiarenia na energiu chemických väzieb (Lazár 2015). Poslednou možnosťou je reakcia molekuly chlorofylu s kyslíkom za vzniku reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré bunkovú štruktúru však poškodzujú. Všetky zmienené procesy medzi sebou súperia.

Pre priblíženie vyššie spomenutých procesov, ich priebehu a pod. boli rozpísané nasledovne. Hneď ako sú fotóny absorbované LHA pigmentmi, sú rýchlo ekvilibrované medzi všetkými pigmentmi, vrátane pigmentov reakčných centier. Fotochémia je vysoko



Obr. 7: Schematické znázornenie základného rozdelenia prichádzajúcej svetelnej energie vyskytujúceho sa vo fotosystéme II. Prevzaté od Lazár 2015.

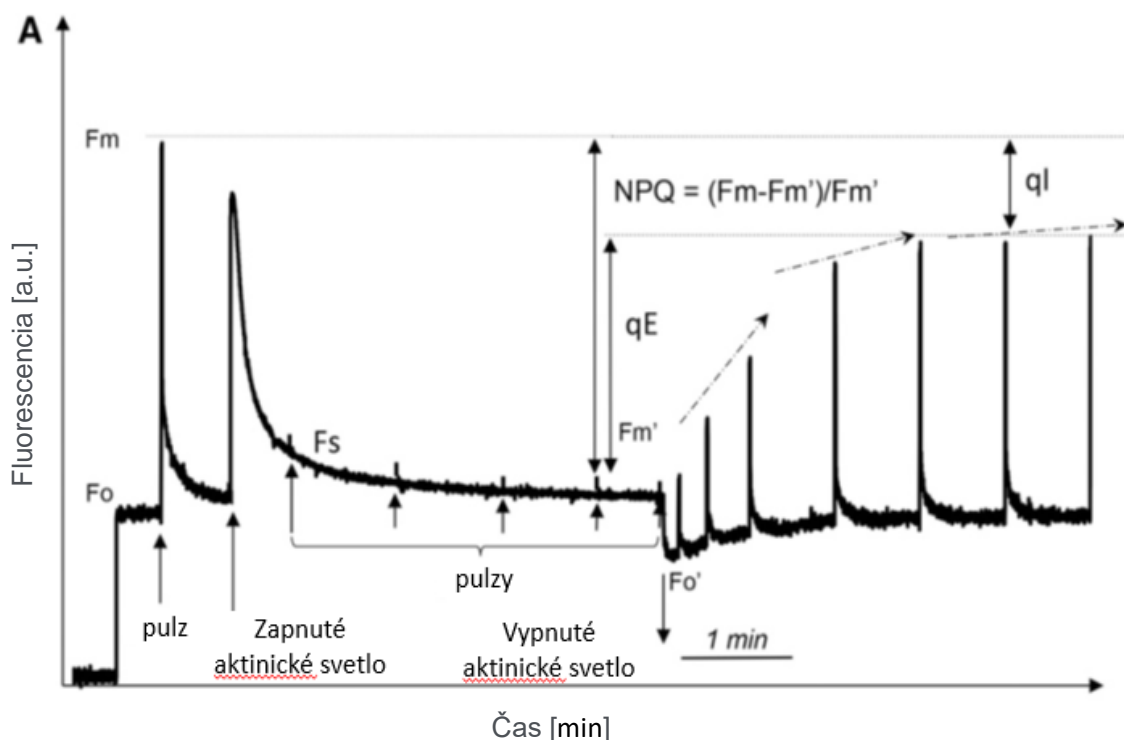
efektívna v prípade, keď je reakčné centrum (fotosyntetický aparát) v takzvanom „otvorenom“ stave, fluorescenčná emisia je nízka (Miyake a kol. 2009; Henriques 2009).

Ak je účinnosť fotochémiie nízka, je to v prípade, že je reakčné centrum (fotosyntetický aparát) v takzvanom „uzavretom“ stave (uzavretý + otvorený = 1), fluorescenčná emisia je vysoká (Miyake a kol. 2009; Henriques 2009). Z dôvodu existencie vzájomného vzťahu medzi využitím excitačnej energie na fotochémiu (separácia primárneho náboja) alebo fluorescenčnú emisiu vo fotosyntetických vzorkách, môže fluorescenčný signál informovať o fotosyntetickej funkcii (Henriques 2009).

2.3.2. Zložky nefotochemického zhášania

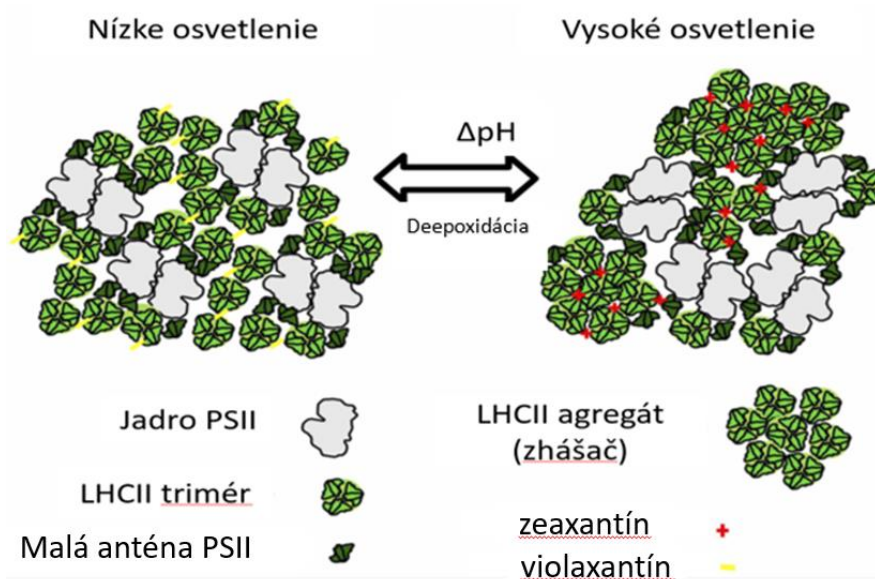
Nefotochemické zhášanie fluorescencie chlorofylu (NPQ) je proces, pri ktorom sa prebytočná absorbovaná svetelná energia odvádza vo forme tepla. Tento proces prebieha vo fotosyntetických membránach rastlín, rias a siníc (Govindjee a kol. 2014). NPQ bol predstavený ako jeden z procesov, ktoré vznikajú vo fotosyntetickej membráne a ktoré nie sú fotochemického pôvodu. Aktivita reakčného centra fotosystému II (RCII) skutočne spôsobuje významné zníženie alebo potlačenie fluorescencie chlorofylu, pretože spotrebováva svetelnú energiu, ktorá by sa inak mohla uvoľniť prostredníctvom fluorescencie, interkonverzie alebo medzisystémovým prechodom (Obr. 8) (Ruban 2016).

Na základe kinetiky relaxácie fluorescencie chlorofylu v tme sú určené najmenej 3 časti NPQ. Sú nimi energeticky závislá zložka q_E , ktorá je spustená protónovým gradientom cez tylakoidnú membránu a relaxuje behom niekoľkých sekúnd; druhá zložka, q_T , ktorá závisí od stavových prechodov a uvoľní sa do niekoľkých minút; a tretia zložka, q_I , ktorá je spôsobená fotoinhibíciou a relaxuje veľmi pomaly (Jahns a Holzwarth 2012; Ruban a Murchie 2012; Zhao a kol. 2017; Rochaix 2014). NPQ sa odohráva v anténe (Fleming a kol. 2012; Ruban a kol. 2012), ktorá prechádza zmenou vyvolanou rozdielom pH (ΔpH) (Strand a kol. 2014). NPQ je buď priamo spúšťané ΔpH , protonáciou anténnych komponentov, alebo nepriamo, aktivitou xantofylového cyklu (Ruban a Murchie 2012). Pretože ΔpH sa generuje v dôsledku transportu elektrónov, prispieva k veľkosti zmeny celý rad dráh (Strand a Kramer 2014), pričom sa ukazuje, že cyklický transport elektrónov okolo PSI je hlavným prispievateľom k zložke ΔpH , ktorá spúšťa najväčšiu časť NPQ (Munekage a kol. 2004). Je pravdepodobné, že pomer PSII k PSI definovaný napríklad v priebehu reakcie ovplyvní spúšť, a teda aj veľkosť NPQ (Brestic a kol. 2015). Protóny, nachádzajúce sa v lumenoch tylakoidov, ovplyvňujú



Obr. 8: Typický výstup PAM pre fluorescenciu listu arábkovky thalovej ukazujúci indukciu a relaxáciu NPQ. F_m a F_o sú maximálne a minimálne hodnoty fluorescencie listu v stave adaptovanom na tmu, v tme pred osvetlením aktinickým svetlom. F_s je hladina fluorescencie v ustálenom stave. F_m' je maximálna fluorescencia počas osvetlenia aktinickým svetlom. Na uzavretie všetkých RCII boli aplikované svetelné pulzy a boli použité na stanovenie F_m a F_m' . qE a qI sú rýchlo a pomaly relaxujúce zložky NPQ (Ruban 2016).

tri kľúčové komponenty zapojené do NPQ: violaxantín-deepoxidáza, proteín PsbS a anténa LHCII (Belgio a kol. 2013; Ruban 2016). NPQ znižuje kvantový výťažok fotochémie PSII o 60-80 %. Molekulárny mechanizmus, ktorý stojí za NPQ, nebol doposiaľ jednoznačne stanovený a v skutočnosti môže existovať niekoľko mechanizmov pôsobiacich paralelne. Zhodlo sa však, že aktivácia NPQ je spojená so zmenami organizácie membrán. Samotná makroorganizácia (Obr. 9) je rozhodujúca pre účinnosť NPQ pri odstraňovaní excitónou z reakčných centier. Excitóny migrujú medzi komplexmi pigment-proteín na veľké vzdialenosti, ktoré sa vyznačujú difúznou dĺžkou ~ 50 nm (Bennett a kol. 2019; Amarnath a kol. 2016) alebo veľkosťou funkčnej domény niekoľkých desiatok anténnych komplexov (Lambrev a kol. 2011; Barzda a kol. 2001)



Obr. 9: Štrukturálny model reorganizácie tylakoidných membrán súvisjúci s nefotochemickým zhášaním fluorescencie. V tme a slabom osvetlení je LHCII distribuovaný pomerne rovnomerne v grane, pričom vytvára veľké superkomplexy $C_2S_2M_2$ s PSII a malými anténnymi proteínmi. Pri nadmernom osvetlení ΔpH spúšťa konformačnú zmenu v komplexoch LHC, ktorá spôsobuje čiastočnú disociáciu superkomplexu PSII-LHCII a vedie k agregácii LHCII. Deepoxidácia violaxantínu na zeaxantín podporuje agregáciu LHCII, a teda NPQ. Prevzaté od Lambrev a Akhtar 2019.

2.3.3. Zmeny v rôznych faktoroch ovplyvňujúcich NPQ pri rastlinách s prirodzeným a mutantným genotypom

Podľa niekoľkých štúdií sa očakáva, že LHCII bude jedným z hlavných miest priebehu NPQ. Najnovšie pozorovania (Wu a kol. 2020) ukázali postupné znižovanie množstva veľkých LHCII polypeptidov (Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3). Najmä zníženie Lhcb3 so zníženým obsahom *Chl b*. Ukázal sa však malý dopad zníženia na Lhcb4 a Lhcb5 na úrovniach LHCI polypeptidu. V tomto prípade sa znížila len hladina obsahu *Chl b*. Obsah Lhcb6, minoritného LHCII, bol tiež znížený, no bez výrazných zmien v základných štruktúrach: PSII, PSI a D1. Tie neboli ovplyvnené. Celkovo je zrejmé, že Lhcb3 je najcitlivejší na zníženie obsahu *Chl b*. To nie je prekvapujúce, pretože ide o najmenej početnú podjednotku v komplexe LHCII. Vzhľadom na to, že Lhcb3 sa zjavne vyvinul v rastlinách adaptovaných na pôdne prostredie a nenachádza sa v riasach, bola úloha tohto proteínu obsiahnutá v mechanizmoch NPQ (Alboresi a kol. 2008). Ukázalo sa, že zníženie obsahu Lhcb3 koreluje so stratou mierne viazaných LHCII M-trimérov a zmenami v orientácii M-trimérov. Lhcb3 teda hrá rozhodujúcu úlohu pri

regulácii prenosu energie z LHC do jadra reakčného centra vo vyšších rastlinách (Wu a kol. 2020). Aj keď najväčšie straty LHCII boli pozorované pre Lhcb3 so zníženým obsahom *Chl b* tiež bolo pozorované zníženie v množstve Lhcb1 spojené so znížením celkového chlorofylového obsahu. Lhcb1 sa prevažne nachádza v voľne viazaných LHCII L- triméroch, ako aj v LHCII M-triméroch. Zníženie hladín Lhcb1 sú v súlade s predchádzajúcimi opismi demonštrujúcich stratu voľne viazaných LHCII trimérov spojených so stratou *Chl b* (Friedland a kol. 2019). Celkovo tieto výsledky ukazujú, že voľne viazané LHCII L-triméry sú najviac ovplyvnené znížením obsahu *Chl b*. Po nich nasledujú LHCII M-triméry.

2.4. *Arabidopsis thaliana*

2.4.1 Modelová arábkovka thalová (*Arabidopsis thaliana*)

Arabidopsis thaliana je malá burina z rodiny horčice. Považuje sa za vhodný organizmus pre štúdium klasickej genetiky už viac ako štyridsať rokov. Vedci nedávno zistili, že táto kvitnúca rastlina má tiež veľkosti genómu a genomickú organizáciu, ktoré ju odporúčajú pre určité experimenty v molekulárnej genetike. Vďaka ľahkosti, s akou je táto rastlina vhodná na prácu v klasickej aj molekulárnej genetike, sa *Arabidopsis* široko používa ako modelový organizmus v molekulárnej genetike, vývoji, fyziológii a biochémií rastlín (Meyerowitz 1987).

2.4.2. Anténne proteíny

V rastlinách reakčné centrú fotosyntézy (RC) využívajú slnečnú energiu na pohon elektrónov z vody na NADP^+ . Tento transport je spojený s prenosom H^+ z chloroplastovej strómy do lumenu tylakoidov, ktorý vytvára protónový gradient pre syntézu ATP. Kapacitu absorpcie svetla zvyšujú proteíny viažuce pigmenty tvoriace anténny systém. Vo vyšších rastlinách je anténny systém obklopujúci jadro fotosystému II (PSII) kódovaný plastidovým genómom. Komplexy viažuce chlorofyl *a/b* (LHC) sú kódované jaderným genómom. LHCII je hlavnou súčasťou periférnej antény a obsahuje rôzne heterotriméry Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3 proteínov, zatiaľ čo komplexy menších antén (Chlorophyll Protein 29 [CP29], CP26 a CP24) sú kódované génmi *lhcb4*, *lhcb5* a *lhcb6* a nachádzajú sa ako monoméry (Jansson 1999). Štrukturálna analýza organizácie superkomplexov PSII a Lhcb v membránach grana odhalila, že menšie komplexy CP26 a CP29 sa nachádzajú medzi jadrovým komplexom a trimérom LHCII (Boekema a kol. 1999). Ďalšie triméry LHCII, v závislosti od intenzity rastového svetla, dokončia štruktúru PSII a vyžadujú CP24 na pripojenie k jadru PSII vytvorením komplexu s CP29 (Dekker a kol. 2005). Podobne má PSI štyri anténne proteíny Lhca,

ktoré poskytujú celkovo 10 odlišných izoform Lhc vo vyšších rastlinách (Jansson 1999). Tieto génové produkty boli konzervované počas najmenej 350 miliónov rokov evolúcie, čo výrazne naznačuje, že každý komplex pigment-proteín má špecifickú funkciu vo vysoko variabilných podmienkach prírodného subaeriálneho prostredia (Ganeteg a kol. 2004).

Anténne proteíny sú nevyhnutne potrebné na úplnú expresiu NPQ (Briantais 1994). Antisense inhibícia expresie CP29, CP26 a Lhcb1 + Lhcb2 (Andersson a kol. 2003) nenarušila NPQ, zatiaľ čo delécia génu *lhcb6* kódujúceho CP24 túto funkciu znížila (Kovács a kol. 2006). Prekvapivo bolo však obmedzenie NPQ (de Bianchi a kol. 2008) a rýchlosti rastu *koCP24* obrátené u dvojitého mutantu *koCP24/26*, čo naznačuje, že fenotyp *koCP24* nebol spôsobený špecifickými vlastnosťami CP24, ale skôr účinkom na organizáciu fotosyntetických komplexov v rámci jednotlivých grán, ktoré ovplyvňujú rýchlosť transportu elektrónov (ETR) a čerpanie protónov do lúmenu tylakoidu.

PSII zelených rastlín a rias sú organizované v granálnych membránach ako veľké, dimérne superkomplexy PSII-LHCII pozostávajúce z dvoch komplexov jadra a premenlivého počtu komplexov periférnych antén obklopujúcich jadrá. Periférne komplexy zachytávajúce svetlo PSII sú zložené zo šiestich typov apoproteínov (Lhcb1 až 6) spojených s pigmentmi a lipidmi. Lhcb1 až 3 apoproteíny spolu tvoria polypeptidovú entitu LHCII, najperiférnejší a najrozšírenejší anténny komplex PSII, ktorý predstavuje približne 70 % z celkového množstva chlorofylu v PSII. Lhcb4, Lhcb5 a Lhcb6 zase tvoria polypeptidovú časť takzvaných menších periférnych komplexov zachytávania svetla, menovite CP29, CP26 a CP24, ktoré podľa všetkého sprostredkovávajú väzbu LHCII na jadro (Luciński a kol. 2006).

LHCII sa skladá z homo- aj heterotrimérnych kombinácií apoproteínov Lhcb1 až 3. Najrozsiahlejšia verzia superkomplexu PSII-LHCII s názvom $C_2S_2M_2$ (ktorá obsahuje dva triméry LHCII S a dva triméry M) je zďaleka najhojnejšia, minimálne v tylakoidných membránach *Arabidopsis thaliana*. Ukázalo sa, že triméry LHCII S obsahujú výlučne apoproteíny Lhcb1 a Lhcb2, zatiaľ čo triméry M zahŕňajú všetky tri apoproteíny LHCII. To je dôvod, prečo sú Lhcb1 a Lhcb2 oveľa hojnejšie ako Lhcb3 - spolu tvoria asi 89 % obsahu apoproteínov LHCII. Lhcb1 až 3 apoproteíny sú si navzájom veľmi podobné, takže ich primárne štruktúry poskytujú až 94 % identity pre pár Lhcb1/2 a až 80 % a 74 % identity, pokiaľ ide o páry Lhcb3/Lhcb2 a Lhcb3/Lhcb1, v závislosti od druhu (Luciński a kol. 2006).

2.4.2.1 koLhcb3 mutant

Pretože sa aminokyselinové sekvencie apoproteínov LHCII počas niekoľkých stoviek miliónov rokov vývoja rastlinnej ríše príliš nemenili, dá sa očakávať, že všetky tri apoproteíny Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3 - najmenej zastúpeného - majú jedinečný štruktúrny a funkčný význam. Ukázalo sa, že Lhcb3 nemôže byť úplne nahradený Lhcb1 a Lhcb2, pokiaľ ide o jeho príspevok k štruktúre superkomplexu PSII-LHCII, pretože časticová makroštruktúra $C_2S_2M_2$ mutantných rastlín koLhcb3, v ktorej Lhcb1 a Lhcb2 nahrádzajú chýbajúce Lhcb3 vo vnútri LHCII triméru M, sú mierne pozmenené oproti štandardom LHCII. Je to pravdepodobne spôsobené jedinečnosťou povrchovej interakcie medzi Lhcb3 a Lhcb6, ktorá spolu s Lhcb4 sprostredkováva väzbu triméru LHCII M na jadro PSII. Ďalej sa Lhcb3 líši od Lhcb1 a Lhcb2, pretože mu chýba treonínový (alebo serínový) zvyšok umiestnený blízko N-konca molekúl Lhcb1/Lhcb2. Bolo navrhnuté, že jednou jedinečnou funkciou Lhcb3 môže byť obmedzenie stavových prechodov. Tento návrh bol však vážne narušený demonštráciou, že triméry LHCII, ktoré obsahujú Lhcb3, teda triméry M, sa nezúčastňujú na stavových prechodoch, takže jedinečnosť funkcie Lhcb3 stále zostáva neuchopiteľná (Adamiec a kol. 2015).

2.4.2.2 koLhcb6 mutant

V štúdiu z roku 2008 (de Bianchi a kol. 2008) bol uvedený záver, že absencia CP24 mení organizáciu PSII a následne obmedzuje difúziu plastochinónu. Pri pestovaní v kontrolných podmienkach ($100 \mu\text{mol fotónov} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $24 \text{ }^\circ\text{C}$, 8/16 deň/noc) po dobu 3 týždňov rastliny koCP24 boli oveľa menšie ako rastliny prirodzeného genotypu (Wild type). Rastliny koCP24 sa líšili v tom, že veľké množstvo ich strómových membrán malo tupé konce, ktoré neboli zachytené v granách, a úplne im chýbali škrobové granuly. koCP24 vykázal mierne vyšší pomer PSII-jadro/Lhcb a nižší pomer PSI-LHCI/PSII-Lhcb (koCP24 = 1,26). V koCP24 bol okrem úplného nedostatku CP24 silne znížený aj LHCII komponent Lhcb3, tiež sa zistil veľmi malý nárast Lhcb1 a Lhcb2, ale pod štatistickou významnosťou. U koCP24 zmenu kooperativity PSII pravdepodobne spôsobuje zhlukovanie LHCII a/alebo reakčných centier PSII pozorovaných elektrónovým mikroskopom (EM).

Rozdiely v transmembránovom gradiente môžu byť spôsobené zmenami v kapacite transportu elektrónov (ETR). Pre testovanie tejto hypotézy bola rýchlosť ETR hodnotená *in vivo* na rastlinách pestovaných v kontrolných svetelných podmienkach. U prirodzeného genotypu sa nárast ETR závislý od svetla blížil k saturácii pri $650 \mu\text{mol fotónov} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a po tejto hodnote už nebol pozorovaný ďalší nárast. koCP24

vykázal výrazne nižšie rýchlosti ETR, tiež pri veľmi nízkej intenzite svetla. Rastliny bez CP24 nestrácajú CP29, čo naznačuje, že tento komplex je stabilizovaný priamou interakciou s jadrovým komplexom PSII (de Bianchi a kol. 2008).

V granách rastlín s prirodzeným genotypom je distribúcia tetramérnych častíc PSII homogénna po celom povrchu. Polia PSII v koCP24 sú zložené zo superkomplexov C₂S₂ pretože majú rovnakú základnú jednotku ako sa nachádza v genotype so silne redukovaným anténym systémom Lhc bez CP24 a veľkej časti trimérov LHCI. koCP24 má však plnú škálu trimérov LHCI. Graná membrány koCP24, okrem toho že majú súbory C₂S₂, obsahujú diskkrétne časti LHCI trimérov, ktoré sú rozptýlené niekoľkými komplexmi jadra PSII. Pomer LHCI/PSII jadro je silne zvýšený v niektorých oddelených oblastiach koCP24 granálnych membrán. Strata CP24 vedie k tvorbe polí C₂S₂ (de Bianchi a kol. 2008).

2.4.2.3 koLhcb3koLhcb6 mutant

Rastliny s chýbajúcimi proteínmi Lhcb3 a Lhcb6 sú novosyntetizované mutanty, ktoré boli pripravené v laboratóriách Ústavu experimentálnej botaniky Akadémie vied ČR (Ilíková nepublikované). Doposiaľ o nich nie sú známe žiadne publikácie. V minulom roku však bola obhájená bakalárska práca D. Dostálovej (Dostálová 2020) o syntetizácii týchto mutantných genotypov. Zo zistenia v práci vyplynulo, že u tohto typu mutanta dochádza k uvoľneniu alebo čiastočnému odpojeniu svetlozberných antén, čo vyvolalo nasledujúce úkazy. Netypický dvojfázový priebeh krivky NPQ, zvýšenie minimálnej fluorescence v stave adaptovanom na tmu (F₀), a tiež spomalenie elektrónového transportu (ETR) z fotosystému II. Tiež možno podotknúť, že autori práce robili aj chlorofylové stanovenie, kedy bol zistený obsah chlorofylu u tohto typu rastlín nižší než u rastlín s prirodzeným genotypom (≈ 10 %), čo môže byť následkom straty proteínov Lhcb3 a Lhcb6 viažucich molekuly chlorofylu. Tiež boli v práci publikované výsledky fenotypizácie rastlín, kedy rastliny bez Lhcb3 a Lhcb6 boli signifikantne väčšie (celková veľkosť ružice), než rastliny s prirodzeným genotypom.

3. Cieľ práce

Autor má v teoretickej časti vypracovať prehľad problematiky zameraný na zložky nefotochemického zhášania fluorescencie, štruktúru fotosyntetického aparátu a mutantné rastliny s absenciou svetlozberných komplexov. Rovnako musí zvládnuť metódu merania pulznej amplitúdovej modulácie pomocou komerčného prístroja DualPAM 100 a interpretovať získané výsledky v súvislosti s kinetikou nefotochemického zhášania. Súčasťou práce je aj naučiť sa metódu izolácie tylakoidných membrán, a vedieť separovať pigment-proteínové komplexy tylakoidných membrán pomocou natívnej gélovej polyakrylamidovej elektroforézy.

Autor práce má napestovať rastliny *Arabidopsis thaliana* prirodzeného genotypu a jeho mutantné formy s absenciou Lhcb3 a/alebo Lhcb6, a rastliny nechať aklimovať na vysokú a nízku intenzitu osvetlenia a aplikovať na ne uvedené experimentálne metódy. Výsledky má vyhodnotiť, porovnať a diskutovať v súvislosti so súčasnou literatúrou.

4. Materiál a metódy

4.1. Materiál

4.1.1 Chemikálie

Acetón (VWR chemicals, USA), akrylamid (Bio-Rad, USA), askorbát sodný (Sigma-Aldrich, Nemecko), destilovaná H₂O, glycerol (Lach-ner, ČR), hexahydrát chloridu hořečnatého (Sigma-Aldrich, USA), hovädzí sérový albumín (BSA; Sigma-Aldrich, USA), chlorid sodný (Lach-ner, ČR), kyselina sírová (Lach-ner, ČR), N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin (TEMED; Bio-Rad, USA), peroxodisíran amonný (APS; Bio-Rad, USA), sacharóza (Lach-ner, ČR), sodná soľ kyseliny ethylendiamintetraoctovej (EDTA; Sigma-Aldrich, USA), sodná soľ n-dodecyl- α -D-maltosid (Sigma-Aldrich, USA), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES; Sigma-Aldrich, Nemecko)

4.1.2 Prístrojové vybavenie

Analytické váhy (Scaltec instruments GmbH, Nemecko)
Centrifúga Eppendorf Centrifuge 5430R (Eppendorf, ČR)
Dvojlúčový spektrometer Unicam UV550 (Unicam, UK)
Elektroforetická komora Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, USA)
Fluorometer PEA (Plant Efficiency Analyser; Hansatech, UK)
Fluorescenčný a absorpčný systém Dual-PAM-100 (Walz, Nemecko)
Fotoaparát (Huawei Mate 20 Lite, Čína)
Fytoscope (PSI, Česká republika)
Homogenizátor IKA Labortechnik T25 basic (IKA, USA)
LI-250A Light Meter (LI-COR Biosciences, USA)
Peristaltická pumpa s komorou pro nalévání gradientových gelů PCD 21 (čerpadla Kouřil, ČR)
pH meter WTW inoLab 7110 (WTW, ČR)
Sada automatických pipiet (Nichipet, USA)
Skener Amersham Imager 600RGB (GE HealthCare Life Sciences, UK)
Sklá pre naliatie gélu pre elektroforézu (Sigma-Aldrich, USA)
Váhy (Sartorius, Nemecko)
Vortex mixér (Heidolph, Nemecko)
Zdroj pro elektroforézu POWERPAC 1000 (Bio-Rad, USA)

Ostatne pomôcky: substrát Potgrond H (Klasmann-Deilmann GmbH, Nemecko), kvetináče, igelitové vrecúška, pinzety, plastové mikroskúmvky (Eppendorf, Nemecko), podnosy pod kvetináče, kyvety (Hellma Analytics, Nemecko), falkóny, fólie, nožnice, nylónová sieťka s veľkosťou oka 40 μm , štetec.

4.1.3 Rastlinný materiál a podmienky pestovania

Arabidopsis thaliana – ekotyp Columbia (Col-0), označovaná v práci ako prirodzený genotyp (wild type; WT)

Arabidopsis thaliana – mutant *koLhcb3* (SALK_020314c), označovaný v práci ako 3

Arabidopsis thaliana – mutant *koLhcb6* (SALK_077953), označovaný v práci ako 6

Arabidopsis thaliana – mutant *koLhcb3koLhcb6*, ktorý vznikol skrížením mutantov

Arabidopsis thaliana koLhcb3 (SALK_020314c) a *koLhcb6* (SALK_077953) s T-DNA inzerciou v kódujúcej oblasti génu *Lhcb3*, respektíve *Lhcb6*, označovaný v práci ako 3+6.

Prvé namočenie semiačok prebehlo 7. 12. 2020, posledné namočenie prebehlo 20. 12. 2020. Semiačka boli namočené v destilovanej vode po dobu jedného dňa v ľadničke. Prvá výsadba prebehla 8. 12. 2020, posledná výsadba prebehla 21. 12. 2020. Ilustračné fotografie z prípravy výsadby a výsadby sú v časti Prílohy (Príloha 1). Pestovanie rastlín bolo štyri týždne na normálnom osvetlení (NL; 110 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), následne boli rozdelené do troch skupín. Každá zo skupín bola ďalej pestovaná dva týždne na predom špecifikovanom normálnom osvetlení (NL; 110 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 1. skupina), vysokom osvetlení (HL; 750 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 2. skupina), a nízkom osvetlení (LL; 30 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 3. skupina). Podmienky vo fytotrone boli následovné počas celej doby pestovania: jednalo sa o krátky den (8/16 h) so začiatkom osvetľovania v 7:00 a s koncom o 15:00. Teplota za svetla bola 22 °C, za tmy 20 °C. Vlhkosť bola 60 %. Presadenie rastlín do väčších kvetináčov prebehlo 3 týždne od výsadby.

4.1.4 Metódy

4.1.4.1. Spektrofotometrické stanovenie obsahu pigmentov

Spektrofotometria môže byť rozšírením ktoréhokoľvek z typov spektroskopie. Je to termín, ktorý sa vzťahuje na kvantitatívnu analýzu spektier na porovnanie relatívnej absorpcie alebo emisie rôznych vlnových dĺžok svetla. Fotometria sa používa na stanovenie absolútneho množstva alebo relatívneho množstva dvoch alebo viacerých zlúčenín alebo prvkov vo vzorke alebo v súbore vzoriek. V obidvoch prípadoch vyžaduje spektrofotometria (SP) starostlivú kalibráciu a validáciu spektroskopického systému a detektora. SP je základným prvkom mnohých forenzných porovnaní vzoriek, najmä

tých, ktoré zahŕňajú zmesi materiálov absorbujúcich svetlo, ako sú farbivá a pigmenty (Eyring a Martin 2013).

Ako vzorky pre spektrofotometrické stanovenie boli použité zamrazené lístky (jeden až štyri pre jednu vzorku), ktoré boli pred odobratím zatemnené 30 minút. Bola stanovená ich plocha a FW (fresh weight, váha „čerstvých“ listov). Vzorky boli následne zamrazené v tekutom dusíku a uchované pri -80 °C. Plocha listov sa stanovila obkreslením na priesvitnú fóliu, ktorá bola následne naskenovaná. Pomocou programu *ImageJ* bola stanovená plocha v cm². Lístky boli zo šesť-týždňových rastlín aklimovaných na silné, normálne a nízke osvetlenie *A. Thaliana*, (prírodný genotyp, *koLhcb3*, *koLhcb6* a *koLhcb3Lhcb6*). Počas celého procesu sa pracovalo pri slabom zelenom osvetlení a vzorky boli chladené na ľade. Najprv sa lístky homogenizovali pomocou tĺčka v mažiari s 80% acetómom a štipkou MgCO₃. Následne sa centrifugovali pri 4 °C, 4000 g desať minút. Následne bol zliaty supernatant do prázdnych mikroskúmaviiek pre spektrofotometrické stanovenie. Bola stanovená absorbancia vzoriek pri vlnovej dĺžke 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm a 750 nm, oproti 80% acetónu ako blanku. Vzorky boli umiestnené v kremenných kyvetách (Hellma Analytics, Nemecko). Stanovovali sme obsah *chl a*, *chl b* a karotenoidov, aj ich vzájomné pomery, to všetko stiahnuté na plochu listu. Stanovenie chlorofylov prebiehalo podľa rovníc (Lichtenthaler 1987):

$$chl_a = \frac{((12,25(A_{663,2} - A_{750}) - 2,79(A_{646,8} - A_{750})) \cdot V)}{S} \quad (1)$$

$$chl_b = \frac{((12,25(A_{656,8} - A_{750}) - 2,79(A_{663,2} - A_{750})) \cdot V)}{S} \quad (2)$$

Stanovenie karotenoidov sa počítalo podľa:

$$car = \frac{(\frac{1000 \cdot (A_{470} - A_{750}) - 1,82 \cdot (Chl a) - 85,02 \cdot (Chl b)}{198}) \cdot V}{S} \quad (3)$$

V rovniciach(1), (2) a (3) označuje *A* absorbanciu roztoku. *A*₇₅₀ je absorbancia pri 750 nm, *A*_{646,8} je absorbancia pri 646,8 nm, *A*_{663,2} je absorbancia pri 663,2 nm. *V* označuje objem vzorky v ml. *S* je plocha listov, z ktorých bol roztok pripravený v cm².

4.1.4.2. HPLC

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) je hlavným analytickým nástrojom v súčasnej vede s pravdepodobne najvyšším počtom nainštalovaných a globálne fungujúcich systémov. Moderná HPLC ponúka vysoké rozlíšenie umožňujúce kvantitatívne stanovenie cieľových analytov v komplexných maticiach vďaka svojej kompatibilite s mnohými detektormi (Gika a kol. 2016).

Metóda bola použitá na kvantifikáciu obsahu xantofylov (violaxantín, zeaxantín, neoxantín a luteín) a karoténov s použitím systému Alliance e 2695 HPLC (Waters, Milford, MA, USA) a detektormi 2998 Photodiode Array. Separácia sa uskutočňovala použitím gradientového systému ($1,5 \text{ ml min}^{-1}$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$) na LiChrospher® 100 RP-18 ($5 \text{ }\mu\text{m}$) LiChroCART® 250-4 (Merck, Darmstadt, Nemecko) s rozpúšťadlami v pomeroch acetonitril:metanol:voda. (87:10:3; v/v) a metanol:n-hexán (80:20; v/v). Kvantifikácia xantofylov bola založená na porovnaní ich absorbancie (441 nm violaxantín, 446 nm antheraxantín a 454 nm zeaxantín) so zodpovedajúcimi štandardmi od DHI Lab Products (Hørsholm, Dánsko).

Daná technika nám slúžila ako doplnenie k spektrofotometrickému stanoveniu chlorofylov. Priamo sme techniku nevykonávali. Za samotnú analýzu by sme týmto chceli poďakovať doc. Pavlovi Pospíšilovi z katedry Biofyziky Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

4.1.4.3. Veľmi rýchla fluorescenčná indukcia

Fluorometer PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech) meria fluorescenčné signály chlorofylu emitované zo zelených rastlín. Výhodou fluorometra PEA je jeho kompaktnosť, cenová dostupnosť a možnosť použitia aj v poľných podmienkach. Jedná sa o rýchlu nedeštruktívnu metódu poskytujúcu komplexné informácie o stave fotosyntetického aparátu vzorky. Merania indukcie fluorescencie sa uskutočňuje za použitia na tmu adaptovaných, neporušených listov, ihličia alebo iných vzoriek vrátane mikrorias a makrorias pomocou samostatného príslušenstva ("Hansatech Instruments" 10. 1. 2021).

Meranie na prístroji prebiehalo na vzorke 13 až 15 rastlín pre každý typ a pre každé svetlo. Meralo sa za slabého zeleného svetla na neoddelených listoch predtým 30 minút zatemnených, po dobu 10 sekúnd na $4400 \text{ }\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intenzite aplikovaného saturačného pulzu. Pre spracovanie výsledkov slúžil program Biolyzer a WinPEA. Analyzované parametre možno nájsť v tabuľke (Tabuľka 1).

Tabuľka 1: Parametre veľmi rýchlej fluorescenčnej indukcie chlorofylu. Parametre sú uvedené v takej podobe, ktorá bola využitá v práci spoločne s ich výpočtom a popisom (prevzaté od Stirbet a kol. 2018).

Parameter	Popis parametra
F_0	Minimálna fluorescencia v stave adaptovanom na tmu
F_m	Maximálna fluorescencia v stave adaptovanom na tmu
$F_V/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$	Maximálny kvantový výťažok fotochémie PSII v stave adaptovanom na tmu
$F_{300 \mu s}$	Intenzita fluorescencie v čase 300 μs
$dV/dt_0 = \frac{F_{300 \mu s} - F_0}{F_m - F_0} \cdot \frac{1}{0,25}$	Relatívna rýchlosť fotochémie
M_0	Počiatočný sklon (v ms^{-1}) nábehu O-J fluorescencie
V_J	Relatívna variabilná fluorescencia v bode J (O-J-I-P)
$TR_0/RC = M_0/V_J$	Maximálny zachytený tok excitónov na aktívny PSII

4.1.4.4. Princíp pulznej amplitúdovej modulačnej techniky

Technika využíva fluorometre, ktoré môžu využívať rozdielne prístupy na zachytávanie fluorescencie. Využíva sa princípu troch svetiel: aktinické, meracie a saturačné pulzy. Záblesky meracieho svetla sú veľmi krátke. V prípade potreby sú meracie záblesky aplikované s nízkou frekvenciou, čo vedie k nízkej integrovanej intenzite budiaceho svetla týchto meracích zábleskov. Počas každého záblesku merania je fluorescenčný signál detegovaný detektorom s rýchlou odozvou a veľkým rozsahom linearity. Detektorom sa rozumie fotodióda. Prvá funkcia je nevyhnutná kvôli schopnosti detegovať rýchle zmeny vo fluorescenčnom signáli a druhá vlastnosť je nevyhnutná, pretože fluorescenčný signál je detegovaný aj niekoľko mikrosekúnd po meracom záblesku. Tento prístup k meraniu sa bežne nazýva pulzná amplitúdová modulácia (PAM) (Schreiber 2004). Popis jednotlivých analyzovaných parametrov a pomocných parametrov je v tabuľke (Tabuľka 2).

Tabuľka 2: Parametre pulznej amplitúdovej modulácie popisujúce stav fotosystému I a II. Parametre sú uvedené v takej podobe, ktorá bola využitá v práci spoločne s ich výpočtom a popisom (prevzaté od Schrieber 2011, Ruban 2016, Waltz cit.31. 1. 2021)

Parameter	Popis parametra
$Y(II) = (F_m' - F) / F_m'$	Efektívny kvantový výťažok fotochémiie PSII
$Y(I) = 1 - Y(ND) - Y(NA)$	Efektívny kvantový výťažok fotochémiie PSI
$ETR(II) = 0,5 \cdot 0,84 \cdot PPFD \cdot \Phi_{PSII}$	Relatívna miera rýchlosti elektrónového transportu (rýchlosť nábojovej separácie v reakčných centrách PSII)
$ETR(I) = 0,5 \cdot 0,84 \cdot PPFD \cdot \Phi_{PSI}$	Relatívna miera rýchlosti elektrónového transportu (rýchlosť nábojovej separácie v reakčných centrách PSI)
$Y(ND) = 1 - P700 \text{ red}$	Nefotochemický kvantový výťažok PSI spôsobený limitáciami na donorovej strane
$Y(NA) = (P_m - P_m') / P_m$	Nefotochemický kvantový výťažok PSI spôsobený limitáciami na akceptorovej strane
$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$	Nefotochemické zhášanie chlorofylovej fluorescence
$qP = (F_m' - F) / (F_m' - F_0)$	Koeficient fotochemického zhášania
F_m'	Maximálna fluorescence pre stav adaptovaný na svetlo
P_m	Maximálna zmena signálu P700 po kvantitatívnej transformácii P700 z úplne redukovaného do úplne oxidovaného stavu
P_m'	Maximálna zmena signálu P700 v danom svetelnom stave po aplikácii saturačného impulzu
P700 red	Zlomok celkového P700, ktorý je redukovaný v danom stave
PPFD	Hustota fotosynteticky aktívnych fotónov
Φ_{PSII}	Maximálny (alebo potenciálny) kvantový výťažok fotochémiie PSII pre stav adaptovaný na svetlo
Φ_{PSI}	Maximálny (alebo potenciálny) kvantový výťažok fotochémiie PSI pre stav adaptovaný na svetlo

Pre účely merania je použitý prístroj Dual-PAM 100, od výrobcu Waltz. Merací systém Dual-PAM 100 robí paralelné zaznamenávanie aktivít fotosystému II a fotosystému I zároveň. Dual-PAM 100 má v podstate obidve vlastnosti vysoko výkonného chlorofylového fluorometra PAM a spektrometra s dvojitou vlnovou dĺžkou absorpcie. Informácie získané meraním chlorofylovej fluorescence charakterizujú stav PSII a zmeny oxidačného stavu P700 nám poskytujú informácie o PSI (“Waltz - Germany” 10. 1. 2021).

Meranie na prístroji prebiehalo nasledovne. Bolo vybratých 5 rastlín z každého typu pre každý druh osvetlenia, ktoré boli šesť týždňov staré. Rastlina bola pred samotným meraním 30 minút zatemnená. Meranie prebiehalo na oddelenom liste umiestnenom špičkou stonky po oddelení do kvapky destilovanej vody, a následne vsunutý do meracej časti prístroja adaxiálnou stranou smerom k detektoru. Merací protokol trval 31 minút a celé meranie prebiehalo za slabého zeleného svetla.

Fluorescencia PSII a redoxné zmeny P700 sa zaznamenávali súčasne za pomoci meracieho systému Dual-PAM 100 (Heinz Walz, Effeltrich, Nemecko) počas indukcie nefotochemického zhášania (NPQ) pod červeným aktinickým svetlom ($800 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 15 minút. Takisto sa zaznamenávala aj jeho relaxácia v tme rovnako 15 minút s použitím 300 ms saturujúcich impulzov červeného svetla ($10\,000 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

4.1.4.5. Izolácia tylakoidných membrán

Listy rastlín sa homogenizujú v homogenizačnom bufferi A. Vzniknutý homogenát sa následne prefiltruje cez 2 vrstvy nylónovej sieťky. Pri homogenizácii je používaný buffer s vysokou koncentráciou sacharózy a NaCl. Vysoké koncentrácie týchto látok zaisťujú tzv. izotonické prostredie, ktoré je svojou iónovou a osmotickou silou podobné vnútornému prostrediu buniek a teda sú chloroplasty chránené pred popraskaním.

Pokiaľ sú následne vyizolované chloroplasty prenesené do bufferu s nízkou koncentráciou sacharózy a NaCl, dôjde u nich vplyvom osmotického tlaku k nasatiu vody a k ich prasknutiu. Vďaka prasknutiu vonkajšej chloroplastovej membrány tak dôjde k uvoľneniu tylakoidných membrán do prostredia bufferu. U suspenzií chloroplastov a tylakoidných membrán sa meria koncentrácia chlorofylu *a* a *b*. Pre toto stanovenie sa používalo spektroskopické meranie v 80% acetóne a pre prepočet koncentrácie boli použité Lichtenthalerove rovnice (Lichtenthaler 1987):

$$chl_a = 12,25(A_{663,2} - A_{750}) - 2,79(A_{646,8} - A_{750}) \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \quad (4)$$

$$chl_b = 21,5(A_{646,8} - A_{750}) - 5,1(A_{663,2} - A_{750}) \frac{\mu g}{ml} \quad (5)$$

V rovniciach A označuje absorbanciu roztoku. A_{750} je absorbanca pri 750 nm, $A_{646,8}$ je absorbanca pri 646,8 nm, $A_{663,2}$ je absorbanca pri 663,6 nm.

Počas celého experimentu sa pracovalo pri slabom zelenom svetle v temnom laboratóriu, chemikálie ako aj vzorky boli chladené počas celej doby na ľade. Pre potreby merania boli vytvorené tri buffre A, B a C o nasledujúcom zložení:

Buffer A: 35mM HEPES, pH 7.2, 400mM sacharóza, 400mM NaCl, 4mM MgCl₂, 5mM askorbát sodný, 2 mg·ml⁻¹ BSA

Buffer B: 25mM HEPES, pH 7.5, 150mM NaCl, 8mM MgCl₂, 1mM EDTA

Buffer C: 50mM HEPES, pH 7.2, 400mM sacharóza, 15mM NaCl, 5mM MgCl₂

Homogenizácia bola prevádzaná v bufferi A, v troch 15 sekundových cykloch pri 13000 otáčkach za minútu pri spustení homogenizátoru. Centrifúga bola počas celého experimentu chladená na 4 °C. Centrifugácia bežala v prípade prvého cyklu 6 minút na 5000 g. Následne bol pelet resuspendovaný v bufferi B a prebehla ďalšia centrifugácia (10 minút) pri 5000 g a pelet sa resuspendoval v bufferi C. Posledný centrifugačný cyklus bežal 5 minút na 5000 g a pelet bol resuspendovaný v bufferi C. Vzorky tylakoidných membrán boli rozdelené na alikvóty, zamrazené v tekutom dusíku a uchovávané pri - 80 °C.

4.1.4.6. Elektroforéza

Elektroforéza je separačná metóda, ktorá je založená na migrácii nabitých častíc v nosnom médiu (kvapalina alebo hydrofilný gél) pod vplyvom elektrického poľa. Schopnosť elektroforézy separovať nabité častice sa pohybuje od malých anorganických alebo organických iónov po nabité biopolyméry (ako DNA alebo proteíny) alebo dokonca chromozómy, mikroorganizmy alebo celé bunky (Gas 2005).

Po nachystaní „ľahkého“ a „ťažkého“ roztoku do falkón, chemikálii TEMED a APS, a prípravy elektroforetickej aparatury bol spustený proces nalievania gélov. V našom prípade bol použitý hrebienok na 10 jamiek. Gély tuhli v chladenej miestnosti 24 hodín. Roztoky boli nachystané nasledovne:

Ľahký gél: 1,65mM gél buffer, 7,5mM H₂O, 8μM arkylamid

Ťažký gél: 2mM glycerol, 1,6mM gél buffer, 4mM H₂O, 16μM arkylamid

Gél buffer (pH 7.0): 3M aminokaprónová kyselina (ACA), 0,3M Bis-Tris/HCl

Pre Clear-native PAGE sa vzorky o 10 μg a 5 μg chlorofylu solubilizovali s n-dodecyl- α-D-maltozidom s použitím hmotnostného pomeru detergent/chlorofyl 15 a doplnili sa vzorkovým bufferom (50mM HEPES, pH 7,2, 0,4M sacharóza,

5mM MgCl₂, 15mM NaCl, 10% glycerol) na konečný objem 30 µl a v druhom prípade 40 µl. Vzorky boli následne centrifugované pri 20000 g pri 4 °C 10 minút, aby sa odstránili nesolubilizovaný biologický materiál. Supernatant bol nanesený na polyakrylamidový gél s gradientom 4 až 8 %. Elektroforetická separácia sa uskutočňovala v systéme Bio-Rad Mini protean tetra cell (Bio-Rad), pričom sa začalo s konštantným prúdom 3,5 mA po dobu 15 minút a potom sa pokračovalo s konštantným prúdom 7 mA, kým sa predná časť nedostala k spodnej časti gélu. Obrázkový záznam gélu bol vytvorený pomocou gélového skenera Amersham Imager 600RGB (GE HealthCare Life Sciences). Na vizualizáciu všetkých pásiem bol použitý režim prenosu pomocou osvetlenia bielym svetlom a fluorescenčný režim na rozlíšenie medzi pásmami obsahujúcimi PSI a PSII (excitačná vlnová dĺžka 460 nm, pásmový filter so stupnicou od 690 do 720 nm).

4.1.5 Softwary pre spracovanie výsledkov

Microsoft Excel (MS Office, USA)

ImageJ (online)

Origin (OriginLab Corporation, USA)

BioLyzer (Fluormetrics software, Švajčiarsko)

WinPEA (Hansatech Instruments, UK)

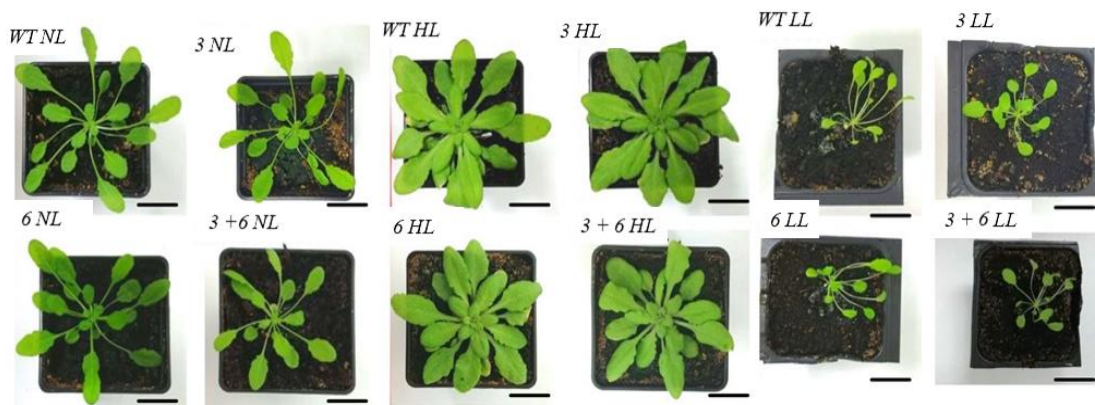
VisionPro (Fisher Scientific)

4.1.6 Štatistická analýza dát

Štatistická analýza dát prebehla cez software Origin. Na daných dátach bola vykonaná štatistická analýza, typ ANOVA, s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ pričom bol použitý test podľa Bonferroniho.

8. Výsledky

Rastliny prirodzeného genotypu spolu s *koLhcb3*, *koLhcb6* a *koLhcb3koLhcb6* boli po šiestich týždňoch rastu podrobené fyziologickej charakterizácii (Obr. 10). Možno si všimnúť značné rozdiely medzi jednotlivými skupinami rastúcimi na rôznych intenzitách osvetlenia, ako aj rozdielmi medzi genotypmi samotnými. Rastliny rastúce na normálnom svetle sa vyznačovali dlhými stredne hrubými stonkami a stredne veľkou plochou listov. Ružica bola prízemná s ťahajúcimi sa listami. Vzorky rastúce na vysokom osvetlení sa vyznačovali krátkymi hrubými stonkami a najväčšími listami zo všetkých skupín. Listy boli rovnako najhrubšie v skupine rastúcej na vysokom osvetlení zo všetkých skupín. Ružica bola usadlá a košatá s rozloženými listami. Tretia skupina rastúca na nízkom osvetlení mala tenké, dlhé stopky s drobnými, jemnými lístkami. Ružica bola malá s výrazne ťahajúcimi sa stonkami. Čo sa týka veľkosti jednotlivých genotypov, najväčšie fyziologické zmeny vykazovali rastliny *koLhcb6* a *koLhcb3koLhcb6*, ktoré boli výrazne menšie než ostatné rastliny s rozdielnym genotypom. Táto zmena sa najviac prejavila na vysokom osvetlení, no bola pozorovaná aj pri vzorkách zo skupiny aklimovanej na nízke osvetlenie. Prekvapením boli *koLhcb3*, ktoré boli podobne veľké ako rastliny prirodzeného genotypu.



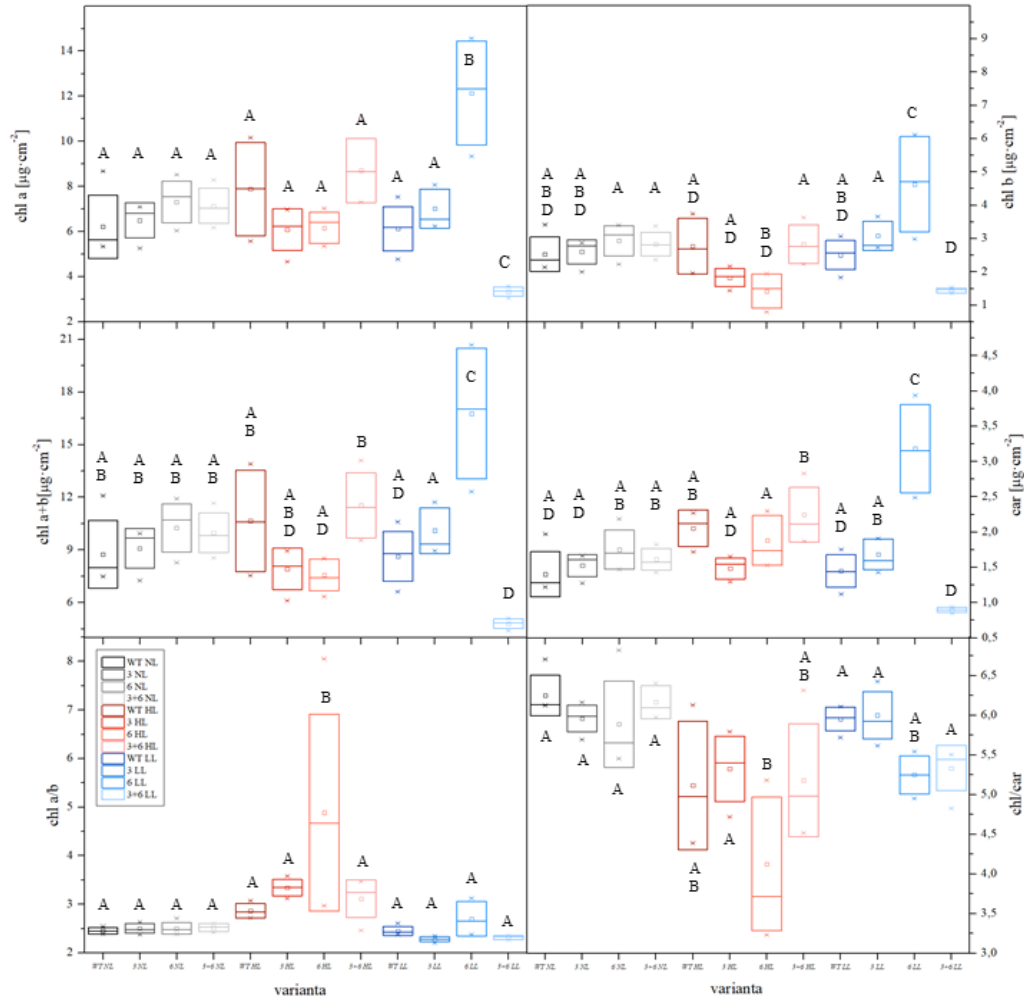
Obr. 10: Fotodokumentácia reprezentatívnych rastlín v šiestom týždni ontogenéze, ktoré boli využívané na fyziologickú charakterizáciu. Na obrázkoch možno vidieť šesťtýždňové rastliny *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a jej mutanty s chýbajúcimi Lhcb (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Pestovanie rastlín bolo štyri týždne na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), potom dva týždne na predom špecifikovanom vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a pokračovalo sa aj v normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Snímky boli vyhotovené fotoaparátom Huawei Mate Lite 20. Mierka je 3 cm.

8.1 Analýza pigmentov

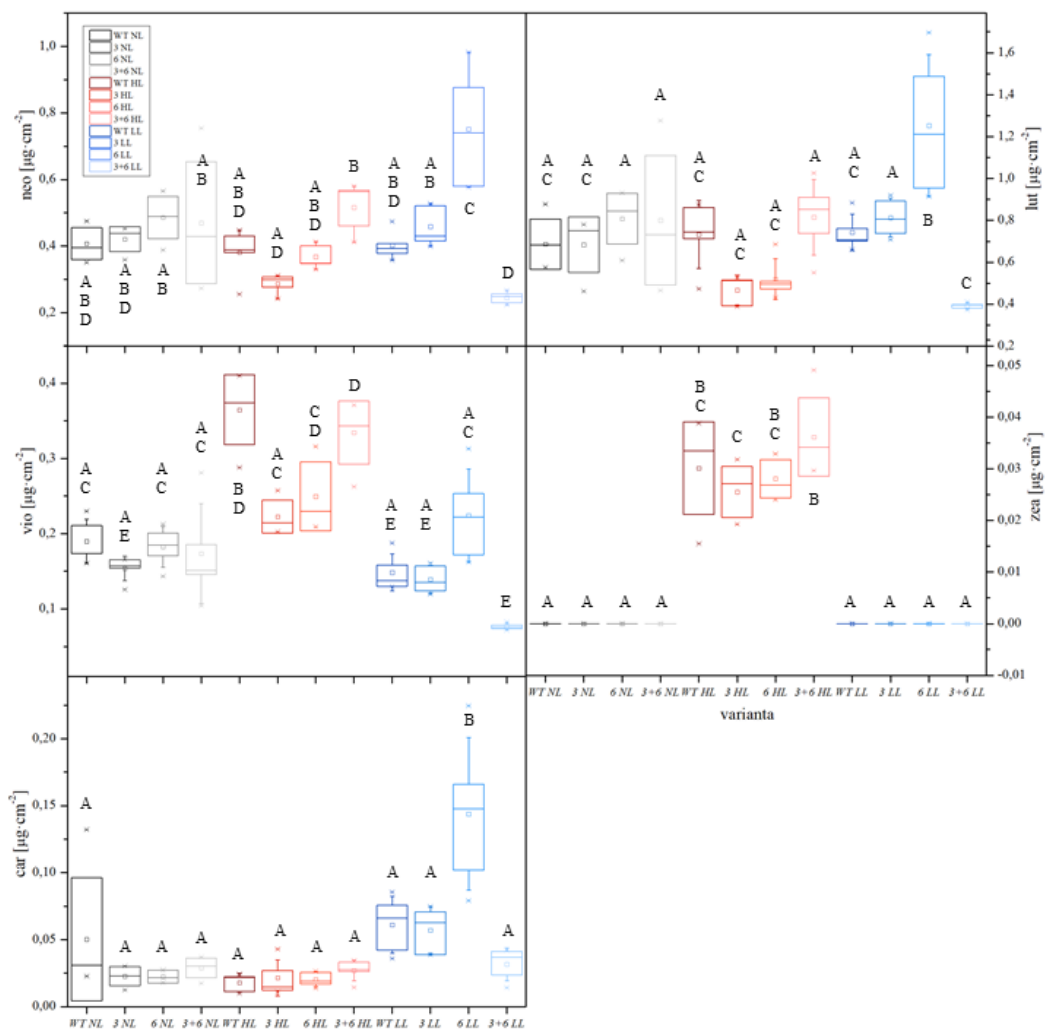
Analýza vzoriek prebehla pomocou spektrofotometrickej analýzy (Obr. 11) a tiež pomocou HPLC (Obr. 12). Na daných dátach bola vykonaná štatistická analýza, typ ANOVA, s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ pričom bol použitý test podľa Bonferroniho.

V prípade výsledkov zo spektrofotometrickej analýzy boli skúmané obsahy chlorofylov *a* a *b*, karotenoidov, súčet obsahov chlorofylov *a* a *b*, pomery chlorofylov *a* ku *b* k sebe aj obsahy karotenoidov ku chlorofylom (Obr. 11).

Pri skupine rastlín aklimovanej na normálne osvetlenie boli tieto veličiny zhruba podobné a jednotlivé typy sa držali pri sebe. Hodnoty obsahu chlorofylu *a* vzťahnutého na plochu listusa pohyboval medzi 5 až 8,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Pri chlorofyle *b* to bolo od 2 po 3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. To isté možno tvrdiť aj o skupine rastlín aklimovanej na vysoké osvetlenie (chl *b*: 5 až 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), no vyskytuje sa tu zvláštnosť v podobe rozdelenia skupiny na dve podskupiny, majú podobný obsah pigmentov a to je prirodzený genotyp s mutantným genotypom *kolhcb3kolhcb6*, dosahujúce hodnôt od 6 po 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a mutantné genotypy *kolhcb3* a *kolhcb6* s rozmedzím hodnôt 5 až 7 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, bez štatisticky významných rozdielov u chlorofylu *a*. U obsahu chlorofylu *b* sa vyskytol štatisticky významný rozdiel pri *kolhcb6*. Jeho hodnota sa pohybuje najnižšie z celej vzorky rastlín testovanej pre daný pigment a to od 0,5 po 2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Zvyšné rastliny aklimované na vysoké osvetlenie vykazovali hodnoty obsahu chlorofylu približne od 1,5 po 3,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Skupina rastlín aklimovaná na nízke osvetlenie prekvapila výraznými štatistickými rozdielmi, najmä medzi *kolhcb6* ($\approx 10 - 14 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ chl *a*; $\approx 3 - 6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ chl *b*) a *kolhcb3kolhcb6* ($\approx 2,5 - 3,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ chl *a*; $\approx 1,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ chl *b*). Pri analýze obsahu karotenoidov na plochu nastalo mierne stúpanie hodnôt od rastlín NL ($\approx 1 - 2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ car) po rastliny HL ($\approx 1,25 - 2,25 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ car). Skok nastal opäť u rastlín LL medzi *kolhcb6* ($\approx 2,5 - 3,75 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ car) a *kolhcb3kolhcb6* ($\approx 0,5 - 1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ car). Avšak pri analýzach pomerov chl *a* ku chl *b*, a chls ku car mutant *kolhcb6* aklimovaný na vysoké osvetlenie výrazne prekvapil. Pri analýze pomeru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* bol práve tento pomer najvyšší u tohto mutantu ($\approx 2,75 - 7$) a to štatisticky významne, v prípade analýzy pomerov celkového obsahu chlorofylov ku karotenoidom bol naopak pomer tohto mutantu najnižší ($\approx 3,25 - 5$), opäť štatisticky významne. Celkovo možno tvrdiť, že skupina aklimovaná na vysoké osvetlenie dosahovala v pomere chl/car najnižšie hodnoty ($\approx 3,25 - 6$).



Obr. 11: Výsledný obsah pigmentov a ich pomerov v grafoch. Obsahy chlorofylu a (chl a), chlorofylu b (chl b) a karotenoidov (car) vztiahnuté na plochu listu. Ďalej tu figuruje obsah chlorofylu a a chlorofylu b (chl a+b), pomer obsahov chlorofylov a ku b (chl a/b) a tiež aj pomer obsahov chlorofylov ku obsahu karotenoidov (chl/car). Analýza týchto veličín bola spravená na oddelených listoch zatemnených šesťtýždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi Lhcb (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NL), potom potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: Prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote $22 \text{ }^\circ\text{C}$ a 16 hodinový nočný režim pri teplote $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Vlhkosť bola 60 %. Čiara predeľujúca box znázorňuje medián. Štvorec v boxe znázorňuje hodnotu aritmetického priemeru. Veľkosť boxu zdola ohraničuje hodnota prvého kvartilu, zhora zas tretieho kvartilu. Krížiky nad a pod boxami znázorňujú maximálnu a minimálnu hodnotu zo súboru. Vzorka pozostávala z 1-5 listov daného typu rastliny a boli podrobené spektrofotometrickej analýze. Počet vzoriek $n = 5$. Na daných dátach bola vykonaná štatistická analýza, typ ANOVA, s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ pričom bol použitý test podľa Bonferroniho. Písmená nad jednotlivými boxami v grafe predstavujú štatisticky významné rozdiely. Rovnaké skupiny sú označené rovnakými písmenami.



Obr. 12: Výsledný obsah pigmentov a ich pomerov v grafoch. Obsahy neoxantínu (neo), luteínu (lut), obsah violaxantínu (vio), obsah zeaxantínu (zea) a obsah karotenov (car) vziaťhnuté na plochu listov. Analýza týchto veličín bola spravená na oddelených listoch zatemnených šesťtýždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi Lhcb (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NL), potom potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: Prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote 22°C a 16 hodinový nočný režim pri teplote 20°C . Vlhkosť bola 60 %. Analýza vzoriek prebehla pomocou HPLC. Čiara predeľujúca box znázorňuje medián. Štvorec v boxe znázorňuje hodnotu aritmetického priemeru. Veľkosť boxu zdola ohraničuje hodnota prvého kvartilu, zhora zas tretieho kvartilu. Križičky nad a pod boxami znázorňujú maximálnu a minimálnu hodnotu zo súboru. Počet vzoriek $n = 5$. Na daných dátach bola vykonaná štatistická analýza, typ ANOVA, s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ pričom bol použitý test podľa Bonferroniho. Písmená nad jednotlivými boxami v grafe predstavujú štatisticky významné rozdiely. Rovnaké skupiny sú označené rovnakými písmenami.

V prípade analýzy pomocou HPLC sa zisťovali obsahy neoxantínu, luteínu, violaxantínu, zeaxantínu a karoténov vzťahnuté na plochu. Môžeme tu vidieť podobnosti s predošlou analýzou (Obr. 12).

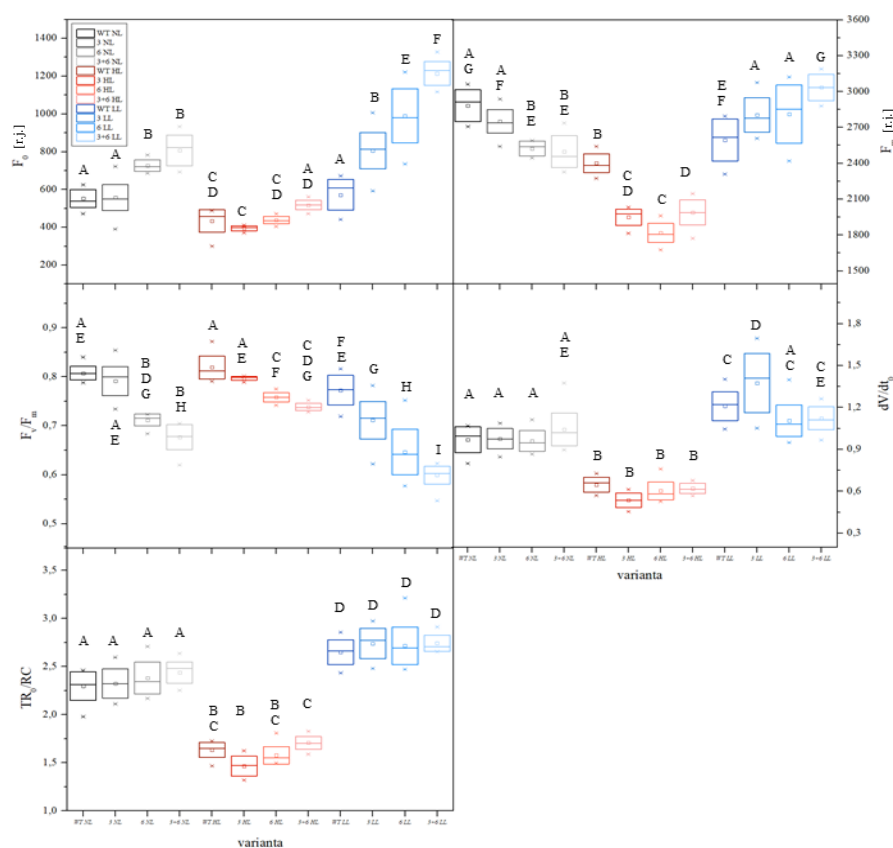
Pre obsahy neoxantínu vykazovali významné štatistické odchýlky mutanty *kolhcb6* aklimované na nízke osvetlenie ($\approx 0,6 - 1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ neo), ktorého obsah neoxantínu bol najvyšší, a *kolhcb3kolhcb6* aklimované na nízke osvetlenie ($\approx 0,2 - 0,4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ neo), ktorého obsah neoxantínu bol najnižší. Tento záver možno uplatniť aj na výsledky z analýzy obsahu luteínu (*kolhcb6* LL $\approx 0,9 - 1,7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ lut; *kolhcb3kolhcb6* LL $\approx 0,4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ lut) a karoténov (*kolhcb6* LL $\approx 0,075 - 0,225 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ car; *kolhcb3kolhcb6* LL $\approx 0,025 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ car). Zaujímavé zistenia prišli aj s analýzou obsahu violaxantínu, kedy skupina rastlín aklimovaná na vysoké osvetlenie mala obsahy tohto pigmentu štatisticky významne vysoké (WT HL $\approx 0,3 - 0,4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ vio; *kolhcb3kolhcb6* $\approx 0,25 - 0,4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ vio), opačne, najnižší obsah pigmentu bol u *kolhcb3kolhcb6* aklimovaného na nízke osvetlenie ($\approx 0,075 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ vio). Pri analýze obsahu zeaxantínu boli hodnoty pri rastlinách aklimovaných na nízke a normálne osvetlenie nulové, jediná skupina vykazujúca obsah zeaxantínu bola skupina aklimovaná na vysoké osvetlenie ($\approx 0,015 - 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ zea).

8.2 Veľmi rýchla fluorescenčná indukcia chlorofylu *a*

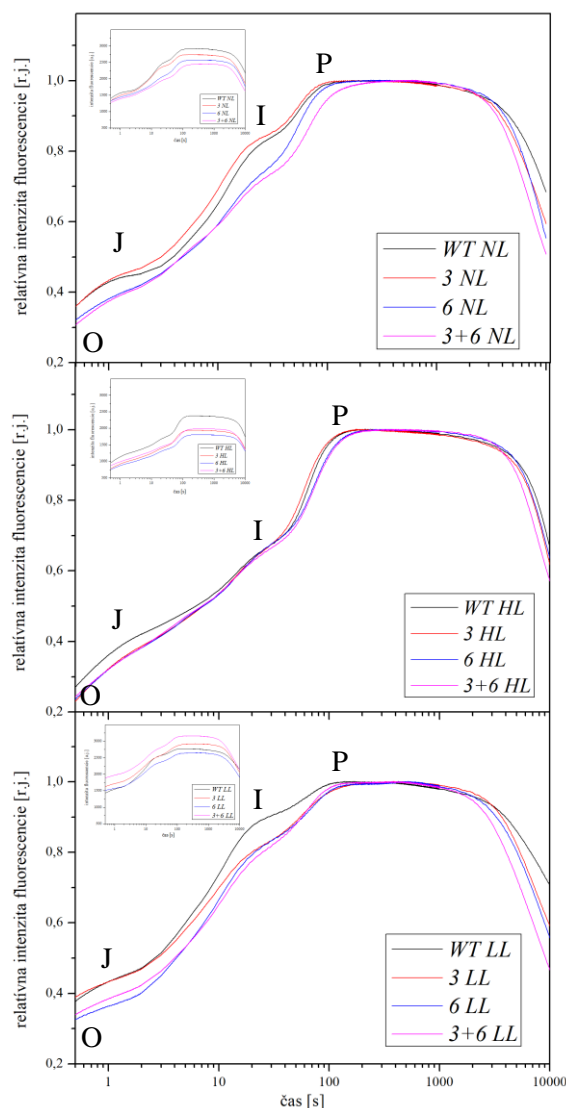
Analyzované boli parametre minimálna fluorescencia v stave adaptovanom na tmu (F_0), maximálna fluorescencia v stave adaptovanom na tmu (F_m), maximálny kvantový výťažok fotochémie PSII v stave adaptovanom na tmu (F_v/F_m), relatívna rýchlosť fotochémie (dF/dt_0) a maximálny zachytený tok excitónov na aktívny PSII (TR_0/RC) (Obr. 13) a priebeh O-J-I-P kriviek (Obr. 14). Vzorka pozostávala z 10-15 neoddelených listov daného typu rastliny, ktoré boli zmerané pomocou fluorometra PEA. Vyhodnotenie prebehlo pomocou programu Biolyzer a WinPea.

Pri analýze minimálnej fluorescencie v stave adaptovanom na tmu (F_0) sa opakoval pri každej skupine rastlín trend postupného nárastu hodnôt a to od prirodzeného genotypu, následne *kolhcb3* a *kolhcb6*, po *kolhcb3kolhcb6* (Obr. 13). V prípade rastlín aklimovaných na nízke osvetlenie sú štatisticky významné rozdiely dokonca medzi genotypmi samotnými a tiež práve táto skupina dosahuje najvyššie hodnoty F_0 (LL: WT $\approx 400 - 600$ r.j.; *kolhcb3* $\approx 500 - 900$ r.j.; *kolhcb6* $\approx 700 - 1200$ r.j.; *kolhcb3kolhcb6* $\approx 1100 - 1300$ r.j.).

Hodnoty maximálnej fluorescence v stave adaptovanom na tmu (F_m) vykazovali v prípade rastlín aklimovaných na nízke osvetlenie rovnaký trend ako to bolo v prípade F_0 (Obr. 13). U rastlín aklimovaných na normálne osvetlenie a u rastlín aklimovaných na



Obr. 13: Vybrané parametre veľmi rýchlej fluorescenčnej indukcie chlorofylu a. V grafoch sú zahrnuté minimálna fluorescencia v stave adaptovanom na tmu (F_0), maximálna fluorescencia v stave adaptovanom na tmu (F_m), maximálny kvantový výťažok fotochémiie PSII v stave adaptovanom na tmu (F_v/F_m), relatívna rýchlosť fotochémiie (dF/dt_0) a maximálny zachytený tok excitónov na aktívny PSII (TR_0/RC). Analýza týchto veličín bola spravená na neoddelených listoch zatemnených šesťtýždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi *Lhcb* (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NL), potom potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote 22°C a 16 hodinový nočný režim pri teplote 20°C . Vlhkosť bola 60 %. Vzorka pozostávala z 10-15 neoddelených listov daného typu rastliny. Veľmi rýchla fluorescenčná indukcia bola zaznamenaná pomocou fluormetra PEA. Saturačný pulz mal intenzitu $4400 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a bol aplikovaný po dobu 10 s. Vyhodnotenie prebehlo pomocou programu Biolyzer a WinPea.. Čiara predeľujúca box znázorňuje medián. Štvorec v boxe znázorňuje hodnotu aritmetického priemeru. Veľkosť boxu zdola ohraničuje hodnota prvého kvartilu, zhora zas tretieho kvartilu. Križičky nad a pod boxami znázorňujú maximálnu a minimálnu hodnotu zo súboru. Na daných dátach bola vykonaná štatistická analýza, typ ANOVA, s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ pričom bol použitý test podľa Bonferroniho. Písmená nad jednotlivými boxami v grafe predstavujú štatisticky významné rozdiely. Rovnaké skupiny sú označené rovnakými písmenami.



Obr. 14: Vyhodnotené normované O-J-I-P krivky popisujúce relatívnu intenzitu fluorescencie a O-J-I-P krivky popisujúce intenzitu fluorescencie pre daný typ osvetlenia, na ktorom bola vzorka pestovaná. Nenormované krivky sú v grafoch vľavo hore vo forme inletov. Analýza týchto veličín bola spravená na neoddelených listoch zatemených šesťtýždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi Lhcb (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NL), potom potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: Prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote 22°C a 16 hodinový nočný režim pri teplote 20°C . Vlhkosť bola 60 %. Vzorka pozostávala z 10-15 neoddelených listov daného typu rastliny. Veľmi rýchla fluorescenčná indukcia bola zaznamenaná pomocou fluormetra PEA. Saturačný pulz mal intenzitu $4400 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a bol aplikovaný po dobu 10 s. Vyhodnotenie prebehlo pomocou programu Biolyzer a WinPea. Pre intenzitu fluorescencie bola vždy vybratá jedna reprezentatívna krivka zo súboru, pre relatívnu intenzitu fluorescencie bola normovaná OJIP krivka vytvorená z danej vybratej reprezentatívnej krivky.

vysoké osvetlenie sa však tento trend zmenil (HL: WT $\approx 2250 - 2550$ r.j.;

kolhcb3 \approx 1800 – 2100 r.j.; *kolhcb6* \approx 1650 – 1950 r.j.; *kolhcb3kolhcb6* \approx 1750 – 2100 r.j.), v prípade prirodzeného genotypu so štatistickou významnosťou oproti *kolhcb3*, *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6*. Čo sa týka hodnôt F_m rastlín aklimovaných na nízke osvetlenie, jednalo sa o nárast hodnôt (Obr. 13).

Hodnoty maximálneho kvantového výťažku fotochémiie PSII v stave adaptovanom na tmu (F_v/F_m) ukazujúceho vitalitu rastlín, sa ukázal trend klesajúcich hodnôt F_v/F_m od prirodzeného genotypu cez *kolhcb3* a *kolhcb6* po *kolhcb3kolhcb6* opäť so štatistickou významnosťou (Obr. 13). V prípade NL skupiny sa jednalo o pokles medzi hodnotami približne od 0,85 po 0,65, u HL rastlín približne od 0,875 po 0,75 a u LL v rozmedzí približne od 0,8 po 0,55, pričom každý pokles bol so štatisticky významným rozdielom. Je teda možné povedať, že najvýraznejší pokles efektivity fotochemických procesov PSII nastal u LL skupiny, najmenej výrazný zas u rastlín aklimovaných na vysoké osvetlenie.

V prípade analýzy relatívnej rýchlosti fotochémiie (dV/dt_0) je viditeľné držanie sa jednotlivých skupín aklimovaných na rôzne osvetlenie pri sebe (NL \approx 0,9 – 1,35; HL \approx 0,45 – 0,75; LL \approx 0,9 – 1,65) (Obr. 13).

Rovnaké závery, aké boli vyvedené pri dV/dt_0 boli aj pri analýze maximálneho zachyteného toku excitónov na aktívny PSII (TR_0/RC) (Obr. 13).

Pre účely práce bola vytvorená aj analýza O-J-I-P kriviek, ktoré sú typické pre priebeh veľmi rýchlej fluorescenčnej indukcie chlorofylu *a* (Obr. 14). Pre obrazovú prezentáciu kriviek bola vybraná vždy jedna reprezentatívna krivka zo súboru dát pre každú variantu vzorky.

Pri analýze krivky pre NL skupinu je výrazný rozdiel medzi podobami priebehu O-J-I-P u rastlín prirodzeného genotypu s rastlinami mutaného genotypu *kolhcb3* oproti rastlinám mutantných genotypov *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6* (Obr. 14). Tento jav sa už neprejavil pri rastlinách aklimovaných na vysoké a nízke osvetlenie. Avšak pri HL je badateľný rýchlejší nábeh fluorescencie než u rastlín aklimovaných na normálne osvetlenie. Opačne pomalší nábeh fluorescencie vidno pri skupine LL oproti rastlinám NL.

8.3 Výsledky pulznej amplitúdovej modulácie

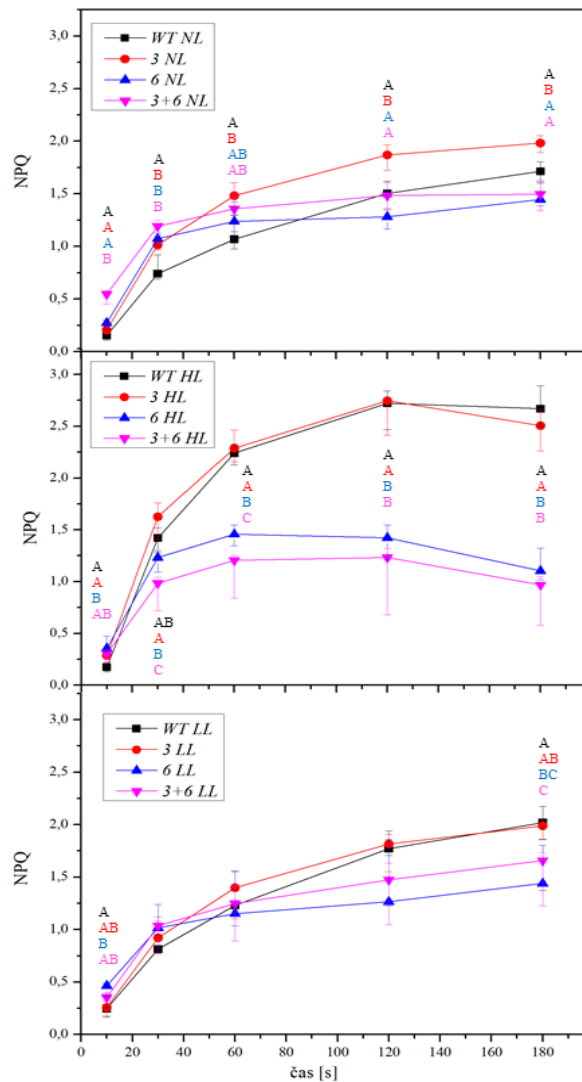
V tejto časti sú analyzované priebehy nefotochemického zhášania (NPQ) v čase (Obr. 15), relatívnej miery rýchlosti elektrónového transportu PSI (rýchlosť nábojovej separácie v reakčných centrách PSI) (ETRI) v čase a priebeh relatívnej miery rýchlosti elektrónového transportu PSII (rýchlosť nábojovej separácie v reakčných centrách PSII)

(ETR_{II}) v čase (Obr 16), priebeh efektívneho kvantového výťažku fotochémiie PSII (Y_{II}) a PSI (Y_I) v čase (Obr. 17) a nefotochemického kvantového výťažku PSI spôsobeného limitáciami na donorovej strane v čase (Y_{ND}) a priebeh nefotochemického kvantového výťažku PSI spôsobeného limitáciami na akceptorovej strane v čase (Y_{NA}) (Obr. 18). V hlavnej časti práce sú uvedené len približené prvé 3 minúty priebehu, okrem priebehu NPQ (Obr. 19), ostatné celé grafy možno nájsť v sekcii Prílohy (Príloha 2, Príloha 3, Príloha 4).

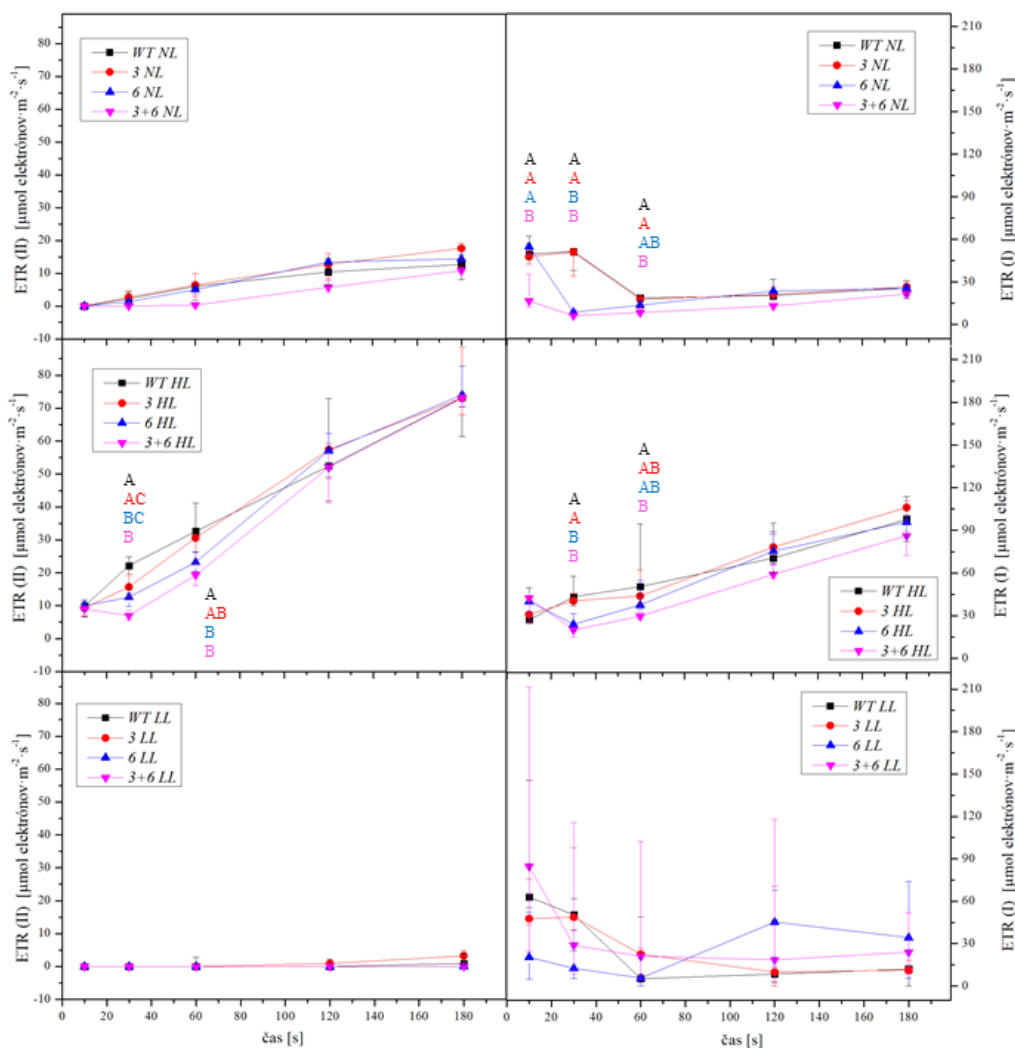
Pri analýze výsledkov všetkých uvedených veličín možno pozorovať rýchlejší nábeh pri rastlinách prirodzeného genotypu a mutaného genotypu *kolhcb3*, než u mutaných genotypov *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6*. Tento rozdiel je najlepšie pozorovateľný u NPQ, u rastlín aklimovaných na vysoké osvetlenie (Obr. 15).

Rozdiel v tom, keď ako prvé vyskočili hodnoty *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6*, sa ukázal pri parametri Y_{NA} (Obr. 18). Po prvých pár minútach sa však priebehy zjednotili, rovnaký jav sa pozoroval aj u parametrov Y_{ND} (Obr. 18), ETR_{II} a ETR_I (Obr. 16), Y_{II} a Y_I (Obr. 17). Nemožno to však povedať o parametri NPQ, a rozdiel medzi jednotlivými skupinami bol zachovaný, čo možno vidieť najmä na celkovom priebehu tohto parametru, tiež je možné pozorovať aj fakt, že rastliny aklimované na vysoké osvetlenie tento rozdiel silne vykazujú (Obr. 19).

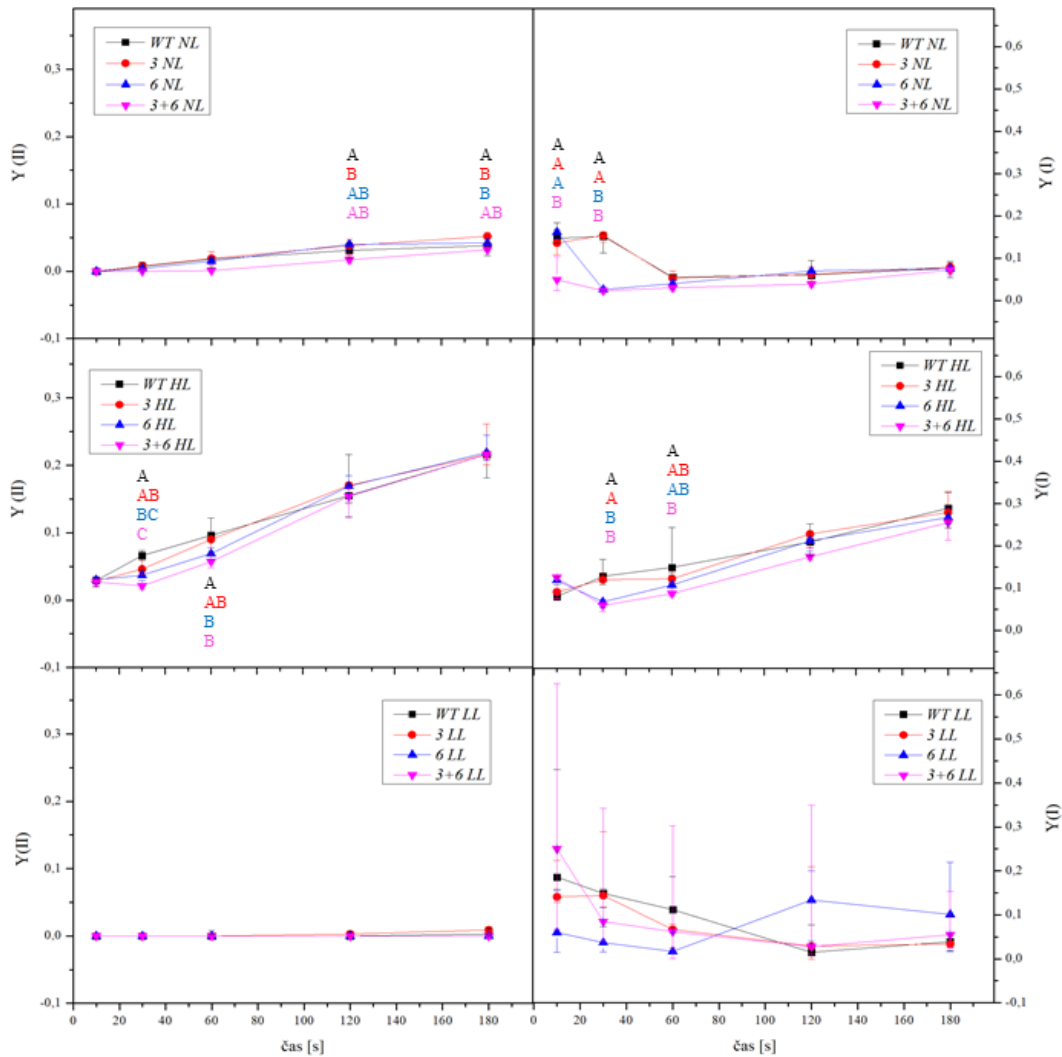
Ďalej si možno v celkovom priebehu všimnúť aj rýchleho nábehu NPQ pri skupine HL s rýchlou relaxáciou (Obr. 19). Opačne to je pri rastlinách aklimovaných na nízke osvetlenie, kedy nábeh NPQ je značne pomalší a to aj oproti skupine NL, a následne pomaly relaxuje. V prípade *kolhcb3* NL bol nárast najrýchlejší, dokonca aj oproti prirodzenému genotypu (Obr. 15). U mutantov bez Lhcb6 a dvojitého mutantu je nárast zvláštnym spôsobom rozfázovaný (Obr. 19). Treba dodať, že rastliny HL by mali byť pripravené na aktinické svetlo, vďaka svojej aklimácii na vysoké osvetlenie.



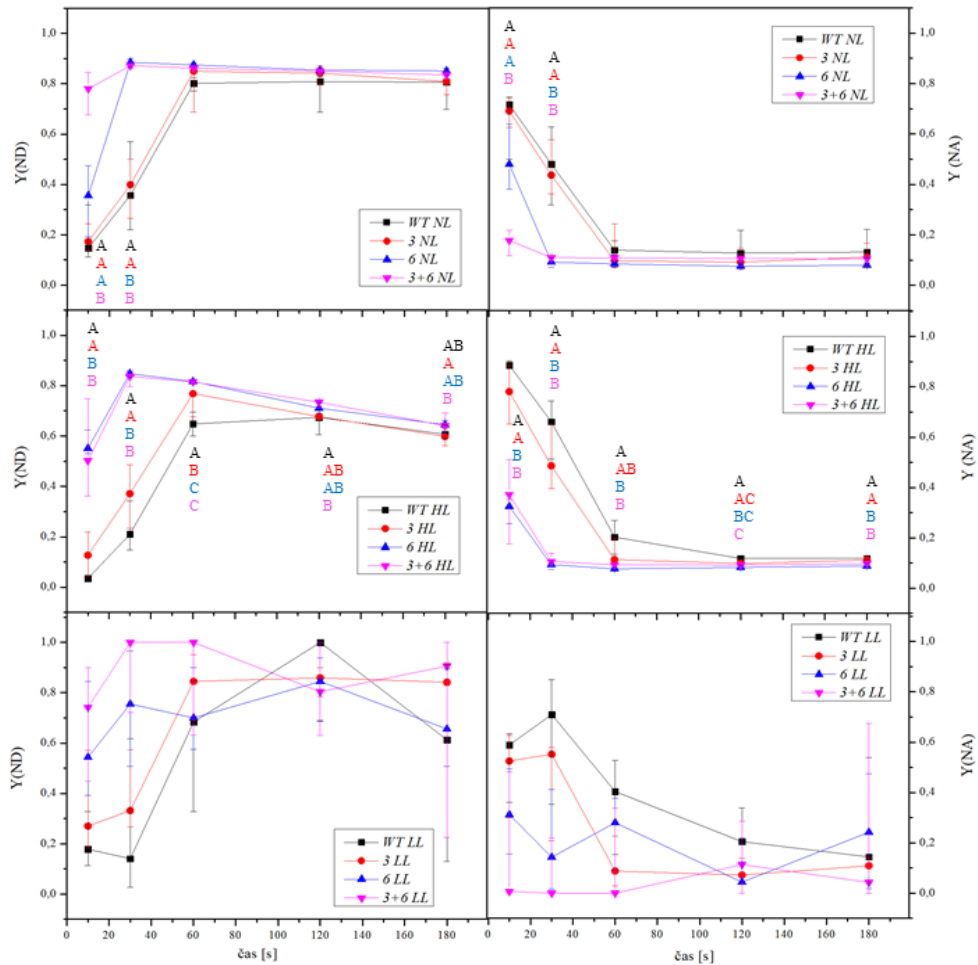
Obr. 15: Priebeh nefotochemického zhášania (NPQ) v čase (zobrazenie prvých 3 minút z celkového priebehu). Analýza týchto veličín bola spravená na oddelených listoch zatemnených šesťtýždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi Lhcb (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NL), potom potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote 22°C a 16 hodinový nočný režim pri teplote 20°C . Vlhkosť bola 60 %. Vzorky boli zmerané a vyhodnotené pomocou Dual-PAM 100. Počet vzoriek $n = 5$. Body v grafe predstavujú hodnoty mediánov, chybové úsečky sú horné a dolné kvartily. Na daných dátach bola vykonaná štatistická analýza, typ ANOVA, s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ pričom bol použitý test podľa Bonferroniho. Odlišné písmená značia štatisticky významný rozdiel medzi variantami. Čierna farba zastupuje vzorky z prirodzeného genotypu, červená z mutantného genotypu *koLhcb3*, modrá farba z mutantného genotypu *koLhcb6* a fialová farba vzorky z mutantného genotypu *koLhcb3koLhcb6*.



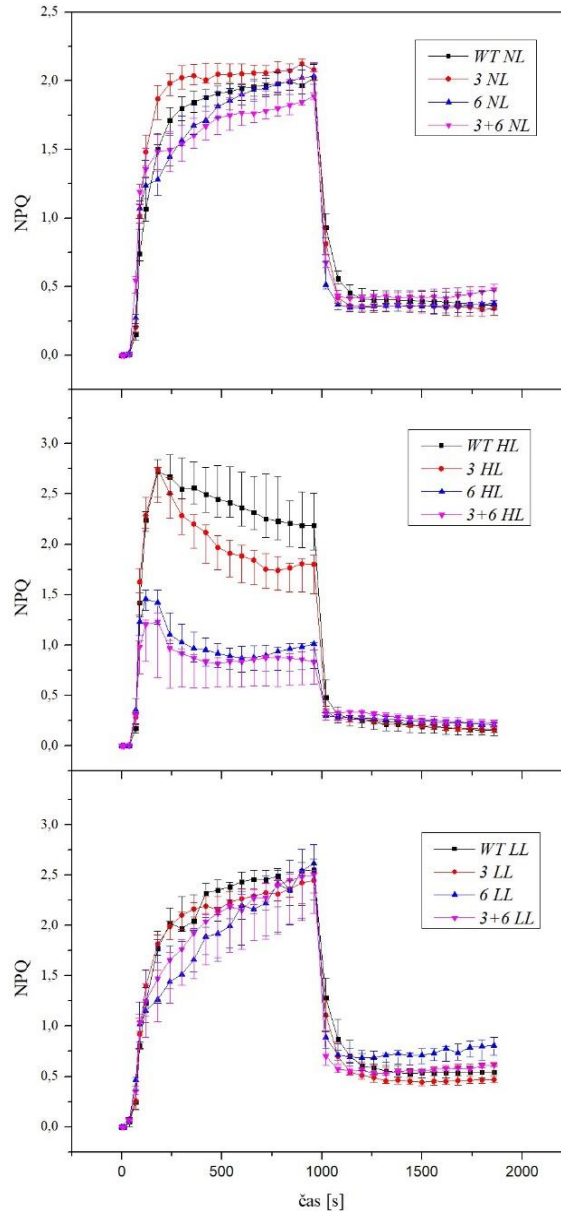
Obr. 16: Priebeh relatívnej miery rýchlosti elektrónového transportu PSI (rýchlosť nábojovej separácie v reakčných centrách PSI) (ETRI) v čase vpravo a priebeh relatívnej miery rýchlosti elektrónového transportu PSII (rýchlosť nábojovej separácie v reakčných centrách PSII) (ETRII) v čase vľavo (zobrazenie prvých 3 minút z celkového priebehu). Analýza týchto veličín bola spravená na oddelených listoch zatemnených šesťtýždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi *Lhcb* (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri 110 μmol fotónov·m⁻²·s⁻¹ (NL), potom potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; 110 μmol fotónov·m⁻²·s⁻¹), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; 750 μmol fotónov·m⁻²·s⁻¹), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; 30 μmol fotónov·m⁻²·s⁻¹). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote 22 °C a 16 hodinový nočný režim pri teplote 20 °C. Vlhkosť bola 60 %. Vzorky boli zmerané a vyhodnotené pomocou Dual-PAM 100. Počet vzoriek n = 5. Body v grafe predstavujú hodnoty mediánov, chybové úsečky sú horné a dolné kvartily. Na daných dátach bola vykonaná štatistická analýza, typ ANOVA, s hladinou významnosti α = 0,05 pričom bol použitý test podľa Bonferroniho. Odlišné písmená značia štatisticky významný rozdiel medzi variantami. Čierna farba zastupuje vzorky z prirodzeného genotypu, červená z mutantného genotypu *koLhcb3*, modrá farba z mutantného genotypu *koLhcb6* a fialová farba vzorky z mutantného genotypu *koLhcb3koLhcb6*.



Obr. 17: Priebeh efektívneho kvantového výťažku fotochémie PSII (Y(II)) vľavo a PSI (Y(I)) vpravo v čase (zobrazenie prvých 3 minút z celkového priebehu). Analýza týchto veličín bola spravená na oddelených listoch zatmenených šesťtýždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi Lhcb (koLhcb3 (3), koLhcb6 (6), koLhcb3koLhcb6 (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri 110 μmol fotónov·m⁻²·s⁻¹ (NL), potom potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; 110 μmol fotónov·m⁻²·s⁻¹), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; 750 μmol fotónov·m⁻²·s⁻¹), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; 30 μmol fotónov·m⁻²·s⁻¹). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote 22 °C a 16 hodinový nočný režim pri teplote 20 °C. Vlhkosť bola 60 %. Vzorky boli zmerané a vyhodnotené pomocou Dual-PAM 100. Počet vzoriek n = 5. Body v grafe predstavujú hodnoty mediánov, chybové úsečky sú horné a dolné kvartily. Na daných dátach bola vykonaná štatistická analýza, typ ANOVA, s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ pričom bol použitý test podľa Bonferroniho. Odlišné písmená značia štatisticky významný rozdiel medzi variantami. Čierna farba zastupuje vzorky z prirodzeného genotypu, červená z mutantného genotypu koLhcb3, modrá farba z mutantného genotypu koLhcb6 a fialová farba vzorky z mutantného genotypu koLhcb3koLhcb6.



Obr. 18: Priebeh nefotochemického kvantového výťažku PSI spôsobený limitáciami na donorovej strane v čase vľavo ($Y(ND)$) a priebeh nefotochemického kvantového výťažku PSI spôsobený limitáciami na akceptorovej strane v čase vpravo ($Y(NA)$) (zobrazenie prvých 3 minút z celkového priebehu). Analýza týchto veličín bola spravená na oddelených listoch zatemnených šesťtýždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi Lhcb (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NL), potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote 22°C a 16 hodinový nočný režim pri teplote 20°C . Vlhkosť bola 60 %. Vzorky boli zmerané a vyhodnotené pomocou Dual-PAM 100. Počet vzoriek $n = 5$. Body v grafe predstavujú hodnoty mediánov, chybové úsečky sú horné a dolné kvartily. Na daných dátach bola vykonaná štatistická analýza, typ ANOVA, s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ pričom bol použitý test podľa Bonferroniho. Odlišné písmená značia štatisticky významný rozdiel medzi variantami. Čierna farba zastupuje vzorky z prirodzeného genotypu, červená z mutantného genotypu *koLhcb3*, modrá farba z mutantného genotypu *koLhcb6* a fialová farba vzorky z mutantného genotypu *koLhcb3koLhcb6*.



Obr. 19: Priebeh nefotochemického zhášania (NPQ) v čase. Analýza týchto veličín bola spravená na oddelených listoch zatemnených šesťtýždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi Lhcb (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NL), potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote $22 \text{ }^\circ\text{C}$ a 16 hodinový nočný režim pri teplote $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Vlhkosť bola 60 %. Počet vzoriek $n = 5$. Vzorky boli zmerané a vyhodnotené pomocou Dual-PAM 100. Body v grafe predstavujú hodnoty mediánov, chybové úsečky sú horné a dolné kvartily. Čierna farba zastupuje vzorky z prirodzeného genotypu, červená z mutantného genotypu *koLhcb3*, modrá farba z mutantného genotypu *koLhcb6* a fialová farba vzorky z mutantného genotypu *koLhcb3koLhcb6*.

U rastlín aklimovaných na vysokú intenzitu osvetlenia je vidno (Obr. 19) veľmi strmý nárast NPQ u WT a *kolhcb3*, čo znamená, že u nich funguje aktívna ochrana proti nadbytočným excitáciám za pomoci NPQ, a tiež je dobre pripravená. V prípade dvoch ďalších mutantov je síce nárast NPQ rýchli, ale dosahuje skoro polovičným hodnôt (Obr. 19).

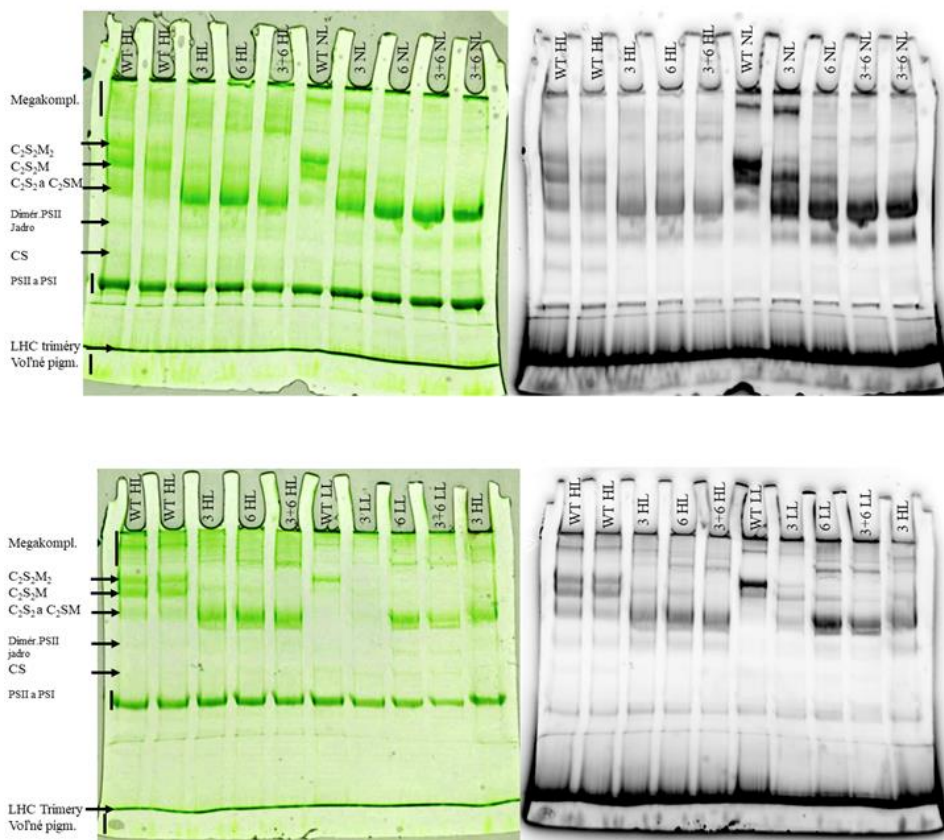
Za zaujímavé možno považovať aj skríženie priebehov pri rastlinách prirodzeného genotypu a mutátneho genotypu *kolhcb3*, s mutatnými genotypmi *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6* pri parametroch ETR(I) a Y(I) (Obr. 16 a Obr. 17) v prvých pár sekundách, kedy je možné pozorovať rýchli nábeh práve druhej skupiny oproti prvej, avšak jej následné rýchle klesnutie v prospech druhej skupiny. Následne sa priebehy približia. Na začiatku sa elektróny dostávajú k PSI rýchlejšie, zrejme ide o rýchlejší transport elektrónov od PSII k PSI, avšak až je ETR saturovaný, situácia sa mení. Pri rastlinách aklimovaných na nízke osvetlenie sú vyhodnotené parametre zavádzajúce a nemožno ich opísať plnohodnotne, keďže boli merané listy príliš malé a nepokryli tak celú snímanú meraciu plochu.

8.4 Výsledky natívnej elektroforézy

Pre účely práce bola spravená CN-PAGE elektroforéza. Na vizualizáciu všetkých pásiem bol použitý režim prenosu pomocou osvetlenia bielym svetlom, fluorescenčný režim na rozlíšenie medzi pásmami obsahujúcimi PSI a PSII (excitačná vlnová dĺžka 460 nm, pásmový filter so stupnicou od 690 do 720 nm). Na elektroferogramoch boli zachytené rastlinné megakomplexy, superkomplexy fotosystému II: C₂S₂M₂, C₂S₂M, C₂S₂ a C₂SM . Ďalej dimérne jadro fotosystému II, CS (superkomplex fotosytému II), PSII a PSI, LHC triméry a voľné pigmenty vo vzorke (Obr. 20).

Výrazné zastúpenie megakomplexov bolo zachytené u prirodzeného genotypu a mutaného genotypu *kolhcb3* pri rastlinách aklimovaných na normálne osvetlenie, no megakomplexy možno pozorovať pri všetkých typoch rastlín.

Rovnako možno tvrdiť, že PSII a PSI, LHC triméry a voľné pigmenty možno pozorovať vo všetkých vzorkách, taktiež aj dimérne jadro PSII. Všetky vzorky rovnako ukázali aj prítomnosť superkomplexov fotosystému II C₂S₂ a C₂SM. Takisto aj superkomplex fotosystému II C₂S₂M až na vzorku *kolhcb3kolhcb6*. Superkomplex PSII C₂S₂M₂ nebol pozorovaný pri vzorkách *kolhcb3*, *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6* aklimovaných na vysoké a nízke osvetlenie. Je však nutné poznamenať, že superkomplex fotosystému II C₂S₂M₂ bol pozorovaný u rastlín aklimovaných na normálne osvetlenie s mutantným genotypom *kolhcb3* a *kolhcb6*.



Obr. 20: Elektroferogramy pigment-proteínových komplexov tylakoidných membrán. Na vizualizáciu všetkých pásiem bol použitý režim prenosu pomocou osvetlenia bielym svetlom, fluorescenčný režim na rozlíšenie medzi pásmami obsahujúcimi PSI a PSII (excitačná vlnová dĺžka 460 nm, pásmový filter so stupnicou od 690 do 720 nm). Vľavo je kolorimetrické a vpravo fluorescenčné zobrazenie. CN-PAGE analýza bola spravená na izolovaných tylakoidných membránach z šesťtyždňových zatemených rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi *Lhcb* (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NL), potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote 22°C a 16 hodinový nočný režim pri teplote 20°C . Vlhkosť bola 60 %. Ako detergent bol použitý 5% *n*-dodecyl- α -D-maltozid. Megakompl. Je skratka pre rastlinné megakomplexy. $\text{C}_2\text{S}_2\text{M}_2$, $\text{C}_2\text{S}_2\text{M}$, C_2S_2 a C_2SM sú superkomplexy fotosystému II. Dimér. PSII jadro je skratka pre dimérne jadro fotosystému II. CS je superkomplex fotosystému II. PSII a PSI sú fotosystém I a fotosystém II. LHC Trimery je skratka pre triméry svetlozberných antén. Voľné pigm. označuje voľné pigmenty vo vzorke.

9. Diskusia

Už v teórii bolo zmienené, že efektívna aklimácia na rôzne intenzity osvetlenia je dôležitá pre rastliny ako také. Fenotypická analýza ukázala, ako sa dokážu na dané intenzity osvetlenia prispôbiť, pričom výsledky sú nasledovné. V prípade mutantov *kolhcb6* bolo popísané výrazné zmenšenie nadzemnej časti oproti rastlinám prirodzeného genotypu (de Bianchi a kol. 2008), u nami vypestovaných vzoriek tento jav pozorovaný nebol (Obr. 10), jednalo sa skôr o nepatrné zmenšenie. Podobný rozdiel nastal aj u dvojitého mutantu *kolhcb3kolhcb6*. Práca D. Dostálovej (2020) opisovala signifikantné zväčšenie nadzemnej časti u tohto typu mutantov oproti prirodzenému genotypu. Tento jav u nami vypestovaných rastlín opäť zaznamenaný nebol (Obr. 10), opäť ide o mierne zmenšenie rastliny. Celkový vzhľad skupín aklimovaných na jednotlivé intenzity osvetlenia ale potvrdzuje výsledky zo štúdie z roku 2017 (Schumann a kol. 2017), uskutočnenej na *A. thaliana* prirodzeného genotypu, kedy pri pestovaní za konštantných vysokých svetelných podmienok vykazovali zvýšený rast v porovnaní s rastlinami pestovanými za stáleho slabého osvetlenia (Obr. 10).

Spektrofotometrická analýza pigmentov ukázala zvýšený pomer chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* u skupiny aklimovanej na vysoké osvetlenie (Obr. 11). To znamená nižší podiel chlorofylu *b*. Tento fakt je interpretovaný ako zmenšenie svetlozberných antén u daných rastlín. Možno teda povedať, že sa chráni touto zmenou veľkosti LHC pred prebytkom svetla, a tým zabráni fotooxidácii a fotopoškodeniu. Zvýšenie pomeru Chl *a/b* u vzoriek aklimovaných na vysoké osvetlenie bolo popísané aj v štúdiu z roku 2016 (Albanese a kol. 2016), spravenej na rastlinách *A. thaliana*: WT. Rovnako u rastlín aklimovaných na vysoké osvetlenie pozorujeme aj výrazné zníženie pomeru celkového obsahu chlorofylov ku obsahu karotenoidov vzťahnutého na plochu (Obr. 11). Podiel karotenoidov je teda vyšší. Sú to antioxidanty, ktoré chránia vzorky vystavenej vysokej intenzite osvetlenia pred nadmerným fotosynteticky aktívnym žiarením. Výsledky súhlasia s literatúrou (Albanese a kol. 2016), teda že skupine aklimovanej na vysoké osvetlenie sa vyvinuli mechanizmy na ochranu pred fotopoškodením.

Analýza za pomoci HPLC potvrdila teóriu o ochranných mechanizmoch rastlín aklimovaných na vysoké osvetlenie pred fotooxidáciou. Preukázala u tejto skupiny totiž výrazne zvýšený obsah zeaxantínu vzťahnutého na plochu (Obr. 12). Rovnako boli zistené aj zvýšené hladiny karoténov, neoxantínu a luteínu u mutantu bez *Lhcb6*, pričom so štatistickou významnosťou bol tento nárast u mutantu po aklimovaní na nízke

osvetlenie (Obr. 12). Možno tento jav vysvetliť nasledovne. Popísané pigmenty patria tiež do skupiny asimilačných pigmentov a tiež sa podieľajú na zbere fotónov. Rovnako karotenoidy pomáhajú stabilizovať štruktúru pigment-proteínových komplexov. Keďže došlo ku poškodeniu viazania chlorofylu *b* odstránením Lhcb6, mutant syntetizuje vyšší obsah podporných pigmentov kvôli vyrovnaniu nedostatkov v svetlozbernom procese. Vyrovnávanie syntetizovaním iných pigmentov u mutantov *kolhcb6* aklimovaných na nízke osvetlenie vidno aj u spektrofotometrickej analýzy u porovnania celkového obsahu chlorofylu ku karotenoidom (Obr. 11). Tiež je tu zaujímavý úkaz signifikantného rozdielu v podiele pigmentov celkovo u mutantu *kolhcb3kolhcb6*, pri ktorom analýza ukázala najnižšie hodnoty obsahu pigmentov (luteín, neoxantín, violaxantín a zeaxantín) blížiaceho sa k nule, až na karotény (Obr. 12).

Pri parametroch veľmi rýchlej indukcie fluorescence chlorofylu *a* sa overila zvýšená minimálna fluorescencia v stave adaptovanom na tmu (F_0) pri *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6* (Obr. 13). Mutant bez Lhcb3 sa správal podobne ako *A. thaliana* s prirodzeným genotypom, pričom jeho similaritu s prirodzeným genotypom v správaní potvrdila aj analýza parametrov z pulznej amplitúdovej modulácie (Obr. 15, Obr. 16, Obr. 17, Obr. 18 a Obr. 19). Čo sa však týka zvyšujúcich sa hodnôt F_0 , možno vysvetliť stratu absorbovanej energie fluorescenciou narušením prenosu excitónov zo svetlozberných antén ku PSII. Je nutné dodať, že tento efekt nie je výrazný u skupiny aklimovanej na vysoké osvetlenie, signifikantné rozdiely medzi jednotlivými typmi rastlín boli však u NL rastlín (Obr. 13). K tejto problematike vzniká v súčasnosti vedecká publikácia pod záštitou katedry Biofyziky Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, pričom by mala viacej opisovať možné príčiny zvýšenia F_0 pri mutantoch *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6*. Vysvetlenie ponúkajú voľné antény, resp. M podjednotky, ktoré sa vyskytujú v okolí C_2S_2 , no nie sú prepojené (de Bianchi a kol. 2008).

Klesajúce hodnoty maximálnej fluorescence v stave adaptovanom na tmu u skupín aklimovaných na normálne a vysoké osvetlenie (Obr. 13) súhlasia s tvrdeniami, že pri mutantoch ich PSII funguje pravdepodobne inak, čo zapríčinila zmena štruktúry komplexov (Albanese a kol. 2016). Toto tvrdenie vyvrátili len LL vzorky, ktoré vykazovali opačný trend (Obr. 13). Maximálny kvantový výťažok fotochémie PSII v stave adaptovanom na tmu (F_v/F_m), ktorý ukazuje vitalitu rastliny (ideálne okolo 0,75 až 0,85) bol nameraný ako najvyšší u *A. thaliana* prirodzeného genotypu a rastlín *kolhcb3* ($\approx 0,78$ až 0,8) (Rascher a kol. 2000). Rastlina bez Lhcb3 teda musí zastúpiť absenciu tohto proteínu naozaj efektívne, kedy možno tvrdiť, že daná rastlina bude buď na úrovni

vitality rastliny s prirodzeným genotypom alebo ešte vitálnejšia. Možno potvrdiť záver štúdie (Adamiec a kol. 2015), ktorá popisuje nahradenie Lhcb3 pomocou Lhcb1 a Lhcb2, no nie úplne. Avšak mutanty *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6* majú parameter F_v/F_m výrazne nižší, a to pod ideálnou hodnotou ($\approx 0,65$) (Obr. 13). Značí to výrazné zvýšenie miery stresu alebo nižšiu efektivitu elektrónového transportu v PSII a tým nižšiu efektivitu fotosyntézy. Následkom potom môže byť nižšia produkcia makromolekúl a energie, a tým pomalší rast a nižšia výťažnosť. Pokles môže byť aj dôsledkom zvýšeného parametra F_0 , kvôli voľným LHC. Tieto výsledky súhlasia aj s výsledkami štúdií z posledných rokov (de Bianchi a kol. 2008), ktoré popisujú zmeny v kapacite transportu elektrónov (ETR).

Ďalšie dva parametre relatívna rýchlosť fotochémiie (dV/dt_0) a maximálny zachytený tok excitónov na aktívny PSII (TR_0/RC) ukázali podobné výsledky (Obr. 13). Najnižšie hodnoty oboch parametrov mali rastliny aklimované na HL a najvyššie hodnoty nabrali zas rastliny aklimované na LL. Vysvetlením je zmenšenie antén u HL skupiny (Albanese a kol. 2016) a naopak, zväčšenie antén rastlín aklimovaných na nízke osvetlenie. Rastliny tak reagovali na potreby pri zbere fotónov. Tento fakt potvrdzuje tvrdenia zo štúdie od Albanese a kol. (2016). Rovnako možno potvrdiť aj dobrú koreláciu medzi znížením veľkosti antény PSII a zvýšením pomeru Chl *a/b* po zvýšení intenzity osvetlenia (Obr. 13).

Analýza O-J-I-P kriviek potvrdila pomalší prenos energie pri mutantoch *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6* (Obr. 14). Antény dodávajú menej energie ku primárnemu akceptoru PSII, čo spomaľuje elektrónový transport (Albanese a kol. 2016). Naznačujú to nižšie vlny J a I oproti rastlinám prirodzeného genotypu (Obr 14). Opäť, jav nebol pozorovaný u mutanta bez Lhcb3, ktorého správanie sa približuje skôr ku nemutovaným rastlinám. Zníženie vln J a I bolo zaznamenané u rastlín aklimovaných na NL a LL. Treba upozorniť, že de Bianchi a kol. (2008) pozorovali nárast J-I v svojej práci ako rýchlejší, zatiaľ čo tretí I-P bol pomalší pri mutantovi *kolhcb6* oproti WT. Vo výsledkoch práce tento jav pozorovaný nebol (Obr. 14). Autori spomínanej štúdie (de Bianchi a kol. 2008) vysvetlili svoje závery zhoršením v miere redukcie zásob plastochinónu (PQ), ktorý sa zapája do ETR vo fotosyntetických reakciách závislých na svetle. Naskytuje sa tu teda otázka, či tomu tak skutočne je.

Pri NPQ možno znova sledovať podobné správanie rastlín prirodzeného genotypu a *kolhcb3* oproti rastlinám bez Lhcb6 a dvojitého mutanta bez Lhcb3 a Lhcb6 (Obr. 15 a Obr. 19). Je tu však pár zaujímavých zistení. Najmä u rastlín aklimovaných na normálne osvetlenie NPQ u *kolhcb3* bolo vyššie než u prirodzeného genotypu. Možno

tak vyvodit' lepšiu aktívnu ochranu, alebo skôr pripravenosť chrániť rastlinu pred nadmernými excitáciami pri osvetlení. To možno vysvetliť syntetizáciou väčšieho množstva Lhcb1 a Lhcb2, snažiac sa nahradiť Lhcb3. K podobnému záveru prišli práve aj Adamiec a kol. (2015). Ďalej však pozorujeme aj rýchlu relaxáciu *kolhcb6* oproti *kolhcb3kolhcb6* (Obr. 19). Analýza NPQ od de Bianchiho a kol. (2008) ukázala rýchli nárast NPQ mutantu bez Lhcb6 do hodnoty jedna, a zotrvanie na tejto hodnote počas celého nefotochemického zhášania. Nami zachytené NPQ *kolhcb6*, vybehol avšak až nad 1,5 a rovnako to bolo aj pri dvojitom mutantovi (Obr. 15). To naznačuje nečakanú vitalitu mutantov ako aj *kolhcb3* tak *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6*. Mutant bez Lhcb3 však ukázal zaujímavé správanie aj pri aklimácii na vysoké osvetlenie, kedy jeho pokles bol až nečakane strmý oproti prirodzeném genotypu (Obr. 19). Presná príčina nie je známa. Pri rastlinách aklimovaných na nízke osvetlenie bola prekvapením zvýšenie NPQ u mutantu bez Lhcb6 a to až na konci, pri temnostnej relaxácii. Podľa publikácie z roku 2020 (Wu a kol. 2020) je úloha Lhcb3 obsiahnutá v mechanizme NPQ, keďže hrá rozhodujúcu úlohu pri regulácii prenosu energie z LHC do jadra reakčného centra vo vyšších rastlinách. Odstránenie Lhcb3 ukazuje zmeny správania NPQ (Obr. 19), no treba podotknúť, že okrem prudkého poklesu pri HL rastlinách, neboli pozorované významné rozdiely oproti WT rastlinám. Možno citovať Adamiec a kol. (2015), že funkcia Lhcb3 v rastline je stále neuchopiteľná.

Priebeh efektívneho kvantového výťažku fotochémiie PSII (Y(II)) a PSI (Y(I)) v čase potvrdzuje similaritu medzi *kolhcb3* a prirodzeným genotypom (Obr. 17). Tieto rastliny mali hodnoty daných parametrov vyššie oproti ostatným typom. Značí to vyšší podiel prijatej energie idúcej do fotochemických procesov, a to hneď na začiatku osvetlenia, teda energia z prijatého svetelného žiarenia je efektívne využitá. Pri ostatných mutantoch boli dané parametre nižšie, čo súhlasí s výsledkami predošlých štúdií (de Bianchi a kol. 2008). Tieto zmeny môžu súvisieť s rozdielnym ETR, zapríčineným zmenou štruktúry svetlozberných antén, ktorý bol už popísaný (de Bianchi a kol. 2008).

Posledné parametre zistené za pomoci pulznej amplitúdovej modulácie, ktoré budú rozoberané sú priebeh nefotochemického kvantového výťažku PSI spôsobený limitáciami na donorovej strane v čase (Y(ND)) a priebeh nefotochemického kvantového výťažku PSI spôsobený limitáciami na akceptorovej strane v čase (Y(NA)). Pri Y(ND) možno pozorovať nižšie hodnoty parametru u WT a mutantu bez Lhcb3 (Obr. 18), teda opäť sa potvrdzuje hypotéza similarity medzi týmito dvoma typmi. Pokles je daný nižšími limitáciami v smere od PSII. Opačne je to u *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6* (Obr. 18).

Limitácie sú smerom od PSII, čo znamená že sa môže jednať o problém v spomalení elektrónového transportu alebo jeho narušení pred PSI alebo je PSII poškodený. U Y(NA) nastáva opačná situácia. Hodnoty u prirodzeného genotypu a *kolhcb3* stúpajú a naopak je to pri zvyšku mutantov (Obr. 18). Značí to vyššie limitácie na akceptorovej strane u rastlín WT a bez Lhcb3. Je to dôsledok nasýtenia ETR a fotosyntézy excitónmi, a dostatok energie pokračuje ďalej do fotosyntézy a zvyšok prebytočnej energie sa musí stratiť cez nefotochemické procesy. To však nemožno povedať o *kolhcb6* a *kolhcb3kolhcb6*, kde nastáva opačná situácia. Možno teda opäť potvrdiť hypotézu poškodenia PSII alebo svetlozberných antén (Albanese a kol. 2016; Grinzato a kol. 2020).

Výsledky z elektroforézy potvrdili poznatky z literatúry (de Bianchi et al. 2008; Kovács et al. 2006). Všetky superkomplexy PSII boli potvrdené u WT nezávisle na aklimácii na rôzne druhy osvetlenia (Obr. 20). U mutantu *kolhcb3* z istotou možno potvrdiť prítomnosť superkomplexu $C_2S_2M_2$ len v prípade skupiny NL, a minimálne množstvo bolo pozorované aj u rastlín aklimovaných na nízke osvetlenie. V prípade vysokého osvetlenia nebol komplex daného typu pozorovaný. Tu sa možno čiastočne oprieť o tvrdenia zo štúdie z roku 2015 (Adamiec et al. 2015), kedy možno tvrdiť, že Lhcb1 a Lhcb2 sa snažia nahradiť Lhcb3. Avšak kvôli podobnému správaniu mutantu ako u rastlín prirodzeného genotypu sa možno domnievať, že daný superkomplex sa v rastline v nejakej forme nachádzať bude, takisto je na zváženie aj výskyt voľných M trimérov v okolí. Superkomplexy C_2S_2M , C_2S_2 a C_2SM pozorované boli vo všetkých prípadoch (Obr. 20).

V prípade mutantu bez Lhcb6 došlo k zaujímavému objavu (Obr. 20). V prípade daného typu rastliny aklimovanej na normálne osvetlenie bola zistená prítomnosť superkomplexu PSII $C_2S_2M_2$. Keďže z teoretickej časti vieme, že CP24 kódovaný *lhcb6* viaže trimér M spolu s CP29, je teda málo pravdepodobné, že mutant *kolhcb6* by obsahoval $C_2S_2M_2$ (Jansson 1999). Napriek tomu jeho nepatrné množstvo bolo detekované. Štúdia vznikajúca na katedre Biofyziky Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, ktorá nebola zatiaľ publikovaná, prišla s nasledovným vysvetlením. V prípade mutantu *kolhcb6* sa jedná o inzerciu na 3' konci daného génu, a je pravdepodobné, že nie je tak odstránená celá kódujúca časť. V tom prípade je pravdepodobnosť tvorby Lhcb6 v malom množstve, ako to potvrdila proteomická analýza v rámci vznikajúcej štúdie na katedre Biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci. Je potrebné podotknúť, že superkomplex PSII $C_2S_2M_2$ nebol zaznamenaný u *kolhcb6* aklimovaného na vysoké a nízke osvetlenie. Potvrdený bol vysoký výskyt C_2S_2

podľa literatúry (de Bianchi a kol. 2008). V dvojitom mutante bez Lhcb3 a Lhcb6 neboli zachytené superkomplexy PSII C₂S₂M₂ vo všetkých typoch intenzity osvetlenia a C₂S₂M bol zachytený len v prípade rastlín NL v nepatrnom množstve, v ostatných typoch opäť chýba (Obr. 20). Ostatné superkomplexy boli pozorované v celom rozsahu. Tento zachytený výskyt môžu vysvetľovať chýbajúce Lhcb3 a Lhcb6, a následne poškodenie fotosyntetického aparátu bez zastúpenia ostatných LHC (Wu a kol. 2020).

10. Záver

Hlavnou motiváciou práce bolo zistiť akým spôsobom rastliny hospodária so svetlom v rôznych podmienkach a pri absencii rôznych proteínových podjednotiek svetlozberných komplexov PSII. Závěry práce možno aplikovať v budúcom poľnohospodárskom výskume pri určení správnych podmienok pre zvýšenie výnosu rastlín.

Naše závěry sa opierajú o výsledky z pulznej amplitúdovej modulácie, veľmi rýchlej fluorescenčnej indukcie, analytického stanovenia obsahu pigmentov a aj elektroforetickej separácie pigment-proteínových komplexov tylakoidných membrán. Dokázali v celku vyššiu vitalitu mutantov *A. thaliana* v porovnaní s výsledkami z literatúry. Tomuto závěru nasvedčujú najmä porovnanie NPQ výsledkov z publikácii od de Bianchiho (2008) s našimi hodnotami. Nejednalo sa avšak len o vitalitu mutantov ako takých. Veľkým prekvapením bolo chovanie mutantu *kolhcb3*, ktorého správanie bolo veľmi podobné so správaním rastlín prirodzeného genotypu. V tomto prípade možno súhlasiť s výsledkami z posledných štúdií, ktoré predpokladajú kompenzáciu straty Lhcb3 zvýšenou produkciou a vzájomným zastúpením podjednotkami Lhcb1 a Lhcb2 (Adamiec a kol. 2015). Daný mutant je možným predmetom budúcich analýz, keďže v niektorých prípadoch výsledky ukazujú podobnosť s prirodzeným genotypom vo vitalite rastliny (Obr. 13 a Obr. 14) a bolo by dobré dané súvislosti podrobiť hlbšej analýze. Ďalším zistením bolo potvrdenie správania NL, HL a LL rastlín (Schumann a kol. 2017). Vyvrátené však boli viaceré závěry o *kolhcb6* z práce od de Bianchi a kol. (2008). Čo sa týka *kolhcb3kolhcb6*, fenotypizácia rastlín daného typu (Obr. 10) sa nezhodovala s tou, ktorá bola popísaná v práci D. Dostálovej (2020).

Ďalším zaujímavým výsledkom bolo aj zachytenie komplexu $C_2S_2M_2$ pri natívnej polyakrylamidovej elektroforeze v *kolhcb6*. Tento jav bude popísaný bližšie v štúdií katedry Biofyziky Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

11. Zoznam literatúry

- Adamiec M., Gibasiewicz K., Luciński R., Giera W., Chełminiak P., Szewczyk S., Sipińska W., Grondelle R., Jackowski G. (2015) Excitation energy transfer and charge separation are affected in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking light-harvesting chlorophyll a/b binding protein Lhcb3. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **153**, 423-428.
- Albanese P., Manfredi M., Meneghesso A., Marengo E., Saracco G., Barber J., Morosinotto T., Pagliano C. (2016) Dynamic reorganization of photosystem II supercomplexes in response to variations in light intensities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1857**, 1651-1660.
- Alboresi, A., Caffarri, S., Nogue, F., Bassi, R., Morosinotto, T. (2008) In silico and biochemical analysis of *Physcomitrella patens* photosynthetic antenna: identification of subunits which evolved upon land adaptation. *PLoS one* **3**: 2033.
- Amarnath K., Bennett D.I., Schneider A.R., Fleming, G.R. (2016) Multiscale model of light harvesting by photosystem II in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 1156-1161.
- Anderson J.M. (1986) Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annual review of plant physiology* **37**, 93-136.
- Andersson J., Walters R.G., Horton P., Jansson S. (2001) Antisense inhibition of the photosynthetic antenna proteins CP29 and CP26: implications for the mechanism of protective energy dissipation. *The Plant Cell* **13**, 1193-1204.
- Austin J.R., Staehelin L.A. (2011) Three-dimensional architecture of grana and stroma thylakoids of higher plants as determined by electron tomography. *Plant physiology* **155**, 1601-1611.
- Ballottari M., Girardon J., Dall'Osto L., Bassi R. (2012) Evolution and functional properties of photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1817**, 143-157.
- Barzda V., Gulbinas V., Kananavicius R., Cervinskis V., Van Amerongen H., Van Grondelle R., Valkunas L. (2001) Singlet-singlet annihilation kinetics in aggregates and trimers of LHCII. *Biophysical journal* **80**, 2409-2421.
- Belgio E., Duffy C.D., Ruban A.V. (2013) Switching light harvesting complex II into photoprotective state involves the lumen-facing apoprotein loop. *Physical Chemistry Chemical Physics* **15**, 12253-12261.
- Bennett D.I., Amarnath K., Park S., Steen C.J., Morris J.M., Fleming G.R. (2019) Models and mechanisms of the rapidly reversible regulation of photosynthetic light harvesting. *Open biology* **9**: 190043.
- Boekema E.J., van Roon H., van Breemen J.F., Dekker J.P. (1999) Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *European journal of biochemistry* **266**, 444-452.
- Brestic M., Zivcak M., Kunderlikova K., Sytar O., Shao H., Kalaji H.M., Allakhverdiev S. I. (2015) Low PSI content limits the photoprotection of PSI and PSII in early growth stages of chlorophyll b-deficient wheat mutant lines. *Photosynthesis research* **125**, 151-166.
- Briantais J.M. (1994) Light-harvesting chlorophyll ab complex requirement for regulation of Photosystem II photochemistry by non-photochemical quenching. *Photosynthesis research* **40**, 287-294.
- Britton G., Pfander H., Liaaen-Jensen S. (1996) *Carotenoids, Volume 2: Synthesis*. 2nd ed., (Britton G., Pfander H., Liaaen-Jensen S. eds.) Springer Science & Business Media, Berlin, Germany, 362 strán.
- Caffarri S., Kouřil R., Kerešiče S., Boekema E.J., Croce R. (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *The EMBO journal* **28**, 3052-3063.

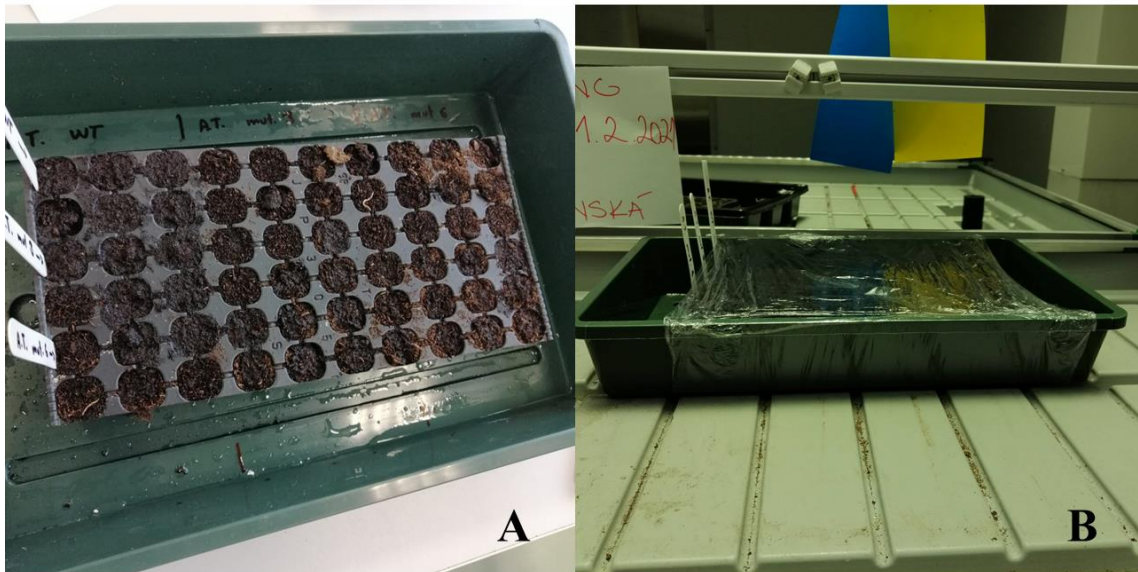
- de Bianchi S., Dall'Osto L., Tognon G., Morosinotto T., Bassi R. (2008) Minor antenna proteins CP24 and CP26 affect the interactions between photosystem II subunits and the electron transport rate in grana membranes of Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**, 1012-1028.
- Dekker J.P., Boekema E.J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1706**, 12-39.
- Dockter C., Müller A. H., Dietz C., Volkov A., Polyhach Y., Jeschke G., Paulsen H. (2012) Rigid core and flexible terminus: structure of solubilized light-harvesting chlorophyll a/b complex (LHCII) measured by EPR. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 2915-2925.
- Dostálová D. (2020) *Vplyv absencie svetlozberných komplexov Lhcb3 a Lhcb6 na nefotochemické zhášanie u mutantov Arabidopsis thaliana*. Bakalárska práca, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika.
- Eyring M.B., Martin P. (2013) Spectroscopy in Forensic Science. In: *Encyclopedia of Physical Science and Technology*. (Meyers R.A. eds.) Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 637-643.
- Fleming G.R., Schlau-Cohen G.S., Amarnath K., Zaks J. (2012) Design principles of photosynthetic light-harvesting. *Faraday discussions* **155**, 27-41.
- Friedland N., Negi S., Vinogradova-Shah T., Wu G., Ma L., Flynn S., Kumssa T., Lee C.H., Sayre R.T. (2019) Fine-tuning the photosynthetic light harvesting apparatus for improved photosynthetic efficiency and biomass yield. *Scientific reports* **9**, 1-12.
- Ganeteg U., Külheim C., Andersson J., Jansson S. (2004) Is each light-harvesting complex protein important for plant fitness?. *Plant Physiology* **134**, 502-509.
- Gas B. (2005) ELECTROPHORESIS | Principles. In: *Encyclopedia of Analytical Science*, 2nd ed., (Worsfold P., Townshend A., Poole C. eds.) Elsevier, Oxford, UK, 363-370.
- Gerotto C., Franchin C., Arrigoni G., Morosinotto T. (2015) In vivo identification of photosystem II light harvesting complexes interacting with PHOTOSYSTEM II SUBUNIT S. *Plant Physiology* **168**, 1747-1761.
- Gika H., Kaklamanos G., Manesiotis P., Theodoridis G. (2016) Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography. In: *Encyclopedia of Food and Health*. (Caballero B., Finglas P.M., Toldrá F. eds.), Academic Press, Oxford, UK, 93-99.
- Govindjee U. (2014) *Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria* Vol. 40. (Demmig-Adams B., Garab G., Adams III W. eds.) Springer Netherlands, Dordrecht, The Netherlands, 649 strán.
- Grinzato A., Albanese P., Marotta R., Swuec P., Saracco G., Bolognesi M., Zanotti G., Pagliano C. (2020) High-Light versus Low-Light: Effects on Paired Photosystem II Supercomplex Structural Rearrangement in Pea Plants. *International journal of molecular sciences* **21**: 8643.
- Haferkamp S., Haase W., Pascal A.A., van Amerongen H., Kirchhoff H. (2010) Efficient light harvesting by photosystem II requires an optimized protein packing density in grana thylakoids. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 17020-17028.
- Hamilton T.L. (2019) The trouble with oxygen: The ecophysiology of extant phototrophs and implications for the evolution of oxygenic photosynthesis. *Free Radical Biology and Medicine* **140**, 233-249.
- Hansatech Instruments; Measuring chlorophyll fluorescence with the “Plant Efficiency Analyser” (PEA) page:
http://131.130.57.230/clarotest190/claroline/backends/download.php?url=L1NPUC9QRUEvUEVBLnBkZg%3D%3D&cidReset=true&cidReq=300412_001 (31. 1. 2021).
- Henriques F.S. (2009) Leaf chlorophyll fluorescence: background and fundamentals for plant biologists. *The Botanical Review* **75**, 249-270.
- Iwai M., Takahashi Y., Minagawa J. (2008) Molecular remodeling of photosystem II during state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell* **20**, 2177-2189.
- Jahns P., Holzwarth A.R. (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1817**, 182-193.

- Jansson S. (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends in plant science* **4**, 236-240.
- Jost P.C., Griffith O.H., Capaldi R.A., Vanderkooi G. (1973) Evidence for boundary lipid in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **70**, 480-484.
- Kindgren P. (2010) *The chloroplast talks: Insights into the language of the chloroplast in Arabidopsis*. Ph.D. thesis, Umeå University, Umeå, Sweden.
- Kirchhoff H., Hall C., Wood M., Herbstová M., Tsabari O., Nevo R., Charuvi D., Shimoni E., Reich Z. (2011) Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 20248-20253.
- Kiss A.Z., Ruban A.V., Horton P. (2008) The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes. *Journal of biological chemistry* **283**, 3972-3978.
- Kouřil R., Wientjes E., Bultema J.B., Croce R., Boekema E.J. (2013) High-light vs. low-light: effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in Arabidopsis thaliana. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1827**, 411-419.
- Kovács L., Damkjær J., Kerešiče S., Iliaia C., Ruban A.V., Boekema E.J., Jansson S., Horton P. (2006) Lack of the light-harvesting complex CP24 affects the structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts. *The Plant Cell* **18**, 3106-3120.
- Lambrev P.H., Schmitt F.J., Kussin S., Schoengen M., Várkonyi Z., Eichler H.J., Garab G., Renger G. (2011) Functional domain size in aggregates of light-harvesting complex II and thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1807**, 1022-1031.
- 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.
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophyll and Carotenoid Determination: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **8**, 349-82.
- Lindquist E., Aronsson H. (2018) Chloroplast vesicle transport. *Photosynthesis research* **138**, 361-371.
- Luciński R., Jackowski G. (2006) The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II. *Acta biochimica polonica* **53**, 693-708.
- Merritt J.E., Loening K.L. (1979) Nomenclature of tetrapyrroles. *Pure and Applied Chemistry* **51**, 2251-2304.
- Meyerowitz E.M. (1987) Arabidopsis thaliana. *Annual review of genetics* **21**, 93-111.
- Miyake C., Amako K., Shiraishi N., Sugimoto T. (2009) Acclimation of tobacco leaves to high light intensity drives the plastoquinone oxidation system—relationship among the fraction of open PSII centers, non-photochemical quenching of Chl fluorescence and the maximum quantum yield of PSII in the dark. *Plant and cell physiology* **50**, 730-743.
- Mizusawa N., Wada H. (2012) The role of lipids in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1817**, 194-208.
- Möttus M., Sulev M., Baret F., Lopez-Lozano R., Reinart A. (2012) Photosynthetically Active Radiation: Measurement photosynthesis / Photosynthetic(Ally)Active Radiation (PAR) Measurement and Modeling. In: *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. (R.A. Meyers eds.), Springer, New York, U.S.A., 7902-7932.
- Munekage Y., Hashimoto M., Miyake C., Tomizawa K.I., Endo T., Tasaka M., Shikanai T. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* **429**, 579-582.
- Najafpour M.M., Moghaddam A.N., Allakhverdiev S.I. (2012) Biological water oxidation: lessons from nature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1817**, 1110-1121.
- Neilson J.A., Durnford D.G. (2010) Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes. *Photosynthesis research* **106**, 57-71.

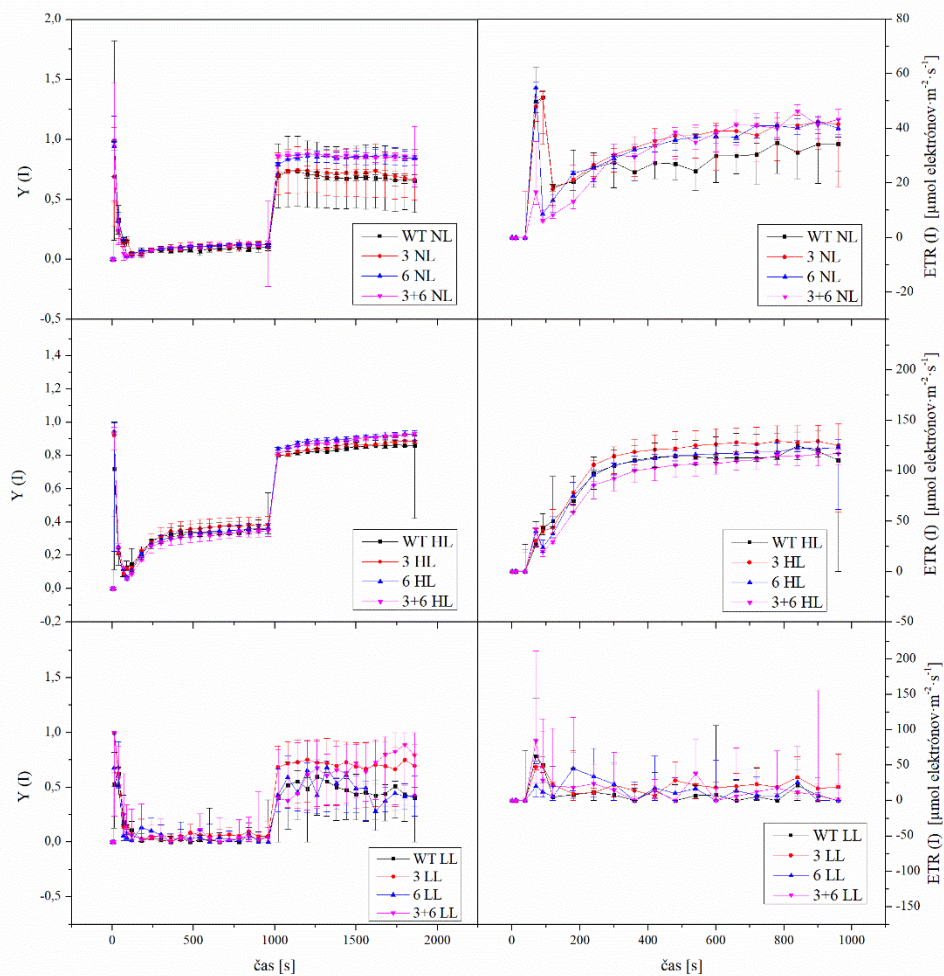
- Netto A.T., Campostrini E., de Oliveira J.G., Bressan-Smith R.E. (2005) Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae* **104**, 199-209.
- Páli T., Garab G., Horváth L.I., Kóta Z. (2003) Functional significance of the lipid-protein interface in photosynthetic membranes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **60**, 1591-1606.
- Phu S.T.P. (2014) Research on the Correlation Between Chlorophyll-a and Organic Matter BOD, COD, Phosphorus, and Total Nitrogen in Stagnant Lake Basins. In: *Sustainable Living with Environmental Risks*. (Kaneko N., Yoshiura S., Kobayashi M. eds.), Springer, Tokyo, Japan, 177-191.
- Rascher U., Liebig M., Lüttge U. (2000) Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant, Cell & Environment* **23**, 1397-1405.
- Rochaix J.D. (2014) Regulation and dynamics of the light-harvesting system. *Annual review of plant biology* **65**, 287-309.
- Ruban A.V., Murchie E.H. (2012) Assessing the photoprotective effectiveness of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching: a new approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1817**, 977-982.
- Ruban A.V. (2016) Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant physiology* **170**, 1903-1916.
- Shipman L.L., Cotton T.M., Norris J.R., Katz J.J. (1976) An analysis of the visible absorption spectrum of chlorophyll a monomer, dimer, and oligomers in solution. *Journal of the American Chemical Society* **98**, 8222-8230.
- Schreiber U. (2004) Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview. In: *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. (Papageorgiou G.C., Govindjee U. eds), Advances in Photosynthesis and Respiration Springer, Dordrecht, The Netherlands, 279–319.
- Schumann T., Paul S., Melzer M., Dörmann P., Jahns P. (2017) Plant growth under natural light conditions provides highly flexible short-term acclimation properties toward high light stress. *Frontiers in plant science* **8**: 681.
- Standfuss J., Terwisscha van Scheltinga A.C., Lamborghini M., Kühlbrandt W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *The EMBO journal* **24**, 919-928.
- Stirbet A., Lazár D., Kromdijk J. (2018) Chlorophyll a fluorescence induction: can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses?. *Photosynthetica* **56**, 86-104.
- Strand D.D., Kramer D.M. (2014) Control of Non-Photochemical Exciton Quenching by the Proton Circuit of Photosynthesis. In: *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. (Demmig-Adams B., Garab G., Adams III W., Govindjee U. eds.), Advances in Photosynthesis and Respiration Springer, Dordrecht, The Netherlands, 387–408.
- Theis J., Schroda M. (2016) Revisiting the photosystem II repair cycle. *Plant signaling & behavior* **11**: e1218587.
- van Amerongen H., Croce R. (2007) Structure and Function of Photosystem II Light-Harvesting Proteins (Lhcb) of Higher Plants. In: *Primary processes of photosynthesis, Part 1: Principles and Apparatus*. (Renger G. eds.), RSC Publishing, Cambridge, U.K., 329 - 367.
- Vernon LP., Seely G. R. (2014) *The chlorophylls*. Academic press, New York, U.S.A. 696 strán.
- Walz – Germany Page: https://www.walz.com/products/chl_p700/introduction.html (10. 1. 2021).
- Wu G., Ma L., Sayre R.T., Lee C.H. (2020) Identification of the optimal light harvesting antenna size for high-light stress mitigation in plants. *Frontiers in Plant Science* **11**: 505.

Zhao X., Chen T., Feng B., Zhang C., Peng S., Zhang X., Guanfu F., Tao L. (2017) Non-photochemical quenching plays a key role in light acclimation of rice plants differing in leaf color. *Frontiers in plant science* **7**: 1968.

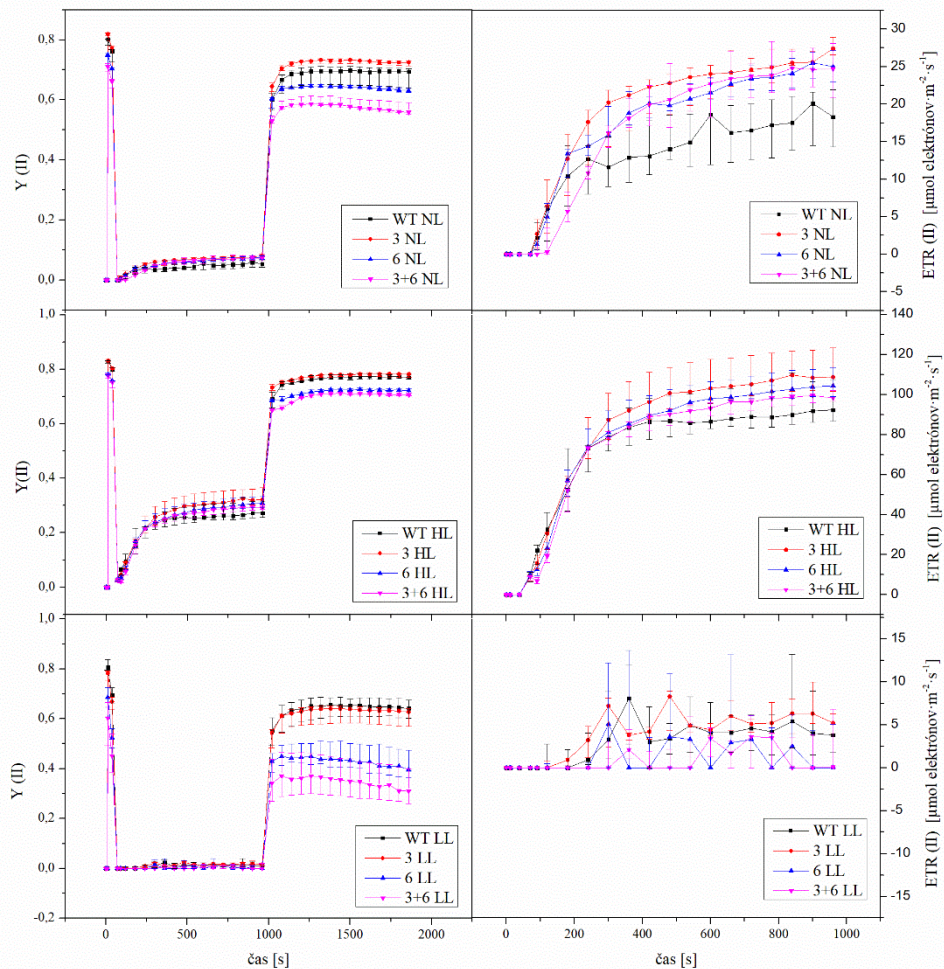
12.Prílohy



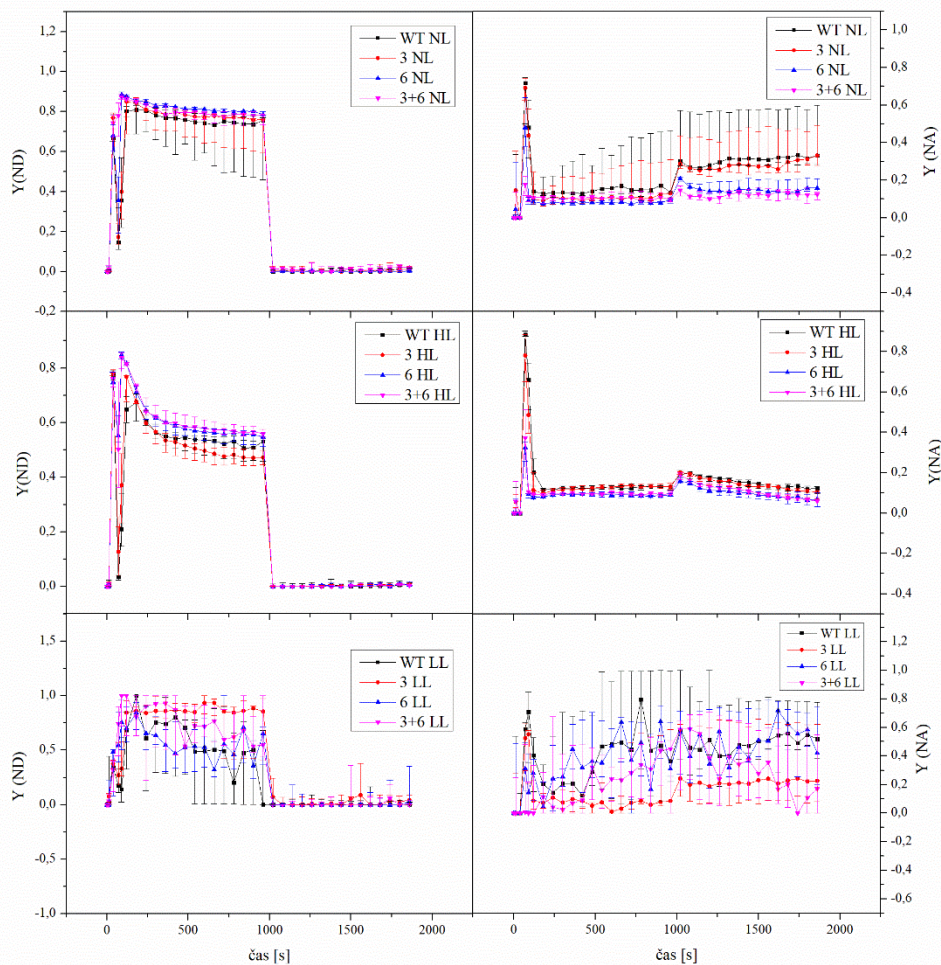
Príloha 1: Ukážka procesu výsadby rastlín *A. Thaliana* prirodzeného genotypu a jej mutantov bez *Lhcb3* a/alebo *Lhcb6*. Na obrázku A možno vidieť substrát nasiaknutý vodou priravený na zasadenie semiačka daného typu rastliny. Biele paličky s popismi na ľavej strane označujú už predom dané rozmiestnenie rastlín v sadebníčkoch. Na obrázku B možno vidieť ukážku z fytotronu po výsadbe semiačok do substrátu.



Príloha 2: Priebeh relatívnej miery rýchlosti elektrónového transportu PSI (rýchlosť nábojovej separácie v reakčných centrách PSI) ($ETR(I)$) v čase vpravo a priebeh efektívneho kvantového výťažku fotochémie PSI ($Y(I)$) vľavo. Analýza týchto veličín bola spravená na oddelených listoch zatemnených šesťtýždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi Lhcb (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NL), potom potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote 22°C a 16 hodinový nočný režim pri teplote 20°C . Vlhkosť bola 60 %. Počet vzoriek $n = 5$. Vzorky boli zmerané a vyhodnotené pomocou Dual-PAM 100. Body v grafe predstavujú hodnoty mediánov, chybové úsečky sú horné a dolné kvartily. Čierna farba zastupuje vzorky z prirodzeného genotypu, červená z mutantného genotypu *koLhcb3*, modrá farba z mutantného genotypu *koLhcb6* a fialová farba vzorky z mutantného genotypu *koLhcb3koLhcb6*.



Príloha 3: Priebeh relatívnej miery rýchlosti elektrónového transportu PSII (rýchlosť nábojovej separácie v reakčných centrách PSII) (ETR(II)) v čase vpravo a priebeh efektívneho kvantového výťažku fotochémiie PSII (Y(II)) vľavo. Analýza týchto veličín bola spravená na oddelených listoch zatemnených šesťtyždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi Lhcb (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NL), potom potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote $22 \text{ }^\circ\text{C}$ a 16 hodinový nočný režim pri teplote $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Vlhkosť bola 60 %. Počet vzoriek $n = 5$. Vzorky boli zmerané a vyhodnotené pomocou Dual-PAM 100. Body v grafe predstavujú hodnoty mediánov, chybové úsečky sú horné a dolné kvartily. Čierna farba zastupuje vzorky z prirodzeného genotypu, červená z mutantného genotypu *koLhcb3*, modrá farba z mutantného genotypu *koLhcb6* a fialová farba vzorky z mutantného genotypu *koLhcb3koLhcb6*.



Príloha 4: Priebeh nefotochemického kvantového výťažku PSI spôsobený limitáciami na donorovej strane v čase vľavo ($Y(ND)$) a priebeh nefotochemického kvantového výťažku PSI spôsobený limitáciami na akceptorovej strane v čase vpravo ($Y(NA)$) Analýza týchto veličín bola spravená na oddelených listoch zatemnených šesťtýždňových rastlín *Arabidopsis thaliana* (AT prirodzený genotyp, WT) a na jej mutantoch s chýbajúcimi Lhcb (*koLhcb3* (3), *koLhcb6* (6), *koLhcb3koLhcb6* (3+6)). Rastliny boli pestované 4 týždne pri $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NL), potom potom boli rozdelené do 3 skupín a dva týždne boli vystavené: prvá skupina na normálnom osvetlení (NL; $110 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), druhá skupina na vysokom osvetlení (HL; $750 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a tretia skupina na nízkom osvetlení (LL; $30 \mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Jednalo sa o 8 hodinový denný režim pri teplote 22°C a 16 hodinový nočný režim pri teplote 20°C . Vlhkosť bola 60 %. Počet vzoriek $n = 5$. Vzorky boli zmerané a vyhodnotené pomocou Dual-PAM 100. Body v grafe predstavujú hodnoty mediánov, chybové úsečky sú horné a dolné kvartily. Čierna farba zastupuje vzorky z prirodzeného genotypu, červená z mutantného genotypu *koLhcb3*, modrá farba z mutantného genotypu *koLhcb6* a fialová farba vzorky z mutantného genotypu *koLhcb3koLhcb6*.