

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra biofyziky



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Studium vlivu vysokoteplotního stresu na funkci fotosystému I a  
fotosystému II při různých světelných podmínkách**

**Vypracoval:** Ondřej Kocáb

**Studijní obor:** Biofyzika

**Vedoucí bakalářské práce:** RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.

Olomouc, 2014

Děkuji vedoucímu bakalářské práce RNDr. Roman Kouřilovi, Ph.D., RNDr. Martině Špundové, Ph.D., Prof. RNDr. Petru Ilíkovi, Ph.D., a ostatním pracovníkům katedry za poskytnutí informací potřebných k sepsání této práce a veškerou pomoc, kterou mi během jejího vzniku poskytli. Také bych jim zde chtěl poděkovat za ochotu, vstřícnost a nekonečnou trpělivost, které se mi od nich během vzniku této práce dostalo.

Dále děkuji své rodině a přátelům za duševní a hmotnou podporu, kterou mi během času věnované této práci poskytli. Také jim děkuji za značnou trpělivost, kterou se mnou během vzniku této práce měli.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením RNDr.  
Romana Kouřila, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne .....

## SOUHRN

Tato práce se zabývá vlivem vysokoteplotního stresu na rostliny, které jsou následně vystaveny různým intenzitám světla. Obsahuje stručný popis fotosyntetického aparátu a jeho reakcí na stres z nadměrného ozáření a vysokých teplot, zejména jejich vliv na fotosystém II a fotosystém I.

Měření probíhalo na rostlinách *Arabidopsis thaliana* a jejich vybraných mutantech *npq1* (absence zeaxantinu), *npq2* (bez zpětné konverze zeaxantinu), *npq4-1* (absence PsbS proteinu) a L17 (nadměrná exprese PsbS proteinu). Pomocí přístroje Dual-PAM-100 byly zkoumány parametry jako intenzita fluorescence PSII, energetické nefotochemické zhášení qE a Gentiho parametr Y(II).

V diskuzi jsou obdržaná data konfrontována s výsledky publikovanými v odborné literatuře, podle kterých se PsbS protein na teplotně stimulovaném nefotochemickém zhášení fotochemickém zhášení qE podílí až při vyšších intenzitách aktinického světla. V této práci se však ukázalo, že PsbS protein se na teplotně stimulovaném nefotochemickém zhášení podílí už při nízkých intenzitách aktinického světla. Dále bylo zjištěno, že PsbS protein je pro teplotně stimulované qE nepostradatelný a zeaxantin bez PsbS proteinu není schopen samostatného nefotochemického zhášení chlorofylové fluorescence. Nečekaným výsledkem bylo zjištění, že předežhřáté rostliny vystavené pěstební intenzitě AL vykazují ve srovnání s kontrolními vzorky větší množství otevřených reakčních center PSII pravděpodobně díky zefektivnění lineárního elektronového transportu skrze PSII.

## SUMMARY

This work deals with the influence of heat-stress on a subsequently applied light stress in plants. There is a short overview about photosynthetic apparatus and its reaction to a heat-stress and irradiance stress, especially in connection with photosystem II and photosystem I.

There was used the instrument Dual-PAM-100, through which fluorescence parameters like fluorescence intensity of PSII, energy-dependent non-photochemical quenching qE and Gentiho parameter Y(II) were analyzed on plants *Arabidopsis thaliana* and its choosen mutants *npq1* (absence of zeaxanthin), *npq2* (without back conversion of zeaxanthin), *npq4-1* (absence of PsbS protein) and L17 (overexpression of PsbS protein).

Obtained results were discussed and compared with recently published data, which indicates that PsbS protein is involved in a heat-induced non-photochemical quenching qE only at higher intensities of actinic light. However, in this work it is shown that PsbS protein is involved in the heat-induced qE even at low intensities of actinic light. Furthermore, it was found that PsbS protein is essential for the heat-induced qE and zeaxanthin itself is not able to quench chlorophyll fluorescence without PsbS protein. Unexpectedly preheated plants exposed to light of intensity equal to cultivation light intensity possess more open reaction centers of PSII compared to control plants probably due to a more effective linear electron transport through PSII.

## SEZNAM ZKRATEK

A – Antheraxantin  
AL – Aktinické světlo  
ATP – Adenosintrifosfát  
A<sub>1</sub> – Fylochinon  
Fd – Ferredoxin  
F<sub>M</sub> – Maximální fluorescence po adaptaci na tmu  
F<sub>M</sub>' – Maximální fluorescence na konci světelné fáze  
F<sub>M</sub>" – Maximální fluorescence na konci temnostní fáze  
FNR – Ferredoxin NADP<sup>+</sup>-oxido-reduktáza  
F<sub>T</sub> – Aktuální fluorescence  
F<sub>v</sub> – Variabilní fluorescence  
F<sub>v</sub>/F<sub>M</sub> – Kvantový výtěžek fotochemie  
F<sub>0</sub> – Minimální fluorescence po adaptaci na tmu  
HSP – Proteiny teplotního šoku  
LHCI – Světloběrný komplex fotosystému I  
LHCII – Světloběrný komplex fotosystému II  
L17 - mutant *Arabidopsis* s nadměrným výskytem PsbS proteinu  
ML – Měřící světlo  
NADPH – Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát  
NPQ – Nefotochemické zhášení  
NPQ<sub>1</sub> – Nefotochemické zhášení na konci světelné fáze  
NPQ<sub>2</sub> – Nefotochemické zhášení na konci temnostní fáze  
*npq1* – mutant *Arabidopsis* bez schopnosti konverze violaxantinu na zeaxantin  
*npq2* - mutant *Arabidopsis* bez schopnosti zpětné konverze zeaxantinu na violaxantin  
*npq4-1* - mutant *Arabidopsis* bez PsbS proteinu  
OEC – Komplex vyvíjející kyslík  
PC – Plastocyanin  
P<sub>M</sub> – Maximální signál z PSI po adaptaci na tmu  
PQH<sub>2</sub> - Plastohydrochinon  
PSI – Fotosystém I  
PSII – Fotosystém II  
P680 – Reakční centrum fotosystému II  
P700 – Reakční centrum fotosystému I  
Q<sub>A</sub> – Plastochinon a  
Q<sub>B</sub> – Plastochinon b  
qE – Energeticky závislé nefotochemické zhášení  
qN – Nefotochemické zhášení  
qP – Fotochemické zhášení  
RC – Reakční centrum  
ROS – Reaktivní formy kyslíku  
SP – Saturační puls  
V – Violaxantin  
VDE – Violaxantin-deepoxidáza  
WT – Wild type (*Arabidopsis thaliana*)  
Y<sub>Z</sub> - Tyrosin  
Z – Zeaxantin

## OBSAH

1. ÚVOD .....	1
2.FOTOSYNTETICKÝ APARÁT .....	2
2.1. Lineární elektronový transport .....	3
2.2.Cyklický elektronový transport .....	4
2.3. Fotochemické a nefotochemické procesy fotosyntézy .....	5
3. FOTOSYNTETICKÝ APARÁT A VYSOKOTEPLTNÍ STRES .....	8
3.1. Elektronový transport při zvýšené teplotě .....	9
3.2. Zhášecí mechanismy rostlin za vysokoteplotního stresu .....	10
4. MATERIÁL A METODY .....	11
5. VÝSLEDKY MĚŘENÍ .....	14
5.1. Vliv předehřevu na fotochemii PSII a indukci qE .....	14
5.2.Závislost qE na AL u kontrolních a přehřátých vzorků .....	21
5.3 Závislost Y(II) na čase u kontrolních a přehřátých vzorků .....	23
6. DISKUZE .....	29
7. ZÁVĚR .....	31
8. SEZNAM LITERATURY .....	31

# 1. Úvod

Rostliny jsou všude kolem nás, jen málokdo si však připouští, do jaké míry ovlivňují náš život. Přestože se z laického pohledu zdá, že nic důležitého nedělají, při podrobnějším průzkumu zjistíme pravý opak. Probíhá v nich totiž celá řada procesů, které jsou pro lidský život naprosto nepostradatelné a které souvisí zejména s produkcí kyslíku, biomasy a látek, které si živočichové nejsou schopni sami syntetizovat.

V této práci se zaměříme pouze na jeden z těchto procesů. Nazývá se fotosyntéza, která je známa především jako proces, při němž je energie světla přeměněna na energii chemických vazeb. Rostliny při fotosyntéze získávají energii potřebnou ke svému životu a současně i k životu ostatních organismů. Jejím odpadním produktem je kyslík, nezbytný pro dýchání většiny živočichů, s výjimkou některých anaerobních mikroorganismů. Fotosyntéza je zcela jedinečným dějem, který v přírodě dosud nebyl mimo rostlinné organismy pozorován.

Rostliny náš život ovlivňují i mnoha dalšími způsoby, jejichž podrobný popis by sám o sobě vystačil na více než jednu takovouto práci. Důležitým závěrem zůstává skutečnost, že bez fotosyntetických dějů v rostlinách by život na Zemi zanikl. Jakožto hlavní producenti kyslíku a zdroj potravy pro nás rostliny prozatím zůstávají zcela nenahraditelné.

Procesy uvnitř rostlin jsou do značné míry ovlivněny okolními podmínkami, kterým je rostlina vystavena. Mezi ně patří například intenzita světla, teplota, zásaditost či kyselost půdy, dostupnost vody, atd. Znalost působení těchto vlivů na průběh fotosyntézy může nejen rozšířit obzory lidského poznání, ale mít i praktický dopad například na zemědělství. Je známo, že průměrná globální teplota se na naší planetě každoročně zvyšuje. Tato zvýšená teplota se teoreticky může negativně projevit na průběhu fotosyntézy a tím pádem mít vliv i na růst rostlin.

Této problematice se týká i tato práce, jejímž cílem je pozorování změn fotosyntetických parametrů za působení vysokoteplotního stresu a vybraných intenzit světla. Regulační mechanismy, které se ve fotosyntéze uplatňují při působení těchto dvou parametrů prostředí, nejsou stále příliš probádané a jejich objasnění může být užitečné při mnoha teoretických či praktických aplikacích.



## 2. Fotosyntetický aparát

K popsání průběhu fotosyntézy je třeba nejprve určit, kde vlastně probíhá. Světlo ze Slunce zachytává rostlina svými listy. Tkáň listu je tvořena rostlinnými buňkami, obsahujícími mnoho buněčných organel. Z hlediska fotosyntézy jsou podstatné zejména organely zvané chloroplasty, se kterými je třeba se pro další výklad seznámit důkladněji.

Chloroplast je semiautonorní organela, v jejímž nitru se nacházejí membránové struktury zvané tylakoidy. Podle tvaru můžeme rozlišit dva různé typy tylakoidů. Prvním z nich jsou zploštělé váčkovité struktury naskládané na sobě a dohromady tvořící válcovité struktury zvané grana. Druhým jsou stromální lamely, což jsou protáhlé výběžky spojující jednotlivé skupiny gran. Prostor uvnitř tylakoidů se nazývá lumen, prostor vně nese jméno stroma.

V tylakoidních membránách se nalézají integrální světlosběrné antény a integrální proteinové komplexy, které dohromady tvoří fotosyntetický aparát: fotosystém II (PSII) se svým světlosběrným komplexem (LHCII), cytochrom  $b_6f$  komplex (Cyt  $b_6f$ ), fotosystém I (PSI) se svým světlosběrným komplexem (LHCI) a ATP-syntáza (Nelson and Yocum, 2006). Tyto proteinové komplexy se uplatňují při transportu elektronů a protonů přes tylakoidní membránu, jak je popsáno dále.

Průběh fotosyntézy můžeme rozdělit na dvě fáze: primární (světelnou) a sekundární (temnostní). Primární fáze fotosyntézy probíhá pouze za přítomnosti světla, jehož energie umožňuje transport elektronů z lumenu skrz tylakoidní membránu do stromatu, kde jsou využity k tvorbě NADPH. Současně se v lumenu zvyšuje koncentrace protonů  $H^+$ , které jsou následně přečerpávány do stromatu přes ATP-syntázu a díky tomu dochází k tvorbě ATP.

Sekundární fáze fotosyntézy probíhá ve stromatu. Zahrnuje v sobě řadu chemických reakcí, při kterých dochází k fixaci oxidu uhličitého a využití energie uložené v NADPH a ATP. Ačkoli tedy ke svému průběhu světlo přímo nepotřebuje, je závislá na výsledných produktech světelné fáze fotosyntézy. Jelikož obsahem této práce je pozorování vlivu vysokoteplotního stresu na průběh primární fáze fotosyntézy, nebude zde průběh sekundární fáze detailněji rozebírán.

## 2.1. Lineární elektronový transport

Lineární elektronový transport elektronů začíná na úrovni PSII. Tento pigment-proteinový komplex, nacházející se v granální části tylakoidní membrány, má na lumenální straně umístěn komplex vyvíjející kyslík (OEC). Jedná se o manganový komplex, schopný štěpit molekuly vody na elektrony, protony  $H^+$  a kyslík  $O_2$ . Přitom se OEC postupně dostává ze základního stavu  $S_0$  do čtyř S-stavů, které odpovídají uvolňování jednotlivých elektronů. Po rozštěpení dvou molekul vody dojde v OEC opět k přechodu na základní stav  $S_0$ . Elektrony z OEC přecházejí na tyrosin  $Y_Z$ , donor PSII.

Reakční centrum (RC) PSII je tvořeno speciálním párem chlorofylu *a* s maximem absorpce světla o vlnové délce 680 nm. Proto se toto RC nazývá P680. Do něj je dodávána zachycená světelná energie z LHCI proteinů, které obsahují (podobně jako LHCI) pigmenty, mezi které patří chlorofyly a karotenoidy. Díky dodané energii se P680 dostane do excitovaného stavu ( $P680^*$ ). Stává se redukantem a předává elektron na feofytin *a*, derivát chlorofylu sloužící jako primární akceptor PSII. V  $P680^*$  pak ale chybí elektron a stává se silným oxidantem. Chybějící elektron se doplní z tyrosinu  $Y_Z$ .

PSII má dvě větve, po kterých by se elektron z  $P680^*$  mohl vydat dál. Jedna z těchto větví je díky svému konformačnímu uspořádání nefunkční (Nelson and Yocum, 2006) a elektrony jsou dále přenášeny pouze po funkční větvi. Ta v sobě zahrnuje přesun elektronu z  $P680^*$  na feofytin, který redukuje nepohyblivý plastochinon  $Q_A$  a ten zase redukuje plastochinon  $Q_B$ .

Plastochinon  $Q_B$  je dvouelektronovým přenašečem. Po přijetí obou elektronů se na něj naváží dva protony  $H^+$  ze stromatu a vzniká plastohydrochinon  $PQH_2$ . Ten je schopen pohybu v tylakoidní membráně k Cyt  $b_6f$  komplexu, který se vyskytuje v granech i stromálních lamelách. Cyt  $b_6f$  komplex je schopen přijmout oba elektrony, nikoli však protony  $H^+$ , které jsou z  $PQH_2$  uvolněny do lumenu.

Elektrony dodané do Cyt  $b_6f$  komplexu dále pokračují dvěma odlišnými cestami. Jeden z elektronů putuje přes cytochrom *b* a je dodán zpět na  $Q_B$ , který na sebe po přijmutí dvou elektronů naváže protony  $H^+$  ze stromatu a znovu interaguje s Cyt  $b_6f$ . Tento zacyklený transport se nazývá Q-cyklus. Druhý elektron přechází na Rieske FeS protein, jednoelektronový železnosíratý přenašeč. Ten redukuje cytochrom *f*, ze kterého elektrony putují na plastocyanin (PC). PC je ve vodě rozpustný protein schopný pohybu v lumenu, kde plní funkci donoru elektronů PSI.

PSI je stejně jako PSII pigment-proteinovým komplexem, oproti němu se však nachází převážně ve stromálních lamelách. RC PSI tvoří speciální pár chlorofylu *a*. Toto RC se označuje jako P700, neboť jeho maximální absorpce světla se pohybuje okolo 700 nm. Světlo PSI zachycuje pomocí LHCI, které světelnou energii transportuje do P700, které se dostává do excitovaného stavu P700\*.

P700\* je velmi silným reduktantem, který redukuje speciální chlorofylové molekuly  $A_0$ , sloužící jako elektronový akceptor PSI. Z  $A_0$  elektron přechází na fylochinon  $A_1$ , známý jako vitamín K. Následují redoxní reakce, při nichž dochází k postupnému přesunu elektronu na pevně vázané železnosíraté struktury  $F_x$ ,  $F_A$  a  $F_B$ . Z nich poté elektron putuje na ferredoxin (Fd), který se váže na stromální straně PSI.

Fd je další železnosíratá struktura, ale narozdíl od  $F_x$ ,  $F_A$  a  $F_B$  není pevně vázána na PSI. Poté, co je Fd redukován, se z PSI vyváže a putuje do stromatu. Tam dochází k redukcí enzymu ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-oxidireduktázy (FNR), které redukuje NADP<sup>+</sup> za vzniku NADPH. Oxidovaný Fd se vrací zpět k PSI.

Během lineárního elektronového transportu stoupá v lumenu koncentrace protonů  $H^+$ . Je tomu tak zejména díky činnosti OEC, PQH<sub>2</sub> a činnosti Cyt  $b_6f$  komplexu. Protony  $H^+$  jsou přečerpávány zpět do stromatu pomocí ATP-syntázy. Přečerpávání funguje na principu elektrochemického gradientu a jeho výsledkem je kromě snížení koncentrace protonů  $H^+$  v lumenu také tvorba ATP.

Princip lineárního elektronového transportu tedy spočívá v odebrání elektronů z vody a jejich využití na tvorbu na NADPH za pomoci proteinových komplexů PSII, PSI a Cyt  $b_6f$  komplexu. Zvýšené koncentrace protonů  $H^+$  je využita k tvorbě ATP díky ATP-syntáze, která zároveň protony přečerpává zpět do stromatu. Získané molekuly NADPH a ATP jsou následně využity v sekundární fázi fotosyntézy.

## 2.2. Cyklický elektronový transport

V případě nadměrné ozáření rostliny či vlivem působení jiných negativních faktorů může nastat situace, kdy je veškeré NADP<sup>+</sup> přeměněno na NADPH. FNR je díky tomu zcela redukován, čímž dochází k akumulaci redukováného Fd. V takovém případě dochází k aktivaci cyklického elektronového transportu okolo PSI.

Při cyklickém elektronovém transportu jsou elektrony předávány zpět na  $Q_B$ . Může k tomu dojít převážně dvěma následujícími způsoby. První z nich využívá

ferredoxin-plastochinon-oxidoreduktázu, která odebírá elektrony z redukováného Fd a předává je na plastochinon Q<sub>B</sub>. Druhá možnost vyžaduje NADPH-dehydrogenázový komplex, který odebírá elektrony z Fd a opět je předává na plastochinon Q<sub>B</sub> (Sharkey, 2005; Nelson a Yocum, 2006; Yamamoto *et al.*, 2011).

Tyto dva mechanismy umožňují přečerpát do lumenu více protonů H<sup>+</sup>. Díky tomu jejich koncentrace v lumenu začne stoupat a zvýší se tak protonový transport skrze ATP-syntázu. Díky tomu dochází k značné tvorbě ATP na úkor NADPH.

Pokud elektrony na zredukovaném Fd zůstávají nevyužity, může dojít k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). Ty mohou poškodit tylakoidní membránu, okolní proteiny či inhibovat fotosyntetické procesy (Yamamoto *et al.*, 2008). Ačkoli cyklický elektronový transport v mnoha případech tvorbu ROS zamezí, při velmi vysoké ozáření nemusí být jeho výkon postačující. V takovém případě jsou obvykle aktivovány další ochranné mechanismy, které ROS včas odstraní.

Cyklický elektronový transport tedy při vyšší ozáření vrací elektrony na plastochinon Q<sub>B</sub> a v důsledku toho zvyšuje tvorbu ATP na úkor NADPH. Současně zamezuje tvorbě ROS, čímž chrání fotosyntetický aparát před fotooxidativním poškozením.

### **2.3. Fotochemické a nefotochemické procesy fotosyntézy**

Světlo zachycené rostlinou není využito pouze na fotochemické procesy. Část absorbované světelné energie může být vyzářena ve formě fluorescence nebo přeměněna na teplo. Výše uvedené procesy (fotochemie, fluorescence a konverze na teplo) se projevují v různé míře v závislosti na okolních podmínkách (Baker, 2008; Ashraf and Harris, 2013).

Emitovaná fluorescence indikuje míru neschopnosti rostlin využít přijatou světelnou energii na fotochemické reakce, ať už vlivem nadměrné ozáření, působením herbicidů či dalších faktorů. Většina fluorescence naměřené za pokojové teploty (25 °C) pochází z PSII a je velmi užitečným ukazatelem průběhu fotosyntézy. Z časové závislosti intenzity fluorescence lze nadefinovat celou řadu fluorescenčních parametrů. S vybranými parametry se blíže seznámíme v následujícím textu.

Pojem fotochemie vyjadřuje využití energie světla v lineárním elektronovém transportu. Její účinnost se nazývá kvantový výtěžek fotochemie a stanoví se jako

poměr  $F_V/F_M$ , kde  $F_M$  značí maximální fluorescenci rostliny po adaptaci na tmu při použití excitačního světla o vysoké intenzitě a  $F_V$  značí variabilní fluorescenci. Hodnotu  $F_V$  získáme jako rozdíl  $F_M$  a  $F_0$ , kde  $F_0$  značí minimální fluorescenci rostliny po adaptaci na tmu při použití excitačního světla o velmi nízké intenzitě. Takto získaný maximální kvantový výtěžek fotochemie se u rostlin pohybuje okolo 0,8 a v důsledku působení stresových faktorů se snižuje. S fotochemií souvisí fotochemické zhášení fluorescence qP, charakterizující míru úbytku fluorescence vlivem fotochemických reakcí.

V závislosti na světelných podmínkách a působení stresu můžeme považovat PSII za uzavřený (redukováné  $Q_A$ ) či otevřený (oxidované  $Q_A$ ). Otevřenost či uzavřenost PSII je charakterizována Gentiho parametrem  $Y(II)$ . Je-li PSII otevřený ( $Y(II) = 1$ ), lineární elektronový transport na úrovni PSII pracuje bez obtíží a fluorescence je zhášena výhradně fotochemickou cestou. Pokud je PSII uzavřený ( $Y(II) = 0$ ), je  $Q_B$  plně redukováné. V důsledku toho elektrony z  $Q_A$  nemohou pokračovat dále a fluorescence je zhášena pouze nefotochemickou cestou. Pokud se hodnota  $Y(II)$  pohybuje mezi 0 a 1, je fluorescence chlorofylu zhášena současně fotochemicky i nefotochemicky.

Při vyšší ozáření rostliny může díky stoupající koncentraci protonů  $H^+$  dojít k okyselení lumenu, které aktivuje signální dráhy vedoucí k procesům způsobujícím zefektivnění nefotochemického zhášení fluorescence označovaného jako NPQ. Koeficient NPQ nám charakterizuje úbytek fluorescence vlivem přeměny nevyužité absorbované energie na teplo. Nefotochemické zhášení NPQ se skládá z několika komponent, které se označují qE, qI a qT (Baker, 2008; Horton, 2012).

Parametr qT charakterizuje pomalé nefotochemické zhášení v důsledku stavových přechodů, kdy plně redukováné  $Q_B$  aktivuje enzym kinázu. Působením kinázy se část LHCIII odpojí od PSII a připojí se k PSI. Díky tomu se sníží aktivita PSII a urychlí se činnost PSI, což vede ke snížení intenzity fluorescence. Nefotochemické zhášení qT se aktivuje až po dlouhodobějším působení stresových faktorů.

Parametr qI udává nefotochemické zhášení v důsledku fotoinhibice. Při dlouhodobém působení stresových faktorů může dojít k poškození proteinů spojených s elektronovým transportem. Poškozené proteiny jsou nahrazeny novými proteiny. Nefotochemické zhášení qI je dlouhodobějšího charakteru (hodiny až dny).

Parametr qE označuje energetické nefotochemické zhášení, vznikající zejména v důsledku konformačních změn vyvolaných xantofylovým cyklem a PsbS proteinem

(Pospíšil, 1997; Li *et al.*, 2000; Baker, 2008; Ilík *et al.*, 2010; Horton, 2012). Tyto konformační změny nastávají v důsledku nadměrného okyselení lumenu. Jedná se o hlavní složku NPQ a k její aktivaci dochází krátce po začátku působení stresových podmínek. Jelikož se tato práce zabývá vlivem zvýšené teploty na fotosyntetický aparát pouze z krátkodobého hlediska, má v dalším textu smysl hovořit pouze o nefotochemickém zhášení qE.

Pigmenty v světlosběrných komplexech vyšších rostlin můžeme rozdělit na chlorofyly a karotenoidy. Karotenoidy rozšiřují absorpční spektrum chlorofylu, ovšem jejich důležitost spočívá zejména v jejich ochranné funkci. Karotenoidy můžeme rozdělit na karoteny (bezkyslíkaté) a xantofyly (kyslíkaté).

Obecně spočívá ochranná funkce karotenoidů v přebírání zachycené světelné energie z chlorofylů v tripletním stavu. Tím tyto chlorofyly navrátí do singletního stavu a současně tak brání vzniku nebezpečného singletního kyslíku, který může vzniknout interakcí tripletního kyslíku a tripletního chlorofylu. Pokud už k tvorbě singletního kyslíku došlo, jsou karotenoidy schopné přijímat energii i z něj a navracet tak kyslík do tripletního stavu. Nezávisle na tom, který ze dvou výše uvedených případů nastane, se karotenoid dostane do tripletního stavu, ve kterém je schopen přeměnit dodanou energii na teplo a navrátit se zpět do singletního stavu (Pospíšil, 1997).

V lumenu je přítomen enzym zvaný violaxantin-deepoxidáza (VDE), který je při neutrálním pH lumenu mobilní. Při okyselení lumenu se však naváže na thylakoidní membránu. Současně dochází k vyvázání violaxantinu (V) z LHCI do lumenu. Tam je s pomocí VDE a s využitím askorbátu transformován na anteraxantin (A) a následně na zeaxantin (Z). Poté se Z naváže zpátky na místo, kde se původně nacházel V a způsobí tím konformační změny vedoucí k snadnějšímu přenosu energie na karotenoidy, kde je přeměněna na teplo. Tento děj je známý jako xantofylový cyklus a umožňuje efektivnější nefotochemické zhášení fluorescence pomocí karotenoidů (Horton, 2012; Ashraf and Harris, 2013).

Konformační změny LHCI mohou nastat také v případě protonace PsbS proteinu, který se nachází v blízkosti PSII (Li *et al.*, 2004). Tyto konformační změny LHCI opět vedou ke tvorbě zhášecích center, což vede k účinnějšímu přenosu energie na karotenoidy a tím zefektivňují nefotochemické zhášení fluorescence (Baker, 2008; Horton, 2012). Společně se zeaxantinem je PsbS protein hlavním činitelem

energetického nefotochemického zhášení  $qE$ . Parametr  $qE$  je závislý zejména na pH v lumenu a odráží míru aktivního nefotochemického zhášení fluorescence pomocí zeaxantinu a PsbS proteinu (Baker, 2008; Horton, 2010; Sharkey and Zhang, 2010).

Světelná energie zachycená v LHC je tedy rostlinou primárně využita k fotochemii. Při nevhodných podmínkách však může být zpětně vyzářena ve formě fluorescence. Fluorescence je zhášena fotochemicky ( $qP$ ) a nefotochemicky (NPQ). Při nefotochemickém zhášení dochází v důsledku konformačních změn vyvolaných xantofylovým cyklem a PsbS proteinem k přeměně fotochemicky nevyužité energie na teplo.

### 3. Fotosyntetický aparát a vysokoteplotní stres

Průběh fotosyntézy může být ovlivněn celou řadou stresových faktorů, které můžeme rozdělit na biotické a abiotické. Biotický stres je způsoben přímým ohrožením rostliny jinými druhy organismů (býložravci, paraziti, patogeny, atd.) a není v této práci detailněji rozebírán. Abiotickým stresem pak myslíme veškeré fyzikální a chemické působení s negativním dopadem na rostlinu. Příkladem abiotického stresu je nadměrná ozářenost či vysokoteplotní stres. Tato kapitola je zaměřena na problematiku vysokoteplotního stresu a jeho působení na průběh fotochemických reakcí.

Odolnost rostlin vůči vysokým teplotám je dána jejich růstovými podmínkami. Rostliny vyrůstající v prostředí o vyšších teplotách mají větší termotoleranci (schopnost odolávat teplotním vlivům), než rostliny vyrůstající za chladnějších podmínek. Toto déletrvající přizpůsobení je pravděpodobně způsobeno tvorbou proteinů teplotního šoku (HSP), které jsou situovány do tylakoidní membrány a poblíž ostatních proteinů. Je známo, že HSP proteiny zvyšují odolnost rostliny vůči vysokým teplotám až o několik stupňů a brání tak fotosyntetický aparát před působením vysokoteplotního stresu (Allakhverdiev *et al.*, 2008).

V případě, že rostlina není schopna nadále odolávat zvýšené teplotě, je výrazně ovlivněn lineární elektronový transport a struktura fotosyntetického aparátu. První změny jsou pozorovány v rozmezí teplot 35–40 °C (Sharkey, 2005), kdy sice nedochází k žádnému výraznému poškození, avšak elektronový transport skrze PSII slábne.

V rozmezí teplot 40-50 °C poté dochází k inhibici OEC a poškození donorové strany PSII, (Lípová *et al.*, 2010). V důsledku tohoto poškození fotochemie klesá a dochází k nárůstu fluorescence. Po inhibici OEC jsou zřejmě využívány sekundární zdroje elektronů, mezi které patří například askorbát (Sharkey, 2005; Ilík *et al.*, 2010).

Při teplotách 50-57 °C vzrůstá nefotochemické zhášení fluorescence. Okolo 60 °C však dochází k degeneraci PSII, jehož jádro při této teplotě denaturuje. V tomto případě už jsou změny fotosyntetického aparátu považovány za nevratné. Při teplotách 60-90 °C dojde k degeneraci LHCI (70-80 °C) a kompletní ztrátě fotochemie PSII (Yamamoto *et al.*, 2008; Lípová *et al.*, 2010).

Ukazuje se, že PSI má mnohem větší termostabilitu, než PSII. Zatímco v rozsahu teplot 40-60 °C dochází na úrovni PSII k poměrně zásadním změnám, struktura a funkce PSI není nijak výrazně ovlivněna. První výraznější změny zde nastávají mezi



60-70 °C, kdy dochází k odpojení LHCI od jádra PSI. K denuraci PSI dochází v poměrně širokém intervalu 70-90 °C (Lípová *et al.*, 2010).

Vliv vysokoteplotního stresu na rostliny se také projevuje například vznikem ROS, inhibicí činnosti Rubisca či rozpadem tylakoidních membrán (Sharkey, 2005). Aby k rozpadu tylakoidních membrán v případě vyšších teplot nedocházelo, zvýší se podíl nenasycených mastných kyselin v lipidové dvojvrstvě a fluidita membrány (která s teplotou vzrůstá) se sníží.

Ukazuje se tedy, že fotosyntetický aparát je vyššími teplotami ovlivněn negativně, přičemž PSII je k poškození náchylnější než PSI. Následující kapitoly tématicky sledují zejména změny v lineárním a cyklickém elektronovém transportu u rostlin, které jsou vystaveny ozáření a vysokoteplotnímu stresu okolo 40 °C.

### **3.1. Elektronový transport při zvýšené teplotě**

Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, při teplotách 35-40 °C dochází na úrovni PSII k poklesu aktivity lineárního elektronového transportu. To je způsobeno inhibicí OEC, který vlivem teploty ztrácí 2 ze 4 atomů Mn (Allakhverdiev *et al.*, 2008; Ashraf and Harris, 2013). V takovém případě již není možné získávat elektrony štěpením vody a bývá využíváno sekundárních donorů elektronů. V rozmezí teplot 40-60 °C se však lineární elektronový transport skrze PSII postupně zastavuje až se při 60 °C zastaví úplně. To znamená, že energie zachycená v LHCII z větší části nebude využita na fotochemii a namísto toho bude vyzářena ve formě fluorescence či přeměněna na teplo.

Od PSII elektrony pokračují přes dvouelektronový přenašeč PQH<sub>2</sub> skrze tylakoidní membránu do Cyt b<sub>6</sub>f komplexu. Vliv teplotního stresu na Cyt b<sub>6</sub>f komplex není příliš probádaný (Sharkey, 2005), ale lze u něj předpokládat vysokou termostabilitu. Z Cyt b<sub>6</sub>f komplexu elektrony putují přes PC na PSI. Ukazuje se, že PSI je výrazně redukováný, a to i v případě nefunkčního PSII. Důvodem je teplotní stimulace cyklického elektronového transportu, jehož činnost se jeví jako výrazně zrychlená (Sharkey and Zhang, 2010).

Jelikož je PSI plně redukováné, musí po určité době dojít k přeměně veškerého NADP<sup>+</sup> na NADPH. Z toho plyne, že FNR i Fd jsou také plně redukováné a nemohou předat elektrony dále, přičemž zde hrozí nebezpečí vzniku ROS. Vzhledem k teplotní

inhibici Rubisco-aktivázy dochází k akumulaci NADPH. Vzhledem k zrychlené činnosti cyklického elektronového transportu by se také dala usuzovat zvýšená tvorba ATP pomocí ATP-syntázy. Ukazuje se však, že množství ATP je během vysokoteplotního stresu udržováno na přibližně stejné hladině (Sharkey and Zhang, 2010).

Efektivnější cyklický elektronový transport také umožňuje rychlejší přečerpání protonů  $H^+$  do lumenu a tím pádem i rychlejší aktivaci nefotochemického zhášení qE (Ilík *et al.*, 2010). Změny pH v lumenu a stromatu mohou také souviset se vzájemným oddalováním tylakoidů (Yamamoto *et al.*, 2008).

U rostlin vystavených teplotnímu stresu je tedy elektronový transport na úrovni PSII výrazně zpomalen či úplně zastaven, zatímco činnost PSI se díky urychlenému cyklickému elektronovému transportu výrazně zefektivňuje. To má za důsledek značnou akumulaci NADPH a nárůst nefotochemického zhášení qE.

### **3.2. Zhášecí mechanismy rostlin za vysokoteplotního stresu**

Výrazné zeslabení aktivity PSII při vysokoteplotním stresu vede při ozáření rostliny k nárůstu fluorescence, neboť energie zachycená v LHCII je na fotochemii využita minimálně a fotochemické zhášení je velmi slabé. Na druhou stranu se díky zrychlenému elektronovému transportu okolo PSI dostává do lumenu značné množství protonů  $H^+$ , což má za následek rychlou aktivaci nefotochemického zhášení qE.

V současné době není zcela objasněno, jakou měrou se na teplotní stimulaci qE podílí konverze violaxantinu na zeaxantin a PsbS protein. Předpokládá se, že za nižších intenzit světla (slabšího okyselení lumenu) se na teplotně stimulované indukci nefotochemického zhášení podílí zejména zeaxantin, zatímco při vyšších intenzitách světla (silnější okyselení lumenu) se při indukci qE uplatní i PsbS protein. Tato hypotéza však stále nebyla experimentálně potvrzena. Z tohoto důvodu není také zcela jasné, do jaké míry spolu zeaxantin a PsbS protein spolupracují a jakou měrou se podílí na teplotní stimulaci qE. Předpokládá se, že tyto dvě složky qE nemusejí nutně pracovat společně (Ilík *et al.*, 2010).

Tato práce si klade za úkol zjistit, jakou měrou se podílí zeaxantin a PsbS protein na teplotní stimulaci qE indukovaného světlem o různé intenzitě u *Arabidopsis thaliana* a vybraných mutantů.

## 4. Materiál a metody

### A) Rostlinný materiál

Měření probíhalo na rostlinách *Arabidopsis thaliana* (WT, Columbia) a jejích mutantech *npq1* (absence zeaxantinu), *npq2* (bez zpětné konverze zeaxantinu na violaxantin), *npq4-1* (absence PsbS proteinu) a L17 (nadměrná exprese PsbS proteinu). Rostliny byly pěstovány v režimu krátkého dne (8/16-h den/noc) při intenzitě  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , teplotě 21 °C a vzdušné vlhkosti 40 %. Po adaptaci rostliny na tmu (10 min) byly odstřiženy a proměřeny vybrané zdravé listy.

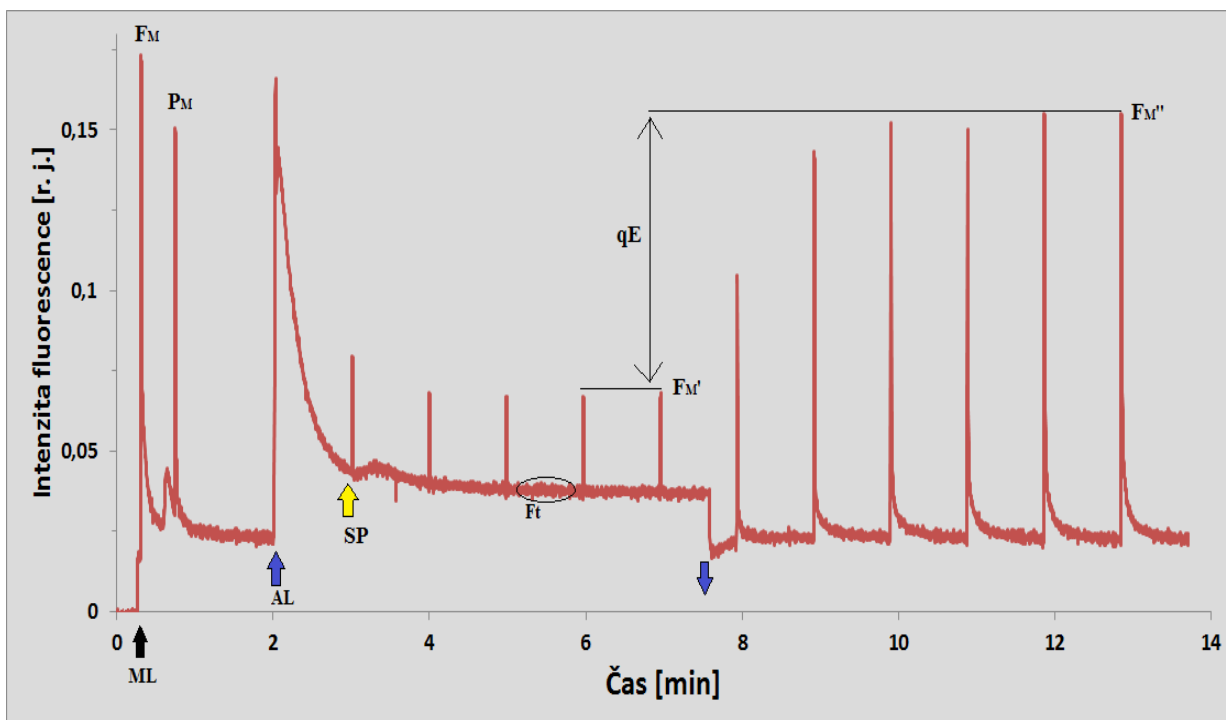
### B) Uspořádání měřící aparatury

Při návrhu experimentů se vycházelo z práce Ilíka *et al.* (2010) s drobnými úpravami. Měření intenzity fluorescence chlorofylu, nefotochemického zhášení qE a Gentiho parametru Y(II) probíhalo na přístroji Dual-PAM-100 (Waltz, Effeltrich, Německo). List rostliny byl pevně uchycen ve speciálním držáčku, se kterým byl umístěn do kyvety s destilovanou vodou, vyměňovanou po každém měření. Svrchní část listu byla situována co nejbližší měřící hlavě detekující signál z P700, naproti které se nacházela druhá měřící hlava. Měření probíhalo v temné místnosti, za přítomnosti zeleného světla. Teplota v kyvetě byla kontrolována pomocí zařízení Thermoregulator TR 2000 (Photon System Instruments, Brno, Česká republika), díky kterému byla teplota vody v kyvetě udržována na 25 °C. Aby měla voda stejnou teplotu v celém svém objemu, byla současně rozmíchávána pomocí malého míchadla.

### C) Postup měření indukce chlorofylové fluorescence

Měření časové závislosti intenzity fluorescence chlorofylu probíhalo dle schématu uvedeného na obrázku č. 1. Na listu byla po zapnutí měřícího světla (ML), změřena maximální fluorescence  $F_M$  z PSII a maximální intenzita signálu  $P_M$ , který je úměrný redoxnímu stavu PSI. Následovala světelná fáze, která se sestávala ze zapnutí aktinického světla (AL) o různé intenzitě (13, 22, 53, 95, 216, 430 a  $1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) spojeného s aplikací šesti saturačních pulsů (SP), které byly aplikovány každou minutu. Poté bylo AL vypnuto a následovala temnostní fáze, ve které bylo při zapnutém ML aplikováno dalších šest SP. Fluorescence PSII byla vybuzena červeným excitačním světlem o vlnové délce 635 nm, pocházejícím z 24 LED diod. Signál z P700 byl

vyhodnocen jako rozdíl propustnosti světla rostlinou při vlnových délkách 830 nm a 875 nm. Intenzita saturačních pulzů byla  $10000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a jeho délka byla 800 ms.



**Obrázek č. 1:** Průběh měření závislosti fluorescence PSII na čase, určení parametrů  $F_M$ ,  $P_M$ ,  $F_M'$ ,  $F_M''$ ,  $F_t$  a  $qE$ . (Černá šipka – ML; Modrá šipka – AL; Žlutá šipka – SP)

#### D) Předehřev vzorku

Předehřev temnostně adaptovaných listů rostlin probíhal při teplotě  $40\text{ }^\circ\text{C}$  v teplotní lázni Polystat (Cole Parmer, Vernon Hills, USA) po dobu 5 minut. Poté byly prudce zchlazeny na  $25\text{ }^\circ\text{C}$  a proměřeny na přístroji Dual PAM-100 stejným způsobem, jako nepředehřáté vzorky. Listy rostlin sem byly i s držáčkem přemísťovány v termosce.

#### E) Analýza chlorofylové fluorescence

Data získaná z měření na přístroji Dual PAM-100 byla vyhodnocena v MS Excel. Pro porovnání závislosti intenzit fluorescence PSII na čase byly u jednotlivých variant (kontrolní i předehřáté) vybrány pro intenzity AL 13, 95 a  $1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  reprezentativní výsledky, graficky zobrazené v následující kapitole. Pro intenzitu AL  $13 \mu\text{mol}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  byly vykresleny vybrané pulsy, zachycující měření maximální intenzity fluorescence  $F_M$  po adaptaci na tmu v lepším časovém rozlišení.

Hodnoty energetického nefotochemického zhášení  $qE$  byly určeny ze vztahu

$$qE = NPQ_2 - NPQ_1, \quad (1)$$

kde  $NPQ_1$  je nefotochemické zhášení na konci světelné fáze a  $NPQ_2$  je nefotochemické zhášení na konci temnostní fáze. Hodnoty  $NPQ_1$  a  $NPQ_2$  byly určeny ze vztahů

$$NPQ_1 = \frac{F_M - F_{M'}}{F_{M'}}, \quad (2)$$

$$NPQ_2 = \frac{F_M - F_{M''}}{F_{M''}}, \quad (3)$$

kde  $F_M$  je maximální intenzita fluorescence,  $F_{M'}$  je maximální intenzita fluorescence na konci světelné fáze a  $F_{M''}$  je maximální intenzita fluorescence na konci temnostní fáze. Ze tří měření u dané varianty (předehřáté i kontrolní) při dané intenzitě byla vždy vypočtena průměrná hodnota  $qE$ , ke které byla stanovena její směrodatná odchylka.

Hodnoty Gentiho parametru  $Y(II)$  byly určeny ze vztahu

$$Y(II) = \frac{F_{m'} - F}{F_{m'}}, \quad (4)$$

kde je při světelné či temnostní fázi  $F_{m'}$  intenzita fluorescence při aplikaci saturačního pulzu a  $F$  intenzita fluorescence před aplikací saturačního pulzu. Ze tří měření u dané varianty (předehřáté i kontrolní) byla při dané intenzitě vždy vypočtena průměrná hodnota  $Y(II)$ , ke které byla stanovena její směrodatná odchylka.

## **F) Určení závislosti signálu z PSI na čase**

Součástí této práce bylo také měření redoxního stavu P700. Obdržené výsledky však nebyly díky vysokému šumu průkazné a reprodukovatelné a proto nejsou v této práci uvedeny. Tato skutečnost plyne z experimentálního uspořádání měřicí aparatury. Signál z PSI je slabý i za běžných podmínek. Uspořádání měřicí aparatury bylo takové, že vzdálenost mezi listem a detekcí signálu byla zvětšena o tloušťku skleněné kyvety a držáku vzorku, což vedlo k dalšímu zeslabení a zašumění detekovaného signálu.

## 5. Výsledky měření

Cílem experimentu bylo určit vliv kombinace vysokoteplotního stresu a různých intenzit světla na PSI a PSII u WT *Arabidopsis thaliana* a od ní odvozených mutantů *npq1* (absence zeaxantinu), *npq2* (bez zpětné konverze zeaxantinu na violaxantin), *npq4-1* (absence PsbS proteinu) a L17 (nadměrná exprese PsbS proteinu). Bylo zkoumáno zejména energeticky závislé nefotochemické zhášení qE, které má původ v konformačních změnách vzniklých v důsledku aktivace xantofilového cyklu a protonace PsbS proteinu (např. přehledný článek Ruban *et al.*, 2010). Porovnávány byly předeřáté a kontrolní vzorky, adaptované na tmu.

### 5.1. Vliv předehřevu na fotochemii PSII a indukci qE

Časová závislost intenzity fluorescence byla měřena u kontrolních a předeřátých vzorků WT (obr. č.2), *npq1* (obr. č.3), *npq2* (obr. č.4), *npq4-1* (obr. č.5) a L17 (obr. č. 6). V levém sloupci (označeno 25°C) jsou vždy zobrazeny kontrolní vzorky, v pravém předeřáté vzorky (40 °C). První řádek zachycuje fluorescenci při aktinickém světle  $13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , druhý při  $95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a třetí při  $1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Pro první řádek ( $13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) byl zobrazen i průběh prvního pulzu po adaptaci na tmu. Lepší časové rozlišení u tohoto pulzu umožňuje určit, zda-li během pulzu byla dosažena saturační hodnota  $F_M$ .

Na obrázku č. 2 se nachází graf závislosti intenzity fluorescence na čase pro WT. U předeřátých i kontrolních vzorků můžeme se zvyšující se intenzitou AL pozorovat nárůst v intenzitě fluorescence  $F_t$ , kdy tento nárůst je výraznější u kontrolních vzorků. Obdobně je tomu i u průběhů  $F_M'$  a  $F_M''$ , kdy u kontrolních vzorků lze zaznamenat nižší zhášení  $F_M'$ , než u vzorků předeřátých. Detailnější rozbor prvního pulzu po adaptaci na tmu ukazuje, že po předehřevu je nárůst do saturační hodnoty  $F_M$  pomalejší, než je tomu u kontrolního vzorku.

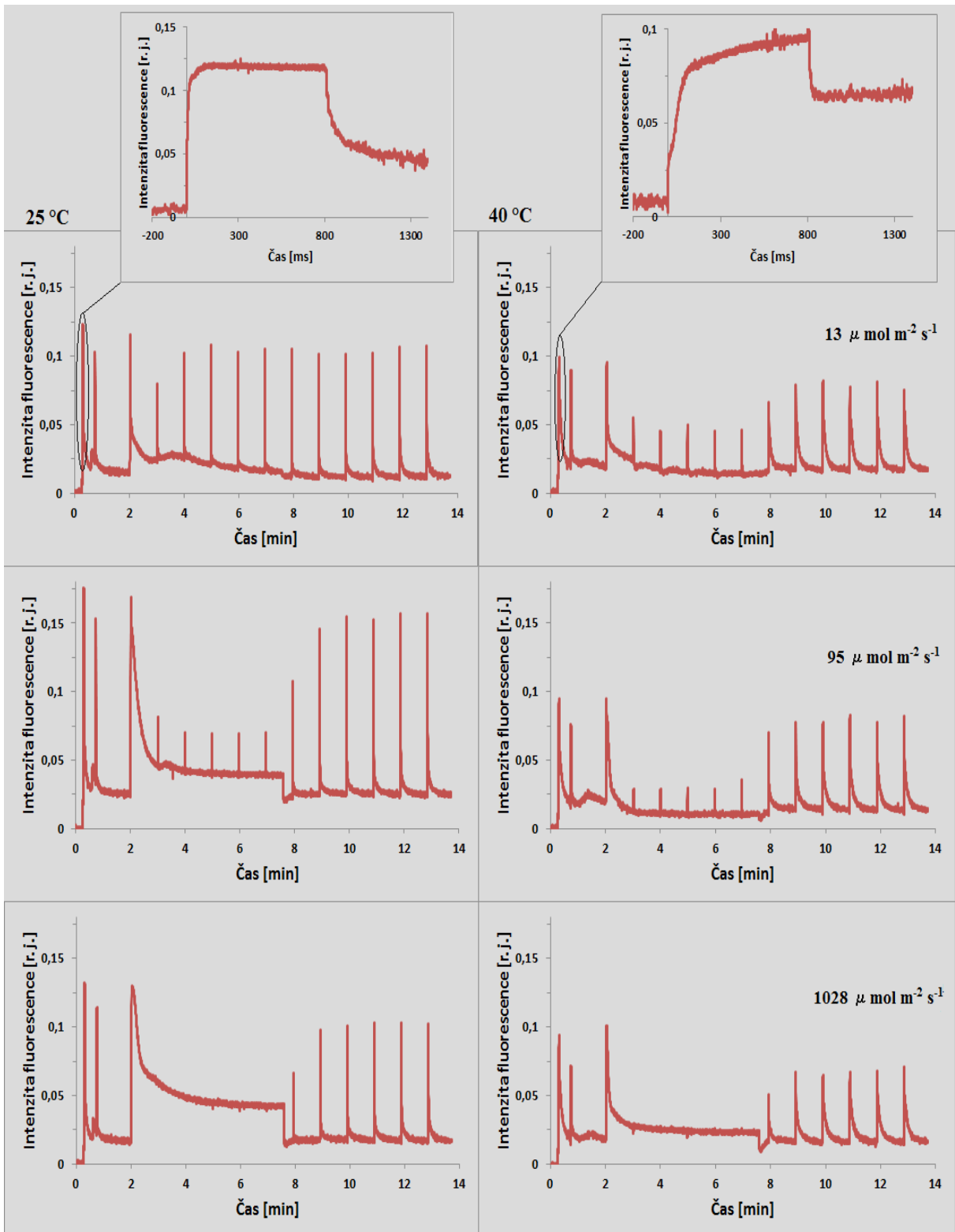
Na obrázku č. 3 je graf závislosti intenzity fluorescence na čase pro vzorky bez zeaxantinu (*npq1*). U předeřátých i kontrolních vzorků můžeme se zvyšující se intenzitou AL pozorovat nárůst intenzity fluorescence  $F_t$ . Míra nefotochemického zhášení  $F_M'$  a  $F_M''$  je však u tohoto vzorku daleko menší, než v případě WT. Při intenzitě  $13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  je míra nefotochemického zhášení minimální jak u kontrolního tak u předeřátého vzorku. Pro následující dvě intenzity ( $95$  a  $1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) je už u

předehřátých i kontrolních vzorků pozorovatelný částečný nárůst nefotochemického zhášení  $F_M'$  a  $F_M''$ . Detailnější rozbor prvního pulzu po adaptaci na tmu ukazuje, že po předehřevu je nárůst do saturační hodnoty  $F_M$  pomalejší, než u kontrolního vzorku.

Na obrázku č. 4 se nalézá graf závislosti intenzity fluorescence na čase pro vzorky bez schopnosti zpětné konverze zeaxantinu na violaxantin (*npq2*). U kontrolních i předehřátých vzorků byl se zvyšující se intenzitou AL pozorovat výraznější nárůst intenzity fluorescence  $F_T$  až při  $1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  z důvodu vysoké míry nefotochemického zhášení. Nárůst nefotochemického zhášení  $F_M'$  a  $F_M''$  se zvyšující se intenzitou AL je výraznější u předehřátého vzorku. Detailnější rozbor prvního pulzu po adaptaci na tmu ukazuje, že po předehřevu je nárůst do saturační hodnoty  $F_M$  oproti kontrolnímu vzorku zpomalen.

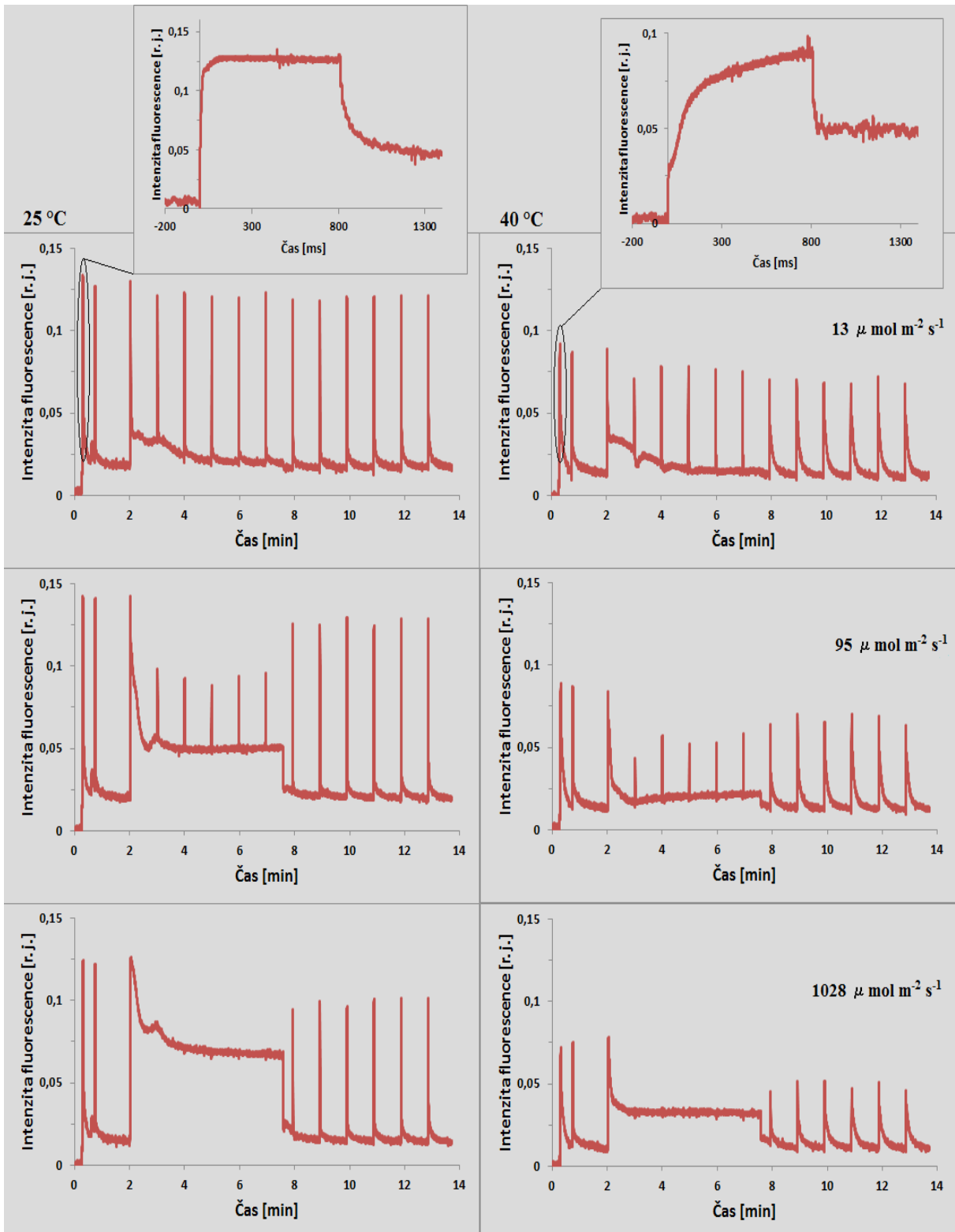
Na obrázku č. 5 můžeme sledovat závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorky bez PsbS proteinu (*npq4-1*). Předehřáté i nepředehřáté vzorky se zvyšující se hodnotou AL vykazují vyšší intenzity fluorescence  $F_t$ . Nefotochemické zhášení  $F_M'$  a  $F_M''$  je u kontrolních vzorků minimální a ani u předehřátých vzorků nedošlo ke stimulaci tohoto zhášení. Detailnější rozbor prvního pulzu po adaptaci na tmu ukazuje, že po předehřevu je nárůst do saturační hodnoty  $F_M$  srovnatelný s nárůstem pozorovatelným u kontrolních vzorků.

Na obrázku č. 6 pozorujeme závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek s nadměrným množstvím PsbS proteinu (L17). U předehřátých vzorků lze při zvyšující se intenzitě AL pozorovat výrazné zhášení intenzity fluorescence  $F_t$ , zatímco u kontrolních vzorků intenzita fluorescence  $F_t$  se zvyšující se intenzitou AL mírně vzrůstá. Jak si lze povšimnout, hodnota nefotochemického zhášení  $F_M'$  a  $F_M''$  je v tomto případě značně velká u předehřátých i nepředehřátých vzorků, s výjimkou nepředehřátého vzorku vystaveného intenzitě AL  $13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , kdy je jeho hodnota parametru malá. Detailnější rozbor prvního pulzu po adaptaci na tmu ukazuje, že po předehřevu je nárůst do saturační hodnoty  $F_M$  srovnatelný s nárůstem u nepředehřátého vzorku.

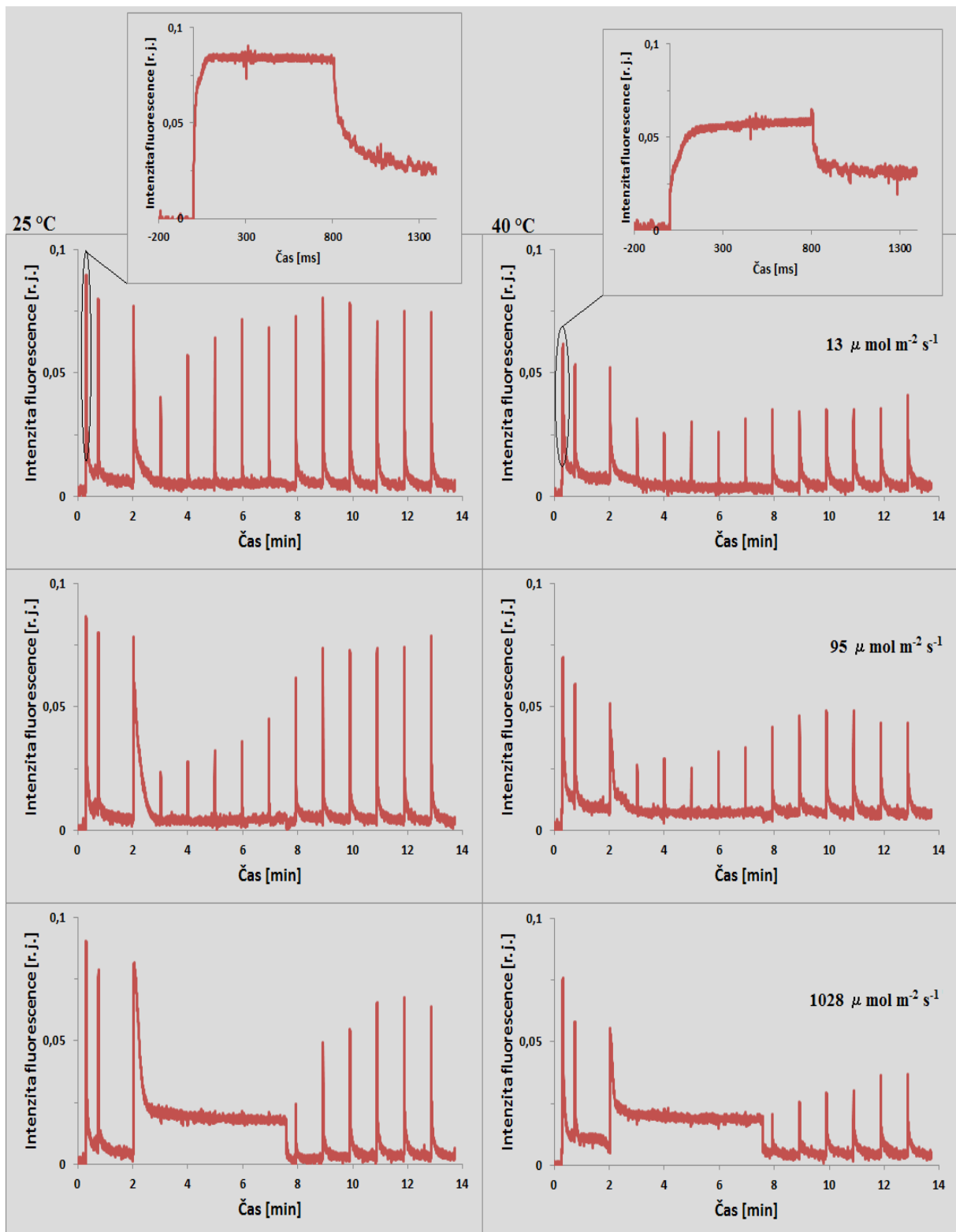


**Obrázek č. 2:** Závislost intenzit fluorescence na čase u WT. Srovnání předeřtých (40 °C) a kontrolních (25 °C) vzorků pro vybrané intenzity AL.

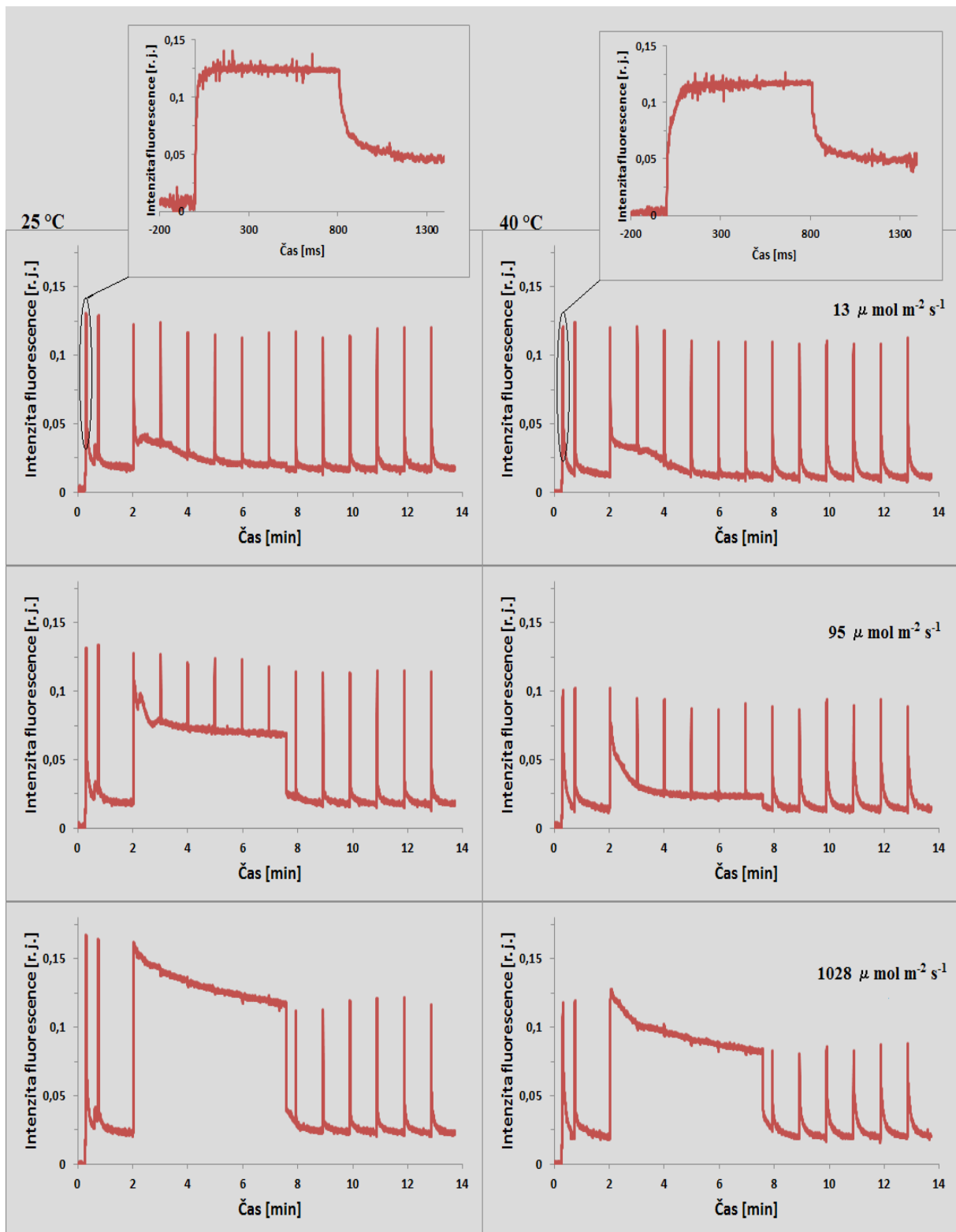




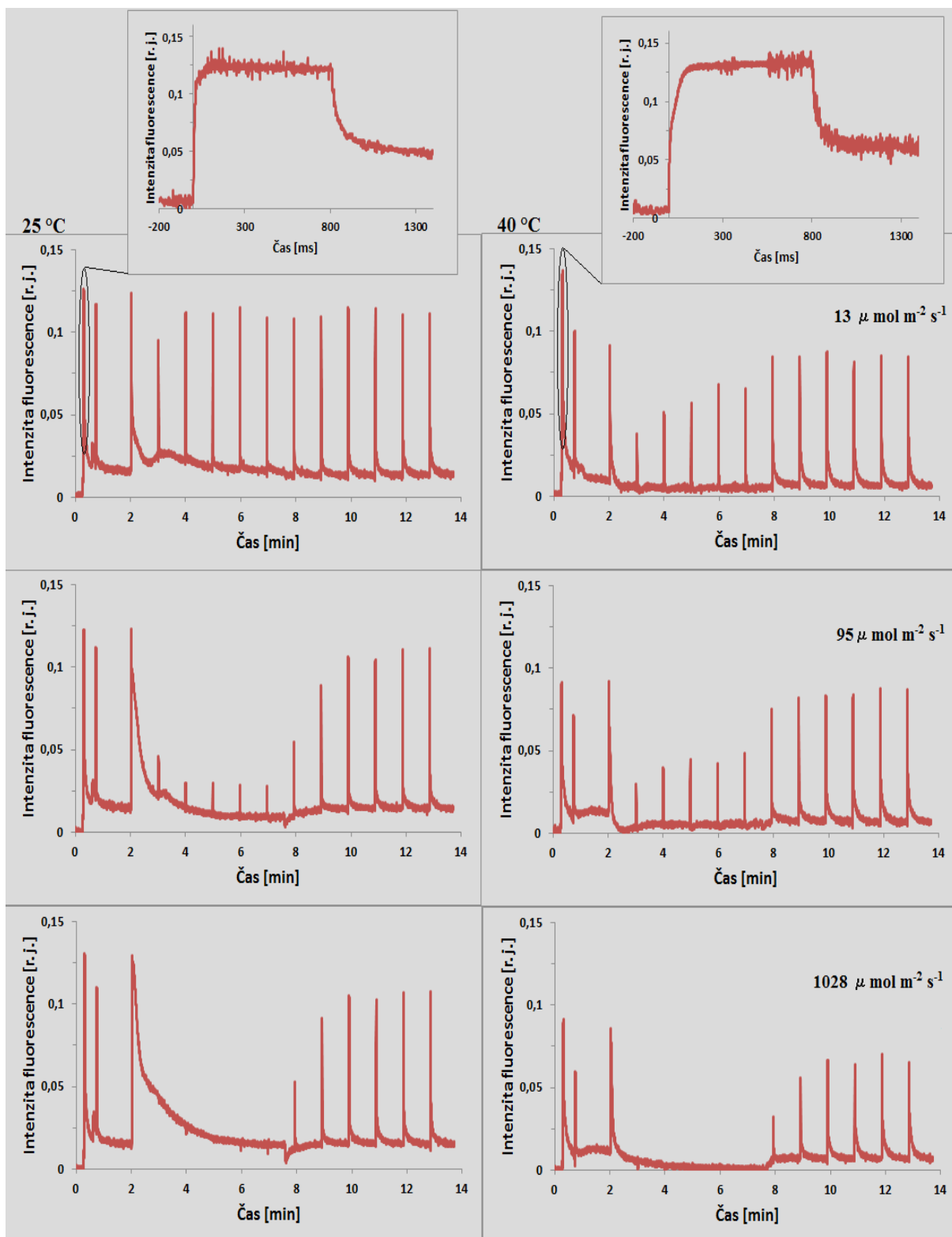
**Obrázek č. 3:** Závislost intenzit fluorescence na čase u mutantu *Arabidopsis npq1* (absence zeaxantinu). Srovnání předehřátých (40 °C) a kontrolních (25 °C) vzorků pro vybrané intenzity AL.



**Obrázek č. 4:** Závislost intenzit fluorescence na čase u mutantu *Arabidopsis npq2* (nadbytek zeaxantinu). Srovnání předehřátých (40 °C) a kontrolních (25 °C) vzorků pro vybrané intenzity AL.



**Obrázek č. 5:** Závislost intenzit fluorescence na čase u mutantu *Arabidopsis npq4-1* (absence *PsbS* proteinu). Srovnání predehřátých (40 °C) a kontrolních (25 °C) vzorků pro vybrané intenzity AL.



**Obrázek č. 6:** Závislost intenzit fluorescence na čase u mutantu *Arabidopsis* L17 (nadbytek *PsbS* proteinu). Srovnání předehřátých (40 °C) a kontrolních (25 °C) vzorků pro vybrané intenzity AL.

## 5.2. Závislost qE na AL u kontrolních a předeřátých vzorků

Pro jednotlivé varianty *Arabidopsis* jsme vyhodnotili parametr qE. Sestrojili jsme grafy závislosti qE na intenzitě AL u kontrolních a předeřátých vzorků tak, aby byl u jednotlivých variant zřejmý vliv předehřevu na indukci qE. Jak je vidět na obrázku č. 7, předeřáté vzorky oproti kontrolním vzorkům nabývají vyšších hodnot qE.

Z grafu pro WT (obrázek č. 7A) lze vyčíst, že se zvyšující se intenzitou AL u kontrolních vzorků qE vzrůstá, avšak při velmi vysokých intenzitách AL ( $1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) dochází k jeho poklesu. Podobně je tomu i u předeřátých vzorků, kde jsou ale hodnoty qE oproti kontrole vyšší, zvláště v oblasti nízkých intenzit AL.

V grafech pro *npq1* (obrázek č. 7B) si lze povšimnout, že při nízkých intenzitách AL nedochází u předeřátých vzorků k teplotní indukci qE. U vyšších intenzit AL ( $216$  a  $430 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) u kontrolních i předeřátých vzorků dochází k nárůstu a pro fotoinhibiční intenzitu ( $1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) k poklesu parametru qE. U vyšších intenzit AL platí, že kontrolní vzorky vykazují nižší qE než předeřáté vzorky.

V případě *npq2* (obrázek č. 7C) sledujeme u kontrolních vzorků se zvyšující se intenzitou AL nárůst qE. U předeřátého vzorku pozorujeme výraznou teplotní stimulaci qE už při nízkých intenzitách AL. S rostoucími intenzitami AL parametr qE narůstá. Ve srovnání s předeřátými vzorky nabývají kontrolní vzorky nižších hodnot nefotochemického zhášení qE.

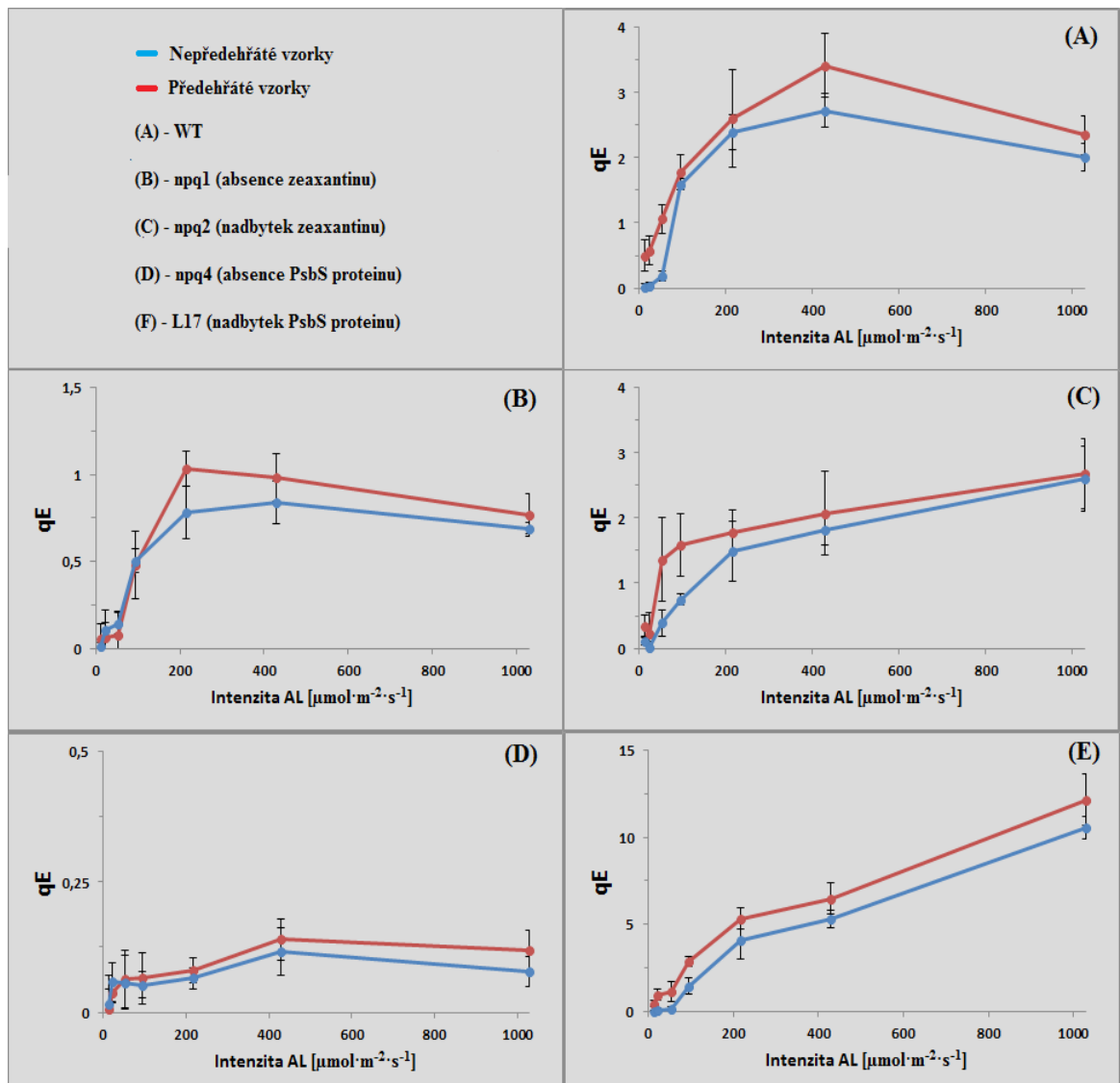
U *npq4-1* (obrázek č. 7D) můžeme pozorovat srovnatelný nárůst parametru qE za nižších intenzit AL pro vzorky s ohřevem i bez ohřevu. Až při vyšších intenzitách AL si lze povšimnout mírnějšího nárůstu parametru qE u předeřátých vzorků ve srovnání s nepředeřátými vzorky. V porovnání *npq4-1* mutantu s dalšími variantami *Arabidopsis* byly hodnoty qE nejnižší.

Pro variantu L17 (obrázek č. 7E) vidíme, že parametr qE dosahoval nejvyšších hodnot ze všech studovaných variant *Arabidopsis*. U předeřátých vzorků dochází k výrazné teplotní indukci qE už při nízkých intenzitách AL. Pro vyšší intenzity AL dochází pro vzorky s ohřevem i bez něj k výraznému nárůstu qE.

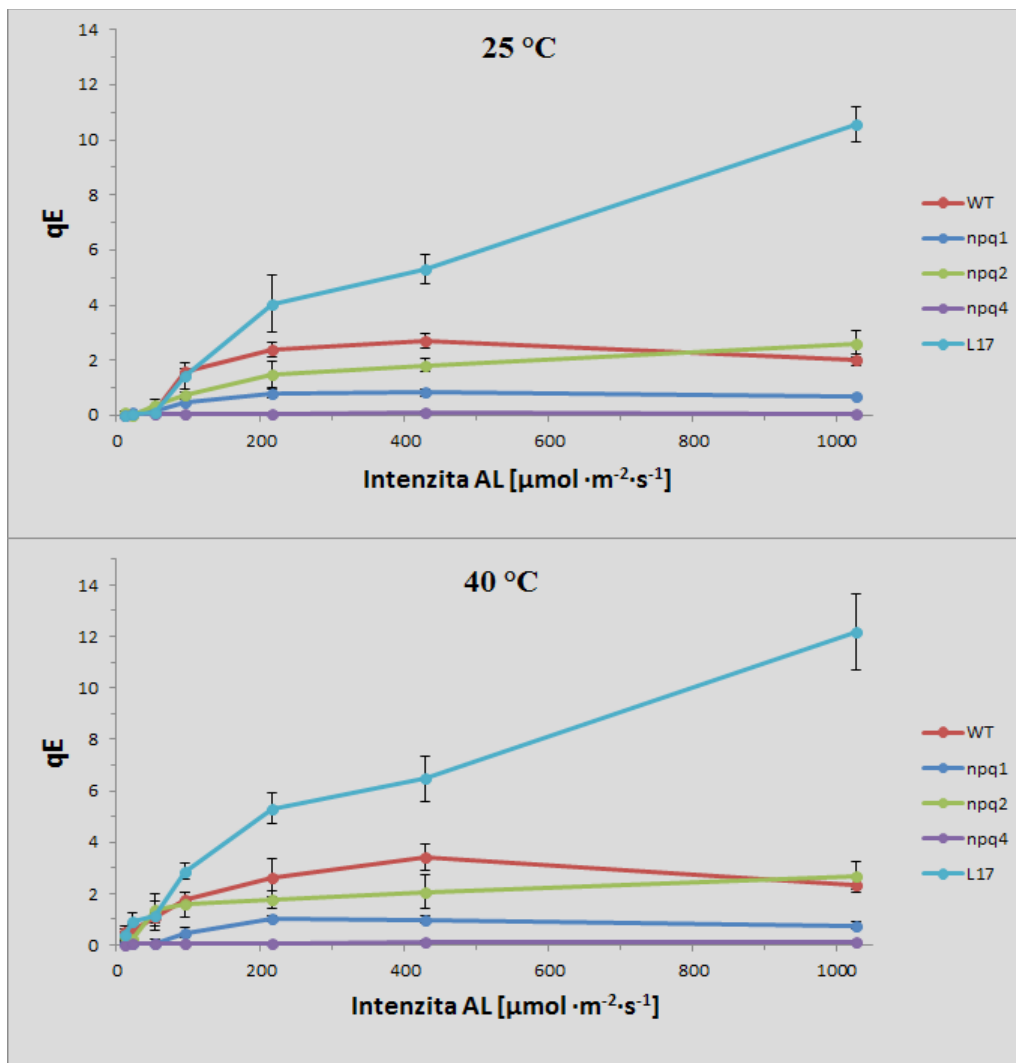
Na obrázku č. 8 jsme srovnali závislosti qE na AL pro všechny typy vzorků současně, přičemž graf označený  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  platí pro kontrolní vzorky a graf označený  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro vzorky předeřáté. Lze si povšimnout, že u kontrolních vzorků dojde k většímu nárůstu qE až při intenzitě AL  $95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Ve srovnání s WT vykazuje při

rostoucí intenzitě AL vyšší hodnoty parametru qE pouze L17. Zbývající tři varianty (*npq1*, *npq2* a *npq4-1*) s rostoucí intenzitou AL nedosahují vyšších hodnot qE, než je možno pozorovat u WT.

U předeřtých vzorků pozorujeme u WT, L17 a *npq2* teplotní indukci qE už za intenzit AL  $13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Ve srovnání s WT dosahuje při rostoucí intenzitě AL vyšších hodnot pouze u varianta L17. Zbylé varianty (*npq1*, *npq2* a *npq4-1*) dosahují s rostoucí intenzitou AL nižších hodnot parametru qE, než je možné pozorovat u WT.



**Obrázek č. 7:** Grafy závislosti qE na intenzitách AL ( $13, 22, 53, 95, 216, 430$  a  $1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) pro předeřtá (červeně) a nepředeřtá (modře) varianty *Arabidopsis* (A – WT; B – absence zeaxanthinu; C – nadbytek zeaxanthinu; D – absence PsbS proteinu; E – nadbytek PsbS proteinu).

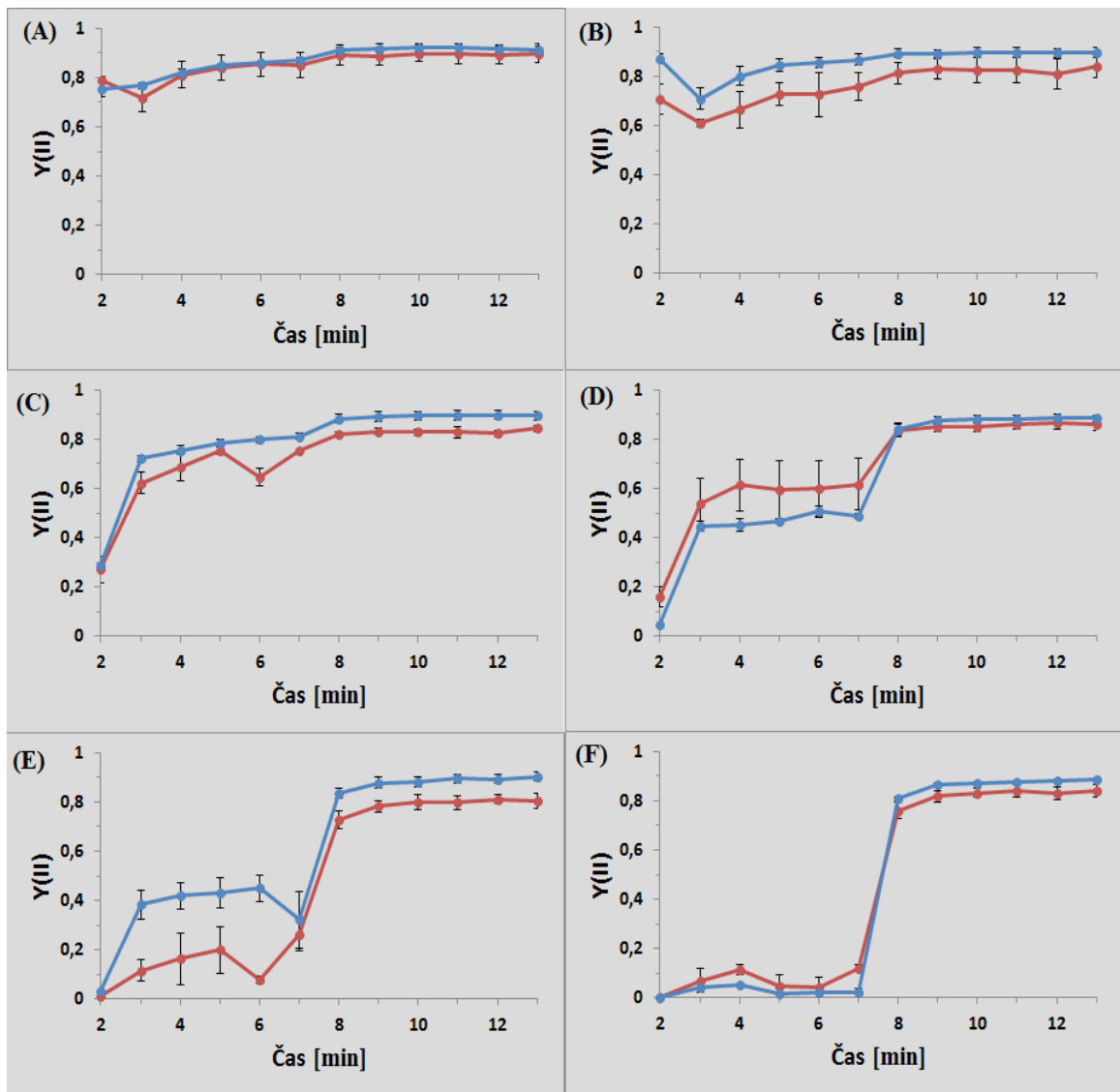


**Obrázek č. 8:** Grafy závislosti  $qE$  na intenzitách AL (13, 22, 53, 95, 216, 430 a 1028  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) pro přehřáté (40 °C) a nepřehřáté (25 °C) varianty *Arabidopsis* (WT, npq1 (bez zeaxantinu), npq2 (nadbytek zeaxantinu), npq4-1 (bez PsbS proteinu), L17 (nadbytek PsbS proteinu)).

### 5.3. Závislost Y(II) na čase u kontrolních a přehřátých vzorků

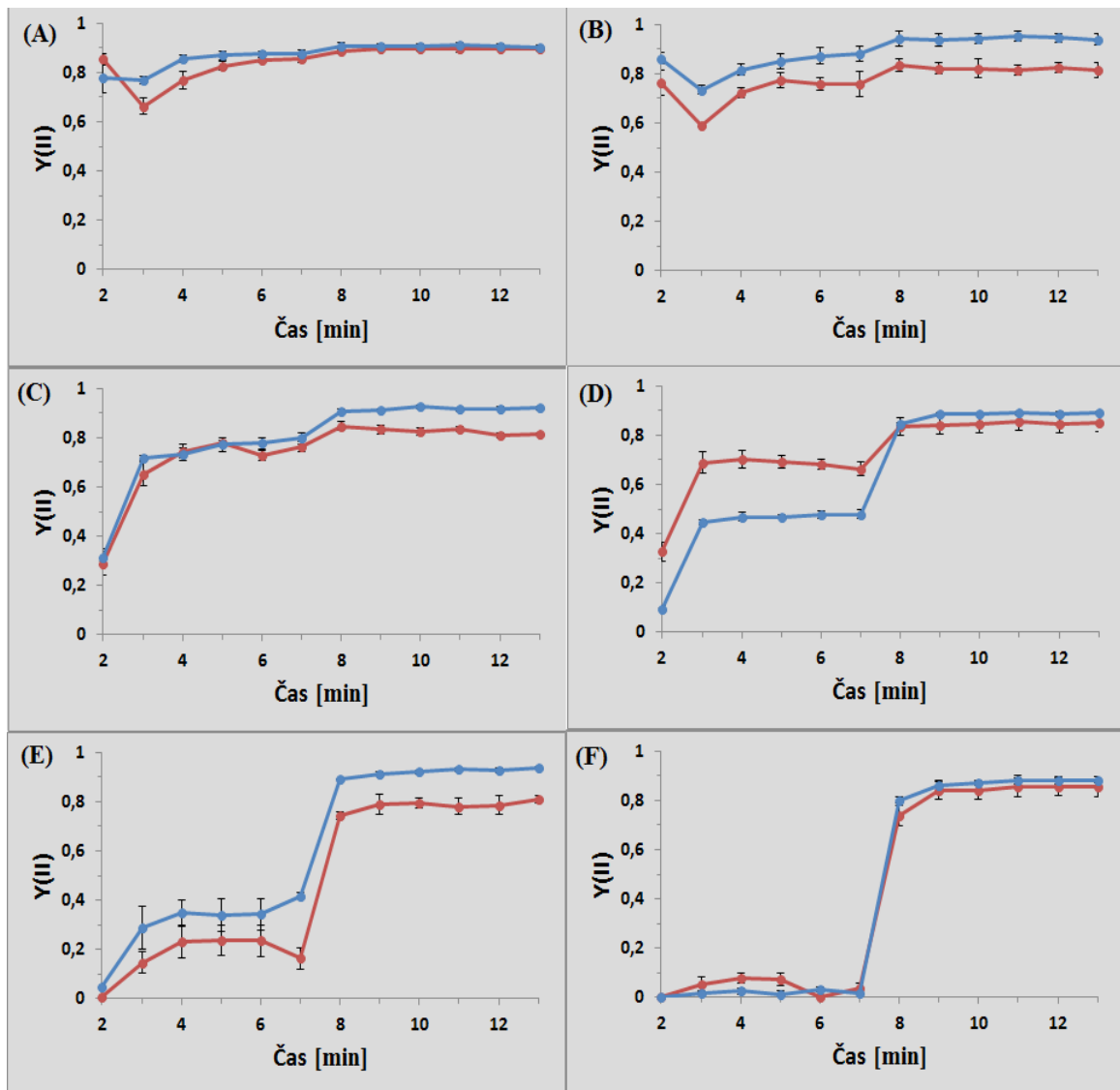
K určení vlivu teploty na otevřenost či uzavřenost reakčních center PSII lze využít Gentiho parametru Y(II) (viz. materiál a metody). Na obrázcích č. 9 až č. 13 jsou uvedeny závislosti Y(II) na čase pro jednotlivé varianty *Arabidopsis* pro vybrané intenzity AL po aplikaci saturačního pulzu.

Na obrázcích č. 9 až č. 13 si lze povšimnout, že s rostoucí intenzitou AL u všech typů vzorků v různé míře dochází k postupnému uzavírání reakčních center PSII. Uzavírání reakčních center PSII je výraznější u vzorků vystavených předohřevu. Vyjímkou je experiment s použitím AL o intenzitě 95  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , při kterém jednotlivé varianty mají po předohřevu více otevřená reakční centra PSII, než je tomu u kontrolních vzorků. Po vypnutí AL lze u kontrolních i přehřátých vzorků jednotlivých variant pozorovat postupné otevírání reakčních center PSII.

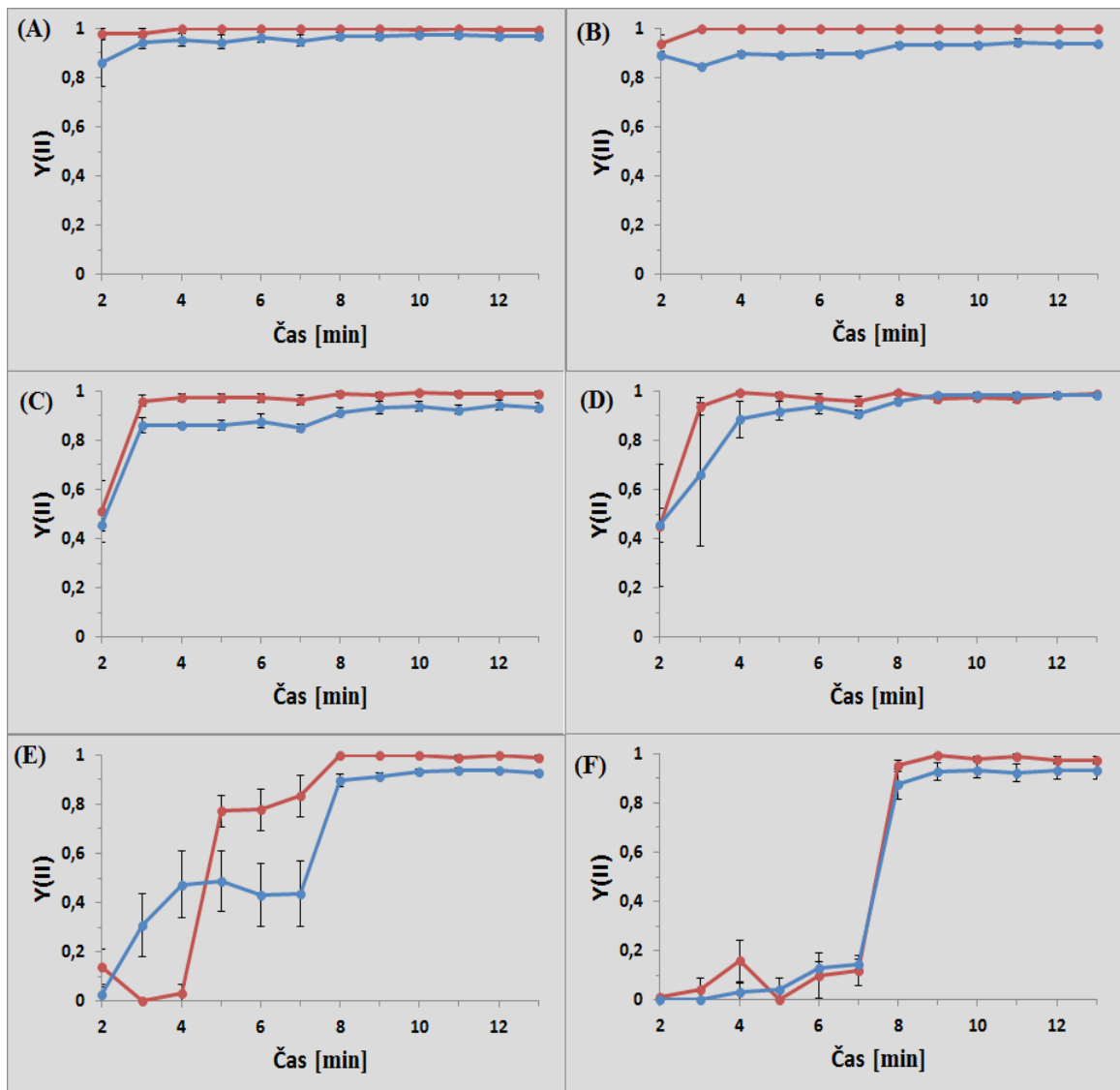


**Obrázek č. 9:** Grafy závislosti  $Y(II)$  na čase pro *Arabidopsis* WT (A –  $13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; B –  $22 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; C –  $53 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; D –  $95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; E –  $216 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; F –  $1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

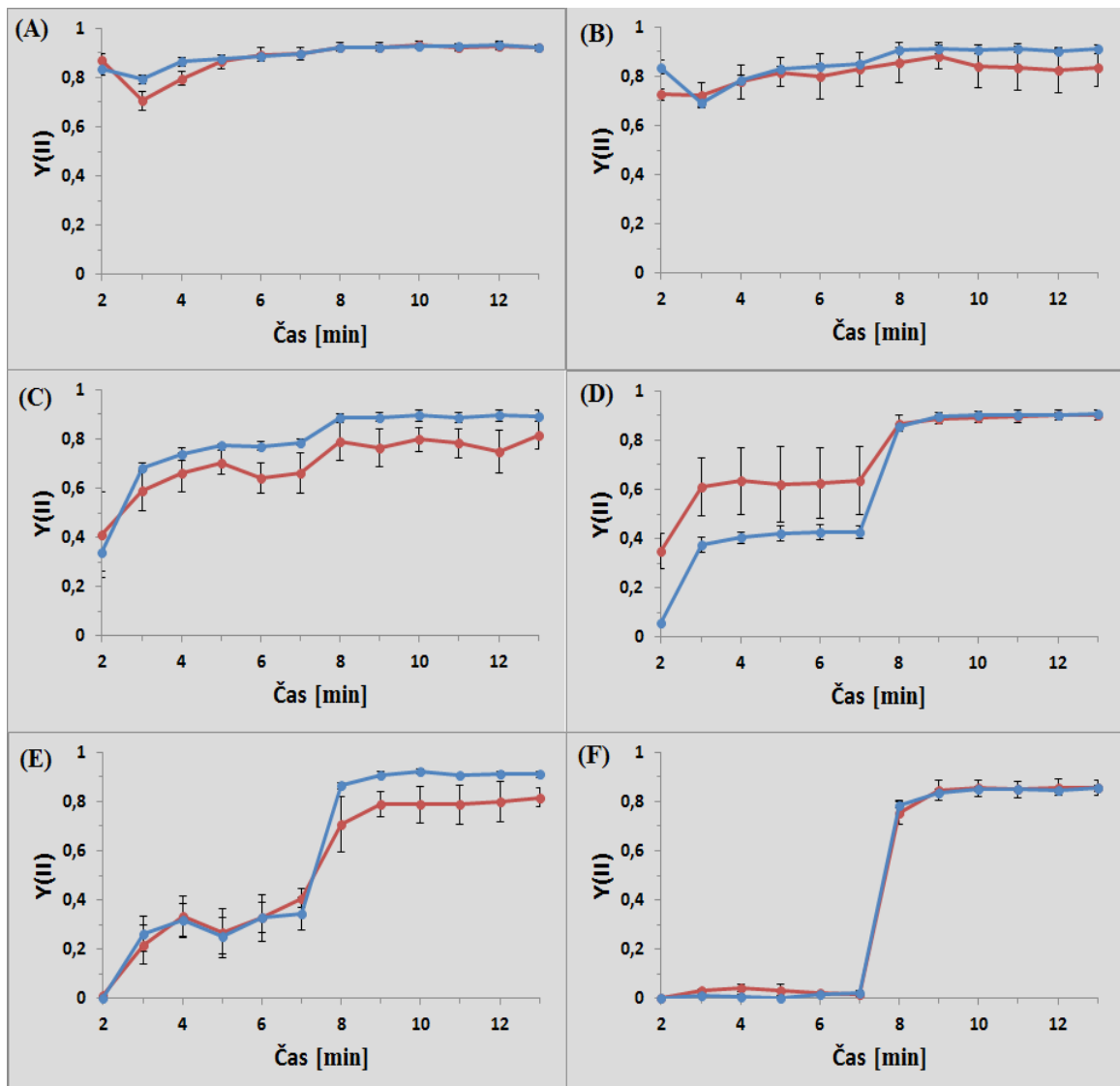




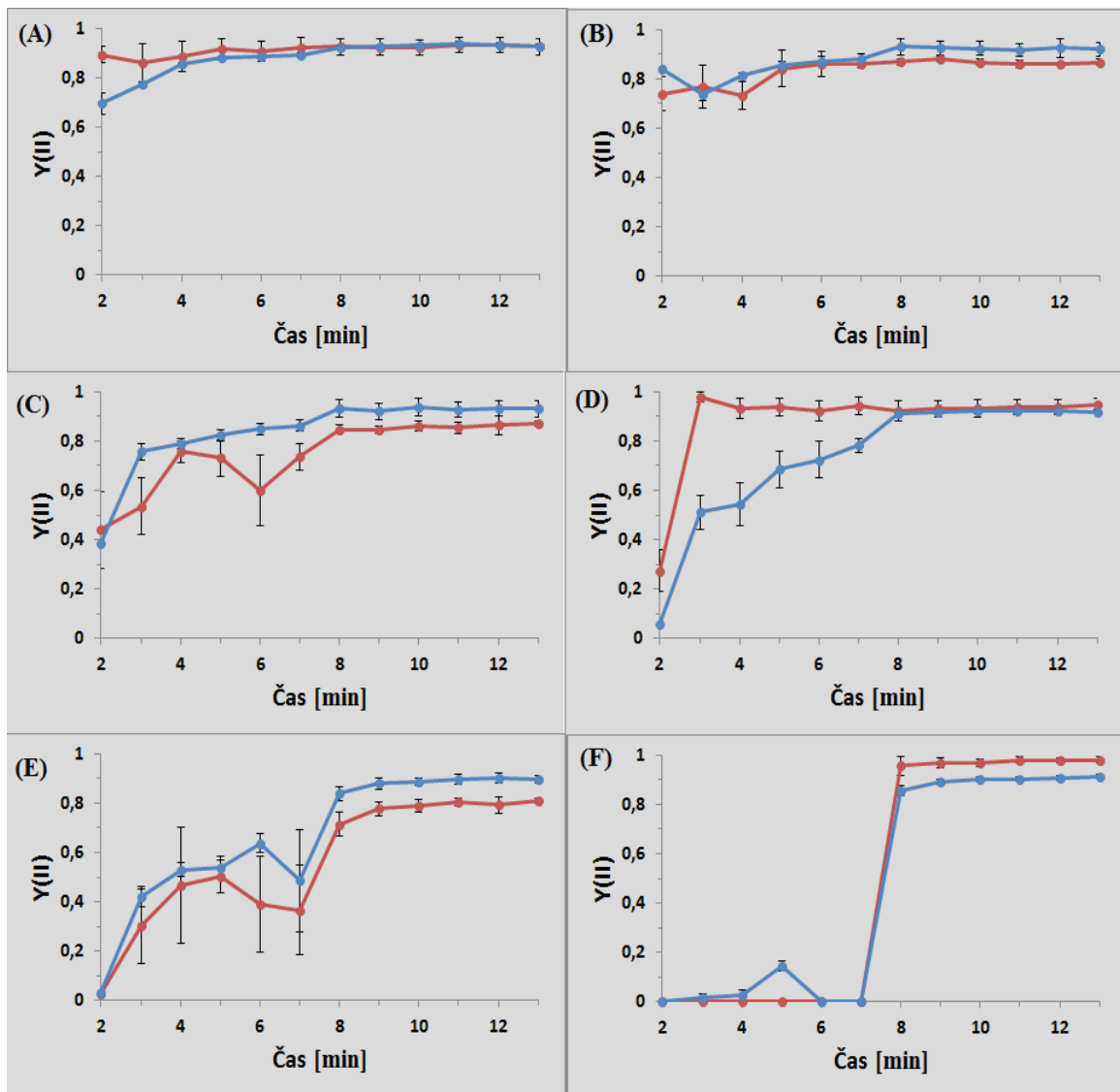
**Obrázek č. 10:** Grafy závislosti  $Y(II)$  na čase pro mutanta *Arabidopsis npq1* (A –  $13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; B –  $22 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; C –  $53 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; D –  $95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; E –  $216 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; F –  $1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).



**Obrázek č. 11:** Grafy závislosti  $Y(II)$  na čase pro mutantu *Arabidopsis npq2* (A –  $13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; B –  $22 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; C –  $53 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; D –  $95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; E –  $216 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; F –  $1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).



**Obrázek č. 12:** Grafy závislosti  $Y(II)$  na čase pro mutantu *Arabidopsis npq4-1* ( $A - 13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $B - 22 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $C - 53 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $D - 95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $E - 216 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $F - 1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).



**Obrázek č. 13:** Grafy závislosti  $Y(II)$  na čase pro mutant *Arabidopsis* L17 ( $A - 13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $B - 22 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $C - 53 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $D - 95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $E - 216 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $F - 1028 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

## 6. Diskuze

Naše výsledky potvrzují, že po předohřevu *Arabidopsis thaliana* WT ve tmě dochází po následném osvětlení k výraznější teplotní indukci nefotochemického zhášení qE v porovnání s kontrolním vzorkem (bez předohřevu), a to už při nízkých intenzitách AL (viz. obrázek č. 7A). Obdobný výsledek byl pozorován již dříve na listech pšenice (Ilík *et al.*, 2010). Po detailnější analýze závislosti qE na intenzitě AL uvedené v práci Ilíka *et al.* (2010) však pozorujeme, že v našem případě byla kinetika indukce qE mnohem rychlejší. To může být způsobeno např. Použitím jiného rostlinného materiálu nebo odlišnou měřicí aparaturou a experimentálním uspořádáním.

Jak ukazuje obrázek č. 7, kromě WT nastává výrazná teplotní indukce nefotochemického zhášení qE také u mutantů *Arabidopsis npq2* (nadbytek zeaxantinu; obrázek č. 7C) a u L17 (nadbytek PsbS proteinu; obrázek č. 7E). Naopak, u mutantů *Arabidopsis npq1* (absence zeaxantinu; obrázek č. 7B) a *npq4-1* (absence PsbS proteinu; obrázek č. 7D) se teplotní předohřev na následující indukci qE nijak výrazně neprojevuje. To potvrzuje myšlenku, že na teplotně stimulovaném nefotochemickém zhášení qE se podílí zeaxanthin i PsbS protein, jejichž činnost je při předohřevu vybuzena rychlejším okyselením lumenu (Ilík *et al.*, 2010; Sharkey and Zhang, 2010; Horton, 2012).

V článku Ilíka *et al.* (2010) byla navržena hypotéza, podle které se zhášení pomocí zeaxantinu uplatňuje při nízkých intenzitách AL, zatímco zhášení pomocí PsbS proteinu je aktivováno až při vyšších intenzitách AL. To je však v rozporu s našimi výsledky, kde u varianty L17 dochází ke značnému nárůstu qE už při nízkých intenzitách AL (obrázek č. 7E a č. 8). Z toho plyne, že PsbS protein se do teplotně stimulovaného nefotochemického zhášení qE aktivně zapojuje už při nižších intenzitách aktinického světla.

Při porovnání varianty *npq1* a *npq4-1* (viz. obrázek č. 8) se u *npq1* projevuje nefotochemické zhášení qE od intenzity  $95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , zatímco u *npq4-1* je hodnota parametru qE pro všechny intenzity AL téměř nulová. Z toho plyne, že bez přítomnosti zeaxantinu je PsbS protein schopen pracovat samostatně, avšak samotný zeaxanthin výraznějšího nefotochemického zhášení qE není schopen. Naše výsledky potvrzují fakt, že PsbS protein je nezbytný pro správné fungování mechanismů nefotochemického zhášení qE (Li *et al.*, 2000).

Grafy závislosti intenzity chlorofylové fluorescence na čase na obrázcích č. 2 až č. 6 potvrzují výše uvedené výsledky. V případě WT, *npq2* a L17 můžeme pozorovat s rostoucími intenzitami AL u přehřátých vzorků větší nefotochemické zhášení  $F_M'$  a  $F_M''$ , než je tomu u kontrolních vzorků. To je způsobeno teplotní indukcí nefotochemického zhášení qE, které pro tyto tři typy vzorků můžeme pozorovat na obrázcích č. 7 a č. 8. Se zvyšující se intenzitou AL můžeme také pozorovat u kontrolních vzorků nárůst fluorescence  $F_t$ . Podobné chování pozorujeme i u přehřátých vzorků, kde je však vlivem teplotní indukce nefotochemického zhášení qE fluorescence  $F_t$  nižší než u kontrolních vzorků. Vyjímkou z tohoto pravidla je varianta *npq1* za nízkých intenzit AL (popsáno dále) a varianta *npq4-1* (obrázek č. 5). Skutečnost, že varianta *npq4-1* ve srovnání s ostatními typy vzorků nevykazuje téměř žádné nefotochemické zhášení qE, opět poukazuje na naprostou nezbytnost přítomnosti PsbS proteinu při nefotochemickém zhášení qE (Li *et al.*, 2000).

Obrázek č. 3 ukazuje, že bez ohledu na předehřev je u varianty *npq1* nefotochemické zhášení  $F_M'$  a  $F_M''$  za nízké intenzity AL minimální a k jeho částečnému nárůstu dochází až při vyšších intenzitách AL. To koresponduje s obrázky č. 8 a č. 7B, kde lze u *npq1* pozorovat nárůst parametru qE až od intenzity  $95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  u kontrolních i přehřátých vzorků. Je však nutné podotknout, že i při těchto vyšších intenzitách AL dosahuje qE u *npq1* mutantu zhruba 1/3 hodnoty qE pozorované u WT. Nicméně z absence teplotní stimulace qE u *npq1* mutantu při nízkých intenzitách AL (pod  $95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) lze usoudit, že samotný PsbS protein není schopen teplotní indukce qE. K této indukci je nutná kooperace PsbS proteinu se zeaxntinem, ke které může dojít u WT a mutantů *npq2* a L17 (obr. 7A, C, E).

Nečekaným výsledkem našich experimentů bylo zjištění, že otevřenost reakčních center PSII (monitorováno pomocí Gentiho parametru Y(II)) byla při intenzitě AL  $95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  vyšší u přehřátých vzorků oproti kontrolním (nepřehřátým) vzorkům. Tento fenomén byl pozorován u všech variant *Arabidopsis* (obrázky č. 9 až č. 13). Pro jiné intenzity AL byla zjištěna menší otevřenost reakčních center PSII u přehřátých vzorků oproti kontrolním vzorkům. To potvrzuje myšlenku, že při vystavení rostlin vysokoteplotnímu stresu dochází k inhibici lineárního elektronového transportu skrze PSII a k postupnému zavírání reakčních center PSII (Sharkey, 2005; Ilík *et al.*, 2010; Lípová, 2010; Sharkey and Zhang, 2010). Důvod, proč

je při intenzitě  $AL\ 95\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  reakční centrum PSII otevřenější, není znám. Je však zajímavé, že intenzita  $AL\ 95\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  je velmi blízká pěstební intenzitě světla.

## 7. Závěr

V této práci se nám podařilo potvrdit, že po teplotním předohřevu rostlin ve tmě dochází k výraznější indukci nefotochemického zhášení qE. Dospěli jsme k závěru, že na teplotně stimulovaném nefotochemickém zhášení qE se podílí současně zeaxantin i PsbS protein, a to již za nízkých intenzit aktinického světla. Absence zeaxantinu nebo PsbS proteinu zcela eliminuje stimulující vliv předohřevu na indukci nefotochemického zhášení qE.

Podařilo se nám také potvrdit, že předohřev rostlin způsobuje v porovnání s kontrolními vzorky zpomalení lineárního elektronového transportu skrze PSII, což se projevilo větší uzavřeností reakčních center PSII. Toto bylo pozorováno u všech proměřovaných intenzit AL s výjimkou intenzity světla blízké pěstební intenzitě, při které byla u všech variant po předohřevu zjištěna větší otevřenost reakčních center PSII.

Navazující práce by se mohly zaměřit na monitorování množství zeaxantinu a stanovení množství PsbS proteinu u WT a mutantů, což by umožnilo lepší pochopení kooperace zeaxantinu a PsbS proteinu během teplotní stimulace qE. Zajímavým námětem pro další práci by bylo objasnění důvodu větší otevřenosti reakčního centra PSII u předehřátých rostlin ve srovnání s rostlinami bez předohřevu za pěstební intenzity světla. Některá z dalších prací by také s vhodněji sestavenou měřicí aparaturou mohla zopakovat experiment popsany v této práci zaměřený na PSI a určit vliv vysokoteplotního stresu na jeho fungování za různých světelných podmínek.



## 8. Citace

- (1) Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, Mohanty P (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth Res* 98: 541-550
- (2) Ashraf M, Harris PJC (2013) Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica* 51(2): 163-190
- (3) Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* 59: 89-113.
- (4) Horton P (2012) Optimization of light harvesting and photoprotection: molecular mechanisms and physiological consequences. *Phil Trans R Soc* 367: 3455-3465
- (5) Ilík P, Kotabová E, Špundová M, Novák O, Kaňa R and Strzalka K (2010) Low-light-induced violaxanthin de-epoxidation in shortly preheated leaves: uncoupling from  $\Delta$ pH-dependent nonphotochemical quenching. *Photochemistry and Photobiology* 86: 722-726
- (6) Li XP, Björkman, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391-395
- (7) Li XP, Gilmore AM, Caffari S, Bassi R, Golan T, Kramer D, Niyogi KK (2004) Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *J Biol Chem* 279: 22866-22874
- (8) Lípová L, Krchňák P, Komenda J, Ilík P (2010) Heat-induced disassembly and degradation of chlorophyll-containing protein complexes in vivo. *Biochemica et Biophysica Acta* 1797: 63-70
- (9) Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and function of Photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol* 57: 521-565.
- (10) Pospíšil P (1997) Mechanisms of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in higher plants. *Photosynthetica* 34 (3): 343-355
- (11) Ruban AV, Johnson MP, Duffy CDP (2012) The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim Biophys Acta* 1817: 167-181
- (12) Sharkey TD (2005) Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell and Environment* 28: 269-277
- (13) Sharkey TD, Zhang R (2010) High temperature effects on electron and proton circuits of photosynthesis. *Journal of Integrative Plant Biology* 52(8): 712-722
- (14) Yamamoto H, Peng L, Fukao Y, Shikanai T (2011) An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 1480-1493

- (15) Yamamoto Y, Aminaka R, Yoshioka M, Khatoon M, Komayama K, Takenaka D, Yamashita A, Nijo N, Inagawa K, Morita N, Sasaki T, Yamamoto Y (2008) Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. *Photosynth Res* 98: 589-608