

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



**Vplyv absencie svetlozberných komplexov Lhcb3
a Lhcb6 na nefotochemické zhášanie u mutantov**

Arabidopsis thaliana

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Dominika Dostálová
Študijný program:	B1406 Biochémia
Študijný odbor:	Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.
Rok:	2020

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

.....

Pod'akovanie

Týmto by som sa chcela pod'akovať vedúcej mojej bakalárskej práce, Mgr. Ive Ilíkovej, Ph.D., za odborné vedenie, cenné rady a trpezlivosť v priebehu spracovávania experimentálnej časti práce a jej spisovania. Taktiež by som chcela pod'akovať prof. RNDr. Petrovi Ilíkovi, Ph.D. a RNDr. Romanovi Kouřilovi, Ph.D. za umožnenie vypracovania fyziologickej charakterizácie rastlín na oddelení Katedry biofyziky a aj za odborné rady pri vyhodnocovaní nameraných výsledkov.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKÁCIA

Meno a priezvisko
autora: Dominika Dostálová

Názov práce: Vplyv absencie svetlozberných komplexov Lhcb3 a Lhcb6 na nefotochemické zhášanie u mutantov *Arabidopsis thaliana*

Typ práce: Bakalárska

Pracovisko: Ústav experimentálnej botaniky AV ČR, Katedra biofyziky

Vedúci práce: Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.

Konzultanti práce: prof. RNDr. Petr Ilík, Ph.D., RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Abstrakt: Cieľom tejto bakalárskej práce bolo prispieť k objasneniu role proteínu PsbS v nefotochemickom zhášaní chlorofylovej fluorescence u rastlín bez svetlozberných antén Lhcb3 a Lhcb6. V skoršie publikovanej štúdií bolo poukázané na možnosť priamej interakcie PsbS proteínu so svetlozbernou anténou Lhcb6, čo by malo viesť k potlačeniu tzv. energeticky závislého nefotochemického zhášania u rastlín s absenciou Lhcb6 antény. Na druhej strane u smreka obyčajného (*Picea abies*), ktorému chýbajú proteíny Lhcb6 a Lhcb3, je energeticky závislé zhášanie pravdepodobne prítomné.

V rámci tejto práce bol skrížením línií *koLhcb3koLhcb6* a *koPsbS* pripravený trojitý mutant *koLhcb3koLhcb6koPsbS*, ktorý bol charakterizovaný pomocou metód chlorofylovej fluorescence. Prezentované výsledky spochybňujú skoršie publikovanú hypotézu, že Lhcb6 je hlavných interakčným partnerom PsbS a dá sa teda predpokladať, že proteín PsbS je kľúčový i pre indukciu nefotochemického zhášania u *P. abies*. Analýza taktiež ukázala, že u mutantov *koLhcb3koLhcb6* a *koLhcb3koLhcb6koPsbS* dochádza pravdepodobne k rozvoľneniu / čiastočnému odpojeniu svetlozberných antén a tento netypický jav je výraznejší u rastlín adaptovaných dlhšiu dobu na tmu. Objasnenie molekulárnej podstaty tohto fenoménu bude vyžadovať ďalšie analýzy.

Kľúčové slová: nefotochemické zhášanie, svetlozberné antény, chlorofylová fluorescencia

Počet strán: 60

Počet príloh: 0

Jazyk: slovenský

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname: Dominika Dostálová
Title: The effect of absence of light harvesting complexes Lhcb3 and Lhcb6 on non-photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*
Type of thesis: Bachelor
Department: Institute of Experimental Botany of the AS CR,
Department of Biophysics
Supervisor: Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.
Consultants: prof. RNDr. Petr Ilík, Ph.D., RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.
The year of presentation: 2020

Abstract: The aim of this bachelor thesis was to contribute to our understanding of the role of PsbS protein in non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants lacking light-harvesting antennae Lhcb3 and Lhcb6. According to a previous study, PsbS protein directly interacts with Lhcb6, which results in the impairment of energy-dependent type of non-photochemical quenching in plants lacking Lhcb6 antennae. However, energy-dependent quenching seems to be active in Norway spruce (*Picea abies*) which is known to lack both Lhcb3 and Lhcb6.

In the frame of this work, triple *Arabidopsis thaliana* mutant *koLhcb3koLhcb6koPsbS* was prepared via a crossing of *koLhcb3koLhcb6* and *koPsbS* plants. This mutant was subsequently characterized with the help of chlorophyll fluorescence methods. Our results contradict the earlier published hypothesis that the Lhcb6 is the main interacting partner of PsbS and indicate that qE is operational is also in plants lacking Lhcb3 and Lhcb6, including Norway spruce. Our analysis also revealed an unusual loosening / detachment of light-harvesting antennae in *koLhcb3koLhcb6* and *koLhcb3koLhcb6koPsbS*, which is stimulated by long dark adaptation of plants. The clarification of the molecular mechanism behind this phenomenon will require further analyses.

Keywords: non-photochemical quenching, light-harvesting antennae, chlorophyll fluorescence

Number of pages: 60

Number of appendices: 0

Language: Slovak

OBSAH

1 Úvod	1
2 Súčasný stav riešenej problematiky	2
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> ako modelový organizmus	2
2.1.1 Knockout mutácie ako nástroj funkčnej genetiky	3
2.1.2 Kolekcie inzerčných línií a ich dôležitosť vo výskume	4
2.2 Príprava <i>Arabidopsis</i> mutantov s mnohonásobnými mutáciami	4
2.2.1 Jednoduché mutantné línie	4
2.2.2 Mutantné línie s mnohonásobnými mutáciami	4
2.2.2.1 Najjednoduchší prípad – dvojité mutant bez väzby génov	5
2.2.2.2 Trojitý mutant bez väzby	7
2.2.2.3 Vplyv väzby génov na kríženie	8
2.3 Genotypizácia a selekcia homozygotných rastlín	8
2.3.1 Príprava vzorky	8
2.3.2 Princíp polymerázovej reťazovej reakcie	9
2.3.3 Princíp genotypovania inzerčných línií	11
2.4 Oxygéna fotosyntéza	11
2.4.1 Svetelná fáza fotosyntézy u vyšších rastlín	13
2.4.1.1 Fotosystém II	14
2.4.1.2 Vonkajšie svetlozberné antény fotosystému II	15
2.4.2 Nefotochemické zhášanie, jeho význam a regulácia	17
2.4.2.1 Cesty absorbovanej energie	17
2.4.2.2 Nefotochemické zhášanie	18
2.4.3 Chlorofylová fluorescencia ako nástroj štúdia fotosyntézy	20
2.4.3.1 Základné parametre	20
2.4.3.2 Zhášacia analýza	20
2.5 Motivácia bakalárskej práce	21
3 Experimentálna časť	23
3.1 Materiál	23
3.1.1 Rastlinný materiál	23
3.1.2 Prístrojové vybavenie	23
3.1.3 Softwary pre spracovávanie výsledkov	24
3.1.4 Chemikálie	24
3.2 Metódy	25
3.2.1 Príprava trojitého mutantu <i>koLhcb3koLhcb6koPsbS</i>	25
3.2.1.1 Rastlinný materiál a podmienky pestovania	25
3.2.1.2 Kríženie rastlín	25
3.2.1.3 Genotypová analýza mutantov	25
3.2.1.3.1 Príprava vzorky – priama metóda	25
3.2.1.3.2 Príprava vzorky – nepriama metóda	26
3.2.1.3.3 Polymerázová reťazová reakcia	26
3.2.1.3.4 Agarózová elektroforéza	27
3.2.2 Fyziologická charakterizácia rastlín	28
3.2.2.1 Rastlinný materiál a podmienky pestovania	28
3.2.2.2 Stanovenie obsahu chlorofylu v listoch	28
3.2.2.3 Vyhodnotenie hmotnosti čerstvej biomasy nadzemnej časti rastliny	29
3.2.2.4 Meranie fotosyntetických parametrov	29

3.2.2.4.1 Dual-PAM	29
3.2.2.4.2 PEA meter (Plant Efficiency Analyzer)	29
3.2.2.5 Štatistické vyhodnotenie	29
4 Výsledky a diskusia	31
4.1 Kríženie rastlín	31
4.2 Genotypizácia	33
4.3 Fyziologická charakterizácia rastlín	38
4.3.1 Stanovenie hmotnosti čerstvej biomasy nadzemnej časti rastliny	38
4.3.2 Obsah chlorofylu	40
4.3.3 Maximálny kvantový výťažok fotochémiie fotosystému II	41
4.3.4 Nefotochemické zhášanie	45
4.3.5 Reoxidácia P700	49
5 Záver	52
6 Literatúra	54
7 Zoznam použitých skratiek	59

CIELE PRÁCE

TEORETICKÁ ČASŤ

- 1 Vypracovanie prehľadu problematiky na tému „Funkcia a štruktúrna rola svetlozberných antén fotosystému II“ s použitím doporučenej literatúry a so zameraním na komplexy Lhcb3 a Lhcb6 a ich rolu v nefotochemickom zhášaní závislom na PsbS.

PRAKTICKÁ ČASŤ

- 1 Pomocou kríženia dostupných inzerčných línií sa pripraví a vyselektuje homozygotný mutant *Arabidopsis thaliana* bez kombinácie proteínov Lhcb3, Lhcb6 a PsbS. Následne sa prevedie fyziologická charakterizácia týchto mutantov so zameraním na analýzu nefotochemického zhášania pomocou metód chlorofylovej fluorescencie.
- 2 Namerané výsledky budú podliehať diskusii so zameraním na predpokladaný mechanizmus PsbS-závislého nefotochemického zhášania u *Arabidopsis thaliana* a taktiež s pokusom formulovania hypotézy o mechanizme zhášania smreku obyčajného (*Picea abies*), u ktorého sa proteíny Lhcb3 a Lhcb6 nevyskytujú.

1 ÚVOD

Fotosyntéza patrí medzi významné biologické procesy, pričom svojou jedinečnosťou ovplyvňuje celosvetovú biosféru. Jej postupný vývoj umožnil vznik kyslíkatej atmosféry na našej planéte, ktorá podmienila evolúciu komplexnejších organizmov. Medzi tieto komplexnejšie organizmy patria aj rastliny, ktoré sa vyznačujú hlavne autotrofným spôsobom života.

Jedným z problémov, ktorému musia rastliny čeliť, je optimalizácia fotosyntézy podľa aktuálnych svetelných podmienok. Nadmerná intenzita slnečnej energie, ktorú rastliny nie sú schopné spracovávať v rámci fotosyntézy, môže pre ne predstavovať riziko. Dlhodobé vystavenie žiareniu o vysokej intenzite môže viesť k závažným poškodeniam rastlinných organizmov. Z tohto dôvodu si rastliny na vlastnú ochranu vyvinuli viaceré mechanizmy. Medzi ochranné mechanizmy rastlín patrí aj nefotochemické zhášanie, ktoré umožňuje kontrolovane premieňať nadbytočnú energiu na teplo. Nefotochemické zhášanie má tri najdôležitejšie zložky – qE (zhášanie závislé na energii), qT (zhášanie závislé na stavových prechodoch spojených s presunom svetlozberných antén medzi fotosystémom II a fotosystémom I) a qI (fotoinhibičné zhášanie). qE zložka nefotochemického zhášania je najrýchlejšie reagujúca zložka spomedzi vyššie spomínaných. Bolo preukázané, že indukcia tohto typu zhášania je závislá na prítomnosti špeciálneho proteínu PsbS v tylakoidných membránach, ale presný mechanizmus interakcie PsbS s fotosyntetickými komplexmi nie je známy (Li *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2001).

Jedna z navrhnutých hypotéz predpokladá priamu interakciu PsbS so svetlozbernou anténou Lhcb6 (Kovács *et al.*, 2006). Z tohto pohľadu je zaujímavé podrobnejšie analyzovať nefotochemické zhášanie u mutantných rastlín arábovky thalovej (*Arabidopsis thaliana*) bez svetlozberných antén Lhcb3 a Lhcb6 ako „hrubej“ analógie smreku obyčajného (*Picea abies*). O smreku je známe, že qE zložka nefotochemického zhášania je u neho prítomná aj napriek prirodzenej absencii svetlozberných antén Lhcb3 a Lhcb6 (Štroch *et al.*, 2008; Kouřil *et al.*, 2016). A pre objasnenie spomínaných skutočností sa v priebehu tejto práce pripravil knockout mutant v génoch *lhcb3*, *lhcb6* a *PsbS*. Charakterizácia tohto mutantu pomocou fluorescenčnej analýzy bola zameraná na nefotochemické zhášanie a mala viesť ku validácii výsledkov získaných v priebehu pilotných štúdií na *koLhcb3koLhcb6*.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 *Arabidopsis thaliana* ako modelový organizmus

Modelové organizmy sú v modernom biologickom výskume využívané na jednoduchšie získavanie nových informácií aplikovateľných pri štúdiu zložitejších organizmov. Prospešné sú hlavne pre štúdium univerzálnych procesov, typických pre určitú skupinu organizmov. Výber konkrétnych modelových organizmov je založený na požadovaných vlastnostiach pre modelové štúdiá. Rastlinná biológia pracuje hlavne s arábokou thalovou (*Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis*) ako modelovým organizmom pre vyššie rastliny.

Existuje niekoľko dôvodov, prečo bola práve *Arabidopsis*, nízka kvitnúca rastlina z čeľade kapustovité (*Brassicaceae*), zvolená za modelovú rastlinu. Pravdepodobne, jeden z najdôležitejších faktorov je malý diploidný génom, približne o veľkosti 120 Mbp, usporiadaný do piatich chromozómov (Meinke, 1998). Tento génom bol celý oskenovaný v roku 2000, čím sa *Arabidopsis* stala prvou rastlinou s úplne oskenovaným génomom (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Ďalším a veľmi dôležitým faktorom pre rýchle a efektívne získavanie informácií je nutnosť využívania organizmov s krátkou generačnou dobou, čo u *Arabidopsis* predstavuje životný cyklus okolo 8 týždňov. V porovnaní s inými rastlinami, u ktorých môže jedno generačné obdobie byť niekoľko mesiacov až rokov, predstavuje generačný cyklus *Arabidopsis* veľmi krátke obdobie. Táto rastlina dorastá do maximálnej výšky asi 30 cm, tieto malé rozmery majú veľkú výhodu pri pestovaní vo fytotronoch, špecializovaných komorách umožňujúcich pestovanie rastlín za presne kontrolovaných a opakovateľných podmienok. Celkový priestor vo vnútri fytotronov je limitovaný, a preto akákoľvek manipulácia či pestovanie rastlín s väčšími rozmermi predstavuje nechcené komplikácie. Posledným charakteristickým znakom pre *Arabidopsis* je samoopelenie, ktoré je hlavne využívané pri príprave mutantných rastlín. Samoopelenie umožňuje omnoho jednoduchšiu selekciu novovzniknutých mutantov než u cudzoopelivých rastlín. V súčasnosti nie je *Arabidopsis* využívaná len ako modelový organizmus na genetické štúdiá, ale taktiež aj v experimentoch zameraných na štúdium rastlinnej fyziológie (Koornneef a Meinke, 2010).

2.1.1 Knockout mutácie ako nástroj funkčnej genetiky

Knockout mutácie alebo nulové mutácie reprezentujú jeden z najdôležitejších nástrojov vo funkčnej genetike a to z dôvodu priameho pozorovania vzťahov medzi sledovanými génmi a rastlinnou fyziológiou (fenotypom) (O'Malley *et al.*, 2017). Knockout mutácie vznikajú vložением cudzej DNA do určitej oblasti génu záujmu (buď do kódovacej časti (exónu) alebo promótoru), čo následne vedie k znefunkčneniu konkrétneho génu. Takýmto spôsobom je možné priame pozorovanie zmien spôsobených nefunkčnosťou sledovaného génu (Krysan *et al.*, 1999).

Pri príprave knockout mutantov *Arabidopsis* je najčastejšie využívaná metóda pomocou transferovej DNA (T-DNA), pochádzajúcej z Ti-plazmidu (tumor-indukujúci plazmid) vyskytujúceho sa u *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium* je rod pôdnej baktérie, ktorá vytvára neoplastické ochorenia (crown gall, cane gall, hairy roots) u dvojkľúčolistových rastlinných druhov. V priestoroch týchto tumorov dochádza k prirodzenému presunu Ti-plazmidu do rastlín (Koncz *et al.*, 1989; Bouché, 2001; Gelvin, 2009; O'Malley *et al.*, 2017).

Z využívania T-DNA ako inzerčného mutagénu rastlín plynie výhoda v priamej produkcii fyzicky aj chemicky stabilných mutácií v DNA genóme, čiže nie je nutná stabilizácia inzertu. Ďalším pozitívom práce s T-DNA je náhodná inzercia T-DNA do genómu. T-DNA nemá špecifické integračné preferencie, ktoré by spôsobovali naväzovanie len na presne definované úseky v genóme (Parinov *et al.*, 1990; Azpiroz-Leehan a Feldmann, 1997).

Inou alternatívou využívanou pre prípravu knockout mutantov sú transpozóny. Transpozóny alebo transpozíčné elementy sú sekvencie DNA so schopnosťou zmeny vlastnej pozície v študovanom genóme (McClintock, 1950; Bourque *et al.*, 2018). Výhodou využívania transpozónov pri tvorbe mutantov je možnosť odstránenia transpozónu z genómu pomocou enzýmu transponázy. Výsledkom odstránenia transpozónu je reverzia mutácie. Ďalšou prednosťou transpozónov je aj ich jednoduchá lokalizačná determinácia pomocou mapovania reštrikčnými endonukleázami (Gelvin, 2009). Už spomínaná mobilita transpozónu je využívaná aj pri príprave viacerých mutácií génov zoradených tandemovo na jednom chromozóme, kvôli schopnosti transpozónu preskakovať na požadovanú sekvenciu (Krysan *et al.*, 1999).

2.1.2 Kolekcie inzerčných línií a ich dôležitosť vo výskume

Príprava mutantných rastlín „*de novo*“ je veľmi nákladný, pracný a dlhotrvajúci proces. Vedeckým skupinám bola príprava mutantných rastlín uľahčená pomocou niekoľkých projektov, ktoré boli zamerané na prípravu komplexných kolekcií inzerčných línií. V súčasnosti sú výsledky ich práce široko sprístupnené vo forme kolekcií v indexovaných inzerčných knižniciach, ako sú napríklad GABI-Kat, SAIL, WISC, SALK (Sessions *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Rosso *et al.*, 2003; Woody *et al.*, 2007).

Tieto kolekcie sú zložené z niekoľkých stoviek tisíc individuálnych inzerčných línií s detailnou dokumentáciou miesta mutácie. Všeobecne tieto knižnice predstavujú kľúčový zdroj mutantných alel pre funkčnú genetiku a *in vivo* charakterizáciu (O'Malley *et al.*, 2017).

2.2 Príprava *Arabidopsis* mutantov s mnohonásobnými mutáciami

2.2.1 Jednoduché mutantné línie

Ako už bolo spomínané, najjednoduchšou metódou pre prípravu mutantných rastlín je využitie predpripravených mutantov z inzerčných kolekcií (viz 2.1.2). Pri práci s knockout mutantmi sa za najlepšiu možnosť pokladá výber mutantov s inzerciami vo vnútri génu (exóne), pretože iné lokalizácie vmedzerenia T-DNA nemusia viesť ku kompletnému vyradeniu génu z jeho funkcie (Wang, 2008).

Funkčná genetika pri analýze génov využíva úplnú deaktiváciu génu, čiže u konkrétneho génu sa vyskytujú alely v homozygotne-recesívnej forme, čo umožňuje pozorovanie zmien fenotypu v porovnaní s kontrolnou rastlinou.

V niektorých prípadoch je úplná deaktivácia génu letálna, čiže akýkoľvek výskum na homozygotných mutantných rastlinách je znemožnený. Zo spomínaného dôvodu pre funkčnú genetiku sú alternatívami heterozygotné mutanty alebo rastliny s podregulovanou expresiou sledovaného génu (Krysan *et al.*, 1999). Pomerne veľkou komplikáciou práce s heterozygotnými mutantami je nevyhnutná kontrola alelickej formy génu v každej generácii, pretože heterozygotné zloženie génu nie je stabilné v rámci generácií.

2.2.2 Mutantné línie s mnohonásobnými mutáciami

Pre prípravu mutantných rastlín s viacerými mutáciami sa poskytuje možnosť využívania metódy kríženia rastlín s jednou mutáciou (viz. 2.1.2). Na základne kríženie

Arabidopsis existujú štandardizované protokoly ako napríklad Rivero *et al.* (2014), ktoré sa musia, ale upravovať podľa požiadavok prípravy niekoľkonásobných mutantov.

Základný princíp cieleného kríženia spočíva vo výbere vhodných kvetov na kríženie, z ktorých sa pred dozretím odstráni tyčinka a následne sa tieto kvety opelia pomocou peľu z požadovanej rastliny.

Takýmto spôsobom môžeme mať dozreté semiačka v priebehu 2 – 3 týždňov po opeľovaní. Stupeň zložitosti kríženia je odvodený od množstva mutácií, ktoré majú byť vytvorené súbežne a aj génovej väzby medzi génmi záujmu (viz. 2.2.2.3).

2.2.2.1 Najjednoduchší prípad – dvojitý mutant bez väzby génov

Dvojitý mutant bez génovej väzby reprezentuje najjednoduchšiu formu prípravy mutantu pomocou kríženia, dôvodov je hneď viacero. Jedným z nich je aj možnosť využitia rastlín z inzerčných kolekcí a už v priebehu druhej generácie potomkov je možné izolovať potrebného mutantu.

Pri takejto selekcii mutantných rastlín nedochádza ku žiadnej výnimke z Mendelových zákonoch. Tento fakt výrazne uľahčuje predpovedanie štiepneho pomeru potomkov s určitým genotypom v konkrétnej generácii, a tým pádom aj následné naplánovanie stratégie na segregáciu zvolených mutantov.

Vyššie spomínané Mendelové zákony predstavujú základné piliere genetiky, ktoré boli vyslovené v 19. storočí Gregorom Johannom Mendelom. Zákony vychádzajú z jeho vlastných pozorovaní zmien viacerých znakov u hrachu siateho (*Pisum sativum*). Tieto zákony sú až dodnes používané s malými obmenami v špeciálnych prípadoch pri kríženiach. Presné znenie týchto zákonov je:

1. Zákon dominancie (uniformity a reciprocity): zákon o jednotnosti prvej generácie krížencov F1 (filiálna) generácie, čiže F1 generácia získaná hybridizáciou homozygotných rodičov je genotypovo aj fenotypovo rovnaká (uniformná) a nezáleží na smere kríženia.

2. Zákon segregácie alel a ich kombinácií v druhej generácii krížencov: zákon štiepných pomerov – pri vzájomnom krížení F1 generácie dochádza ku vzniku súboru F2 potomkov, ktorí sú fenotypovo aj genotypovo odlišní v konštantných pomeroch, u úplnej dominancie je GP (genotypový pomer) 1 : 2 : 1 a FP (fenotypový pomer) 3 : 1, v prípade neúplnej dominancie sú oba pomery 1 : 2 : 1.

3. Zákon voľnej kombinovateľnosti alel: alely z rôznych génov sú schopné voľnej a nezávislej kombinovateľnosti a vytvárajú toľko typov gametických kombinácií, koľko ich je možných medzi vzájomne nezávislými veličinami. Pravdepodobnosť vzniku všetkých druhov je rovnaká (Snustad a Simmons, 2012).

Pred začatím každého kríženia je podstatná voľba správnej stratégie, ktorá sa zakladá na štiepnom pomere potomstva. Štiepny pomer sa dá vypočítať pomocou viacerých nástrojov, ktoré predstavujú aplikáciu Mendlových zákonov v praxi. Existujú tri základné typy nástrojov uľahčujúcich stratégiu pri krížení rastlín a to Punnettov štvorec, stromčeková metóda alebo metóda pravdepodobnosti. Základný princíp týchto metód je rovnaký, ale každá z metód predstavuje iný prístup k danej problematike (Snustad a Simmons, 2012). Pri konštrukcii stratégie selekcie trojitého mutantu vo výskume tejto práce bol využívaný Punnettov štvorec.

Punnettov štvorec je štvorcový diagram, ktorý slúži na určenie pravdepodobnosti genotypu potomkov a na sumarizáciu možných kombinácií materských a otcovských alel pomocou detailného spísania jednotlivých kombinácií. Základný princíp štvorca spočíva v rozpísaní otcovských alel na horizontálnej strane a materských alel na vertikálnej strane. Každý potomok, ktorý vzniká kombináciou z dvoch haploidných buniek počas meiózy, je nositeľom iba jednej kópie z rodičovského chromozómu, preto sa jednotlivé rodičovské alely spisujú navzájom ku sebe, čo predstavuje možnú kombináciu genotypu pre potomka (viz. Tab. 1) (Edwards, 2012).

Tab. 1 Punnettov štvorec pre heterozygotných mutantov v dvoch génoch.

		♂			
		AaBb			
♀	+	AB	Ab	aB	ab
	AaBb	AABB	AABb	AaBB	AaBb
	AABb	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
	aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
	ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

2.2.2.2 Trojitý mutant bez väzby

Mutant v troch génoch vyžaduje zložitejšiu formu selekcie, než bola vyššie spomínaná u dvojitého mutanta (viz 2.2.2.1). Náročnosť je ovplyvnená viacerými faktormi, medzi ne patrí aj poradie vhodnej generácie na rýchlu a nie veľmi časovo náročnú selekciu mutantov.

Na prípravu mutanta s homozygotne-recesívnymi alelami existujú viaceré spôsoby. Jeden spôsob sa odvíja od možnosti pracovania s rastlinami s jednou mutáciou (ko1 a ko2). Na začiatku sa najskôr skrížia títo dvaja mutanty za vzniku heterozygota (HZ) v znakoch 1 + 2 a následne sa HZ mutant skríži s mutantom pre tretí znak (ko3), čo vedie ku štiepnemu pomeru 1 : 3 pre selekciu HZ vo všetkých troch znakoch. Po samoopelení vzniká v ďalšej generácii štiepny pomer pre HM vo všetkých troch znakoch 1 : 63.

Obmenou tejto varianty je samoopelenie HZ v génoch 1 + 2 a vyselektovanie homozygota (HM) v znakoch 1 + 2. Až vyselektovaný HM sa skríži s ko3, čím sa docieli HZ vo všetkých sledovaných génoch. Po samoopelení sa potrebný mutant opäť vyberá s pravdepodobnosťou 1 : 63 (viz. Tab. 2). Nakoľko máme k dispozícii HM v génoch 1 + 2, pre uľahčenie selekcie sa môže HZ vo všetkých sledovaných génoch skřížiť s HM v génoch 1 + 2. V následnej generácii sa selektuje HM v génoch 1 + 2 a HZ v 3 géne so štiepnym pomerom 1 : 7. Tento mutant sa ponechá samoopeliť a v ďalšej generácii sa finálny mutant selektuje v pomere 1 : 3.

Tab. 2 Punnettov štvorec pre heterozygotného mutanta v troch génoch.

		AaBbCc							
		ABC	ABc	AbC	Abc	aBC	aBc	abC	abc
AaBbCc	ABC	AABBCC	AABBCCc	AABbCC	AABbCc	AaBBCC	AaBBCCc	AaBbCC	AaBbCc
	ABc	AABBCCc	AABBcc	AABbCc	AABbcc	AaBBCCc	AaBBcc	AaBbCc	AaBbcc
	AbC	AABbCC	AABbCc	AAbbCC	AAbbCc	AaBbCC	AaBbCc	AabbCC	AabbCc
	Abc	AABbCc	AABbcc	AAbbCc	AAbbcc	AaBbCc	AaBbcc	AabbCc	Aabbcc
	aBC	AaBBCC	AaBBCCc	AaBbCC	AaBbCc	aaBBCC	aaBBCCc	aaBbCC	aaBbCc
	aBc	AaBBCCc	AaBbcc	AaBbCc	AaBbcc	aaBBCCc	aaBBcc	aaBbCc	aaBbcc
	abC	AaBbCC	AaBbCc	AabbCC	AabbCc	aaBbCC	aaBbCc	aabbCC	aabbCc
	abc	AaBbCc	AaBbcc	AabbCc	Aabbcc	aaBbCc	aaBbcc	aabbCc	aabbcc

2.2.2.3 Vplyv väzby génov na kríženie

Génová väzba je sila, ktorou sú gény ležiace na rovnakom chromozóme navzájom priťahované do jednej štruktúry počas meiózy. Jediný spôsob akým môže dochádzať ku rekombinácii u takýchto génov je crossing-over, ktorý je ovplyvnený silou génovej väzby – vzdialenosťou medzi génmi. Ak gény ležia príliš pri sebe, môže sa percento rekombinácie blížiť k nule, no naopak pri vzdialenej lokalizácii génov môže byť pravdepodobnosť rekombinácie veľmi podobná voľnej kombinovateľnosti alel (Snustad a Simmons, 2012).

V prítomnosti génovej väzby prestáva platiť zákon o voľnej kombinovateľnosti alel (viz. 2.2.2.1) a v dôsledku toho sa komplikuje príprava stratégie pri krížení mutantov, keďže sa nedá využívať ani Punnettov štvorec na určovanie pravdepodobnosti štiepných pomerov. V takýchto prípadoch sa odhadujú štiepne pomery iba veľmi približne, a preto sa často pristupuje k metóde postupného kríženia, ako bolo opísané vyššie (viz. 2.2.2.2).

2.3 Genotypizácia a selekcia homozygotných rastlín

Selekcia homozygotných mutantných rastlín sa v určitých prípadoch dá previesť aj pomocou bežného pozorovania voľným okom. V takomto prípade gény nášho záujmu majú výrazné fenotypové prejavy. Nakoľko nie všetky gény majú fenotypový prejav na ich selekciu sa využíva metóda polymerázovej reťazovej reakcie (PCR).

2.3.1 Príprava vzorky

Pred samotnou genotypizáciou je potrebné vhodným spôsobom spracovať rastlinný materiál do formy vzorky, ktorá bude môcť byť použitá na genotypovanie pomocou PCR.

Jedna z pôvodných a pomerne náročných metód zahŕňa izoláciu čistej DNA. Dokonca pred samotnou izoláciou je potrebné rastlinný materiál, zvyčajne list, lyofilizovať – dehydratovať počas niekoľkých hodín. Taktiež vo všeobecnosti samotný proces izolácie DNA je obvykle pracný a často časovo i finančne náročný. (Murray a Thompson, 1980).

A tak pre rýchly skrining veľkého množstva rastlín sa ako alternatíva izolácie DNA využíva čerstvý materiál, ktorý sa vkladá iba do špeciálneho dilučného roztoku, čím je vzorka pripravená na ďalšie testovanie (Kuusisto a Chum, 2013). Na základe toho, že nie je potrebné nijak špeciálne upravovať rastlinný materiál, je celý proces výrazne urýchlený.

2.3.2 Princíp polymerázovej reťazovej reakcie

PCR metóda je kvôli širokému uplatneniu bežnou súčasťou medicínálnych i biologických laboratórií. Princíp PCR je založený na amplifikácii konkrétnej sekvencie DNA pomocou enzýmu DNA polymerázy, za postupného vzniku niekoľkých tisíc až miliónov kópií požadovaného fragmentu DNA. Celý proces zahŕňa tri hlavné kroky a to denaturáciu DNA vlákna, pripojovanie primerov a predlžovanie kopírovaného vlákna. V iniciálnom kroku prebieha denaturácia pomocou zvýšenej teploty 90 – 97 °C, čím sa docieli rozdelenie dvojvláknovej DNA na jednovláknovú.

Pre druhý krok je charakteristické, že každé vlákno DNA slúži ako templát, na ktorý nasadajú primery, malé fragmenty DNA, ako počiatok „replikácie“ konkrétneho úseku DNA. Využívané primere sú umelo syntetizované oligonukleotidové reťazce, ktorých sekvencie sa líšia v závislosti od amplifikovaného fragmentu DNA. Teplota, pri ktorej nasadajú primere na templátovú DNA je kritická a individuálna, pretože sa odlišuje na základe zloženia nukleových báz, dĺžky primerov aj od typu polymerázy, zvyčajne sa pohybuje okolo 50 – 62 °C.

Posledným krokom je kopírovanie/klonovanie DNA, pri teplote 65 – 75 °C po dobu 0 – 5 min, kedy sa na základe komplementárnosti nukleových báz – tymínu, adenínu, cytozínu, guanínu na templáte tvorí kópia DNA. Po ukončení jedného cyklu plynule pokračuje ďalší cyklus a počas jednej PCR reakcie sa môže uskutočniť 25 – 40 cyklov v závislosti od vzorky.

PCR je podobná replikácii v bunke, kde je napájanie komplementárnych báz sprostredkované DNA polymerázou I. Nakoľko DNA polymeráza I nie je stabilná pri vysokých teplotách, v PCR metódach je nahradzovaná teplotne stabilnými polymerázami, ktoré boli vyizolované z organizmov žijúcich v prostredí so zvýšenou teplotou. (Saiki *et al.*, 1988; Al-Soud a Rådström, 1998; Terpe, 2013; Ishino a Ishino, 2014) Medzi teplotne stabilné DNA polymerázy I patria Taq polymeráza vyizolovaná z *Thermus aquaticus* (Chien *et al.*, 1976), Tth polymeráza z *Thermus thermophilis* (Terpe, 2013), Tfu polymeráza z *Thermococcus fumicolans* (Cambon-Bonavita *et al.*, 2000), Tfi z *Thermus filiformis* (Choi *et al.*, 1999) a iné.

Významnou výhodou tejto techniky je jej rýchlosť, pri ktorej sa v každom cykle zdvojuje predchádzajúce množstvo fragmentov DNA. Teoretické zmnoženie fragmentov je 2^n , kde n je počet cyklov (Gibbs, 1990; Joshi a Deshpande, 2011).

Po PCR je potrebné vytvorený produkt charakterizovať, na čo sa najčastejšie využíva agarózová elektroforéza. Základným princípom takejto elektroforézy je oddelenie fragmentov DNA, na základe ich veľkosti s využitím rýchlosti pohybu negatívne nabitých molekúl DNA v géli smerom k pozitívne nabitej anóde v elektrickom poli gélu.

Hustota gélu, sa volí podľa veľkosti fragmentov, ktoré chceme izolovať – čím menší je očakávaný fragment, tým vyššia hustota gélu sa volí (viz. Tab. 3). A taktiež ďalší dôležitý faktor, ktorý ovplyvňuje rýchlosť pohybu fragmentov je napätie, ktoré by sa malo voliť v rozmedzí 5 – 8 V·cm⁻¹. V prípade príliš vysokého napätia sa znižuje rozložiteľnosť pásov a zvyšuje sa pravdepodobnosť topenia gélu (Ylmaz *et al.*, 2012).

Súčasťou aparatúry agarózovej elektroforézy je aj pufrálny roztok, v ktorom je vložený gél. Úloha pufru spočíva vo vyrovnávaní pH a vnášaní iónov na zlepšenie vodivosti. Medzi základné a najviac využívané tlmivé roztoky patrí TAE (Tris/Acetate/EDTA) a TBE (Tris/Borate/EDTA) (Lane *et al.*, 1992).

Vzorky, ktoré sú separované na agarózovom gély, nie sú vo väčšine prípadov zafarbené, a preto sa na vyobrazenie výsledkov využíva napríklad EtBr (etídium bromid – 2,7-diamino-10-etyl-9-fenylfenanthridiniumbromid). EtBr je fluorescenčné farbivo vmedzerujúce sa medzi nukleové bázy dvojláčkovej DNA a na jeho vizualizáciu sa využíva UV svetlo. Maximálna fluorescencia pre EtBr je pri 500 – 590 nm (Ylmaz *et al.*, 2012).

Ďalšími alternatívami pre vyfarbovanie vzoriek sú farbivá ako SYBR Gold, SYBR green, Crystal violet alebo Methyl Blue (Lee *et al.*, 2012).

Tab. 3 Predpokladaná separácia DNA fragmentov odvodená od koncentrácie gélu, prevzaté (Ylmaz *et al.*, 2012) a upravené.

Koncentrácia agarózy v géli (% [w·v ⁻¹])	Veľkosť dobre separovaných lineárnych DNA molekúl (kb)
0,3	5,0 – 60,0
0,6	1,0 – 20,0
0,7	0,8 – 10,0
0,9	0,5 – 7,0
1,2	0,4 – 6,0
1,5	0,2 – 3,0
2,0	0,1 – 2,0

2.3.3 Princíp genotypovania inzerčných línií

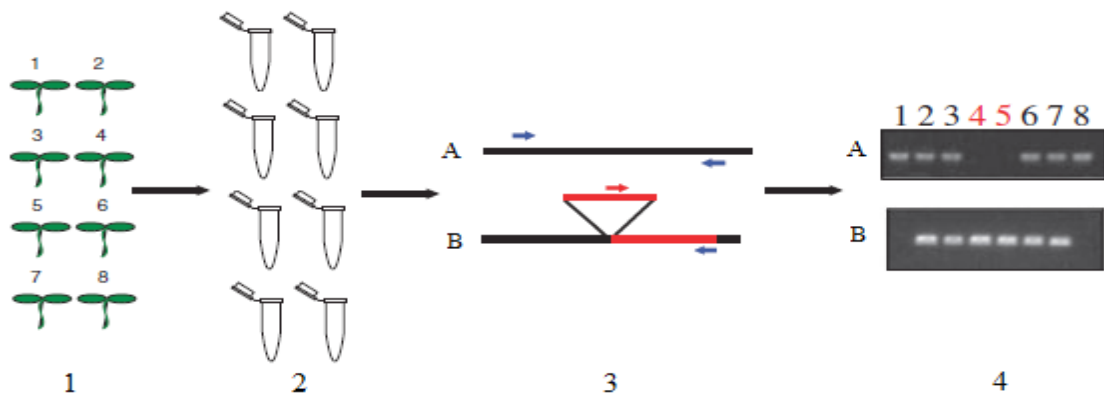
Ako už bolo spomínané, väčšinou sa výskumní pracovníci snažia o prípravu homozygotne-recesívneho mutantu v požadovanom géne. Na selekciu výsledných mutantov bez charakteristického fenotypového prejavu sa využíva už opísaná PCR metóda (viz. 2.3.2).

Vzorky rastlín sú testované pomocou dvoch typov párov primerov (divoký a mutantný typ) zložených z forward a reverse primerov. Pár primerov slúžiacich k detekcii prítomnosti inzercie v požadovanom géne zahŕňa jeden primer, ktorý je špecifický pre vloženú T-DNA a druhý, ktorý je genomický a viaže sa na genomickú sekvenciu v blízkosti inzercie. Tento genomický primer je navrhnutý buď na forward alebo reverse vlákno, podľa orientácie vlozenej T-DNA. Naopak primere pre divoký typ sú zložené z primerov, ktoré špecificky nasadajú iba na sekvenciu DNA bez inzercie. Tieto primery sú navrhnuté tak, aby miesto inzercie T-DNA ležalo na DNA vlákne medzi nimi.

Súčasné použitie týchto dvoch dvojíc primerov umožňuje selekciu homozygotných a heterozygotných mutantov i rastlín divokého typu. U rastlín divokého typu dochádza k amplifikácii DNA iba v prítomnosti primerov určených pre divoký typ, pretože replikácia nie je zastavená prítomnosťou inzerčnej T-DNA a primer špecifický pre T-DNA nemôže na vlákno nasadnúť. Naopak u mutantných homozygotných rastlín sa objaví amplifikácia iba v prítomnosti primerov mutantného typu, pretože prítomnosť dlhého úseku T-DNA zamedzí možnosti amplifikácie primerov pre divoký typ. A u heterozygotných mutantov sa amplifikujú oba primere, pretože jedno vlákno neobsahuje inzerčnú T-DNA, tým pádom prebehne replikácia tohto vlákna primerom divokého typu a v druhom vlákne sa nachádza inzercia, čo umožní amplifikáciu primerom mutantného typu (viz. Obr. 1) (O'Malley a Ecker, 2010).

2.4 Oxygénna fotosyntéza

Oxygénna fotosyntéza je jeden z najvýznamnejších biochemických procesov v prírode. Pre ilustratívne objasnenie fotosyntézy je možné proces fotosyntézy rozdeliť na dva typy reakcií: „reakcie závislé na svetelnej energii“ a „reakcie nezávislé na svetelnej energii“. Ku reakciám závislým na svetle sa v prvom rade radí absorbovanie svetelnej energie pomocou svetlozberných pigmentov a následné využitie tejto energie na produkciu ATP, redukciu NADPH a vytváranie O₂ ako vedľajšieho produktu. ATP

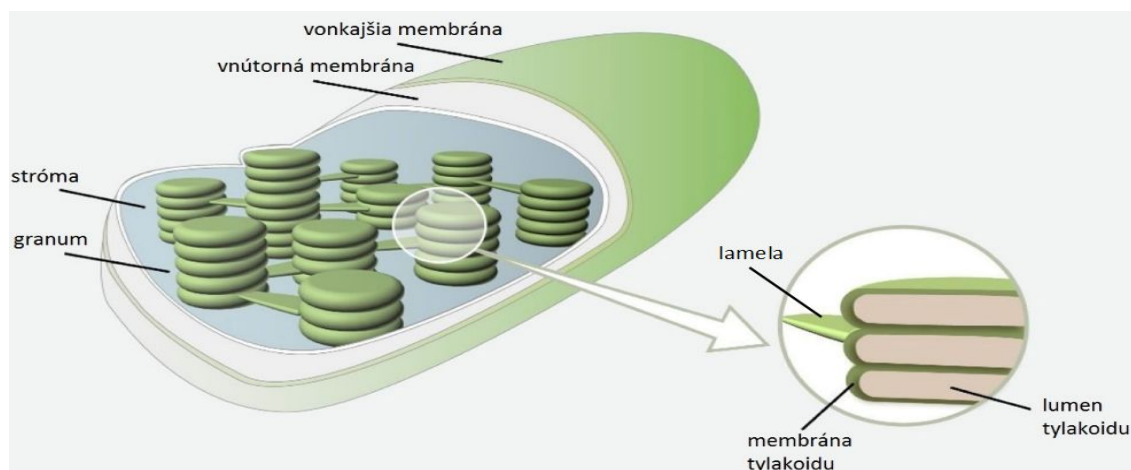


Obr. 1 Ilustratívny princíp genotypizácie mutantných rastlín pomocou PCR metódy. Pri genotypizácii sa na začiatku odoberie vzorka z listu testovanej rastliny (1. krok) a následne sa vyextrahuje DNA z každej rastliny individuálne (2. krok). V 3. kroku sa uskutočnia PCR reakcie – u každej testovanej vzorky sú potrebné 2 PCR reakcie – jedna s génovo-špecifickými primermi (divoký typ, 3A) a druhá s T-DNA a génovo-špecifickými primermi (mutantný typ, 3B). A v poslednom kroku (4.) sa určujú genotypy rastlín. V tomto prípade sú homozygotné mutantné rastliny vzorky 4 a 5, heterozygotné rastliny sú vzorky 2,3,6,7 a rastliny divokého typu sú 1 a 8; prevzaté (O'Malley a Ecker, 2010) a upravené.

a NADPH sú využívané počas reakcií nezávislých na svetelnej energii, v priebehu ktorých sa zachytávajú molekuly CO_2 z okolitého prostredia a sú prekonvertované do organických uhlíkatých zlúčenín (sacharidov) počas Calvinovho cyklu (Nelson a Junge, 2015; Mirkovic *et al.*, 2017).

Fotosyntéza je u eukaryotických organizmov lokalizovaná v špecializovaných organelách – chloroplastoch – dvojmembránových organelách zložených z vonkajšej a vnútornej membrány, a vnútro-membránového systému obklopeného tekutou strómou (viz Obr. 2). Vnútro-membránový systém alebo tylakoidné membrány sú tylakoidy usporiadané do stĺpcov – grán, ktoré sú navzájom poprepájané pomocou kanálov – lamel – slúžiacich na vzájomnú komunikáciu (Staehelein, 2005; Wise, 2007; Kouřil *et al.*, 2011). V tylakoidných membránach sa nachádzajú proteínové komplexy podieľajúce sa na svetelných reakciách fotosyntézy, zatiaľ čo reakcie nezávislé na svetle prebiehajú v okolitej stróme.

Fotosyntéza by nebola možná bez asimilačných pigmentov naviazaných v pigment-proteínových komplexoch, ktoré zabezpečujú zachytávanie dopadajúcich fotónov svetla. Medzi asimilačné pigmenty vyšších rastlín patria chlorofyly (chl) a karotenoidy.



Obr. 2 Schematická štruktúra chloroplastu u eukaryotických organizmov; prevzaté (Mirkovic *et al.*, 2017) a upravené.

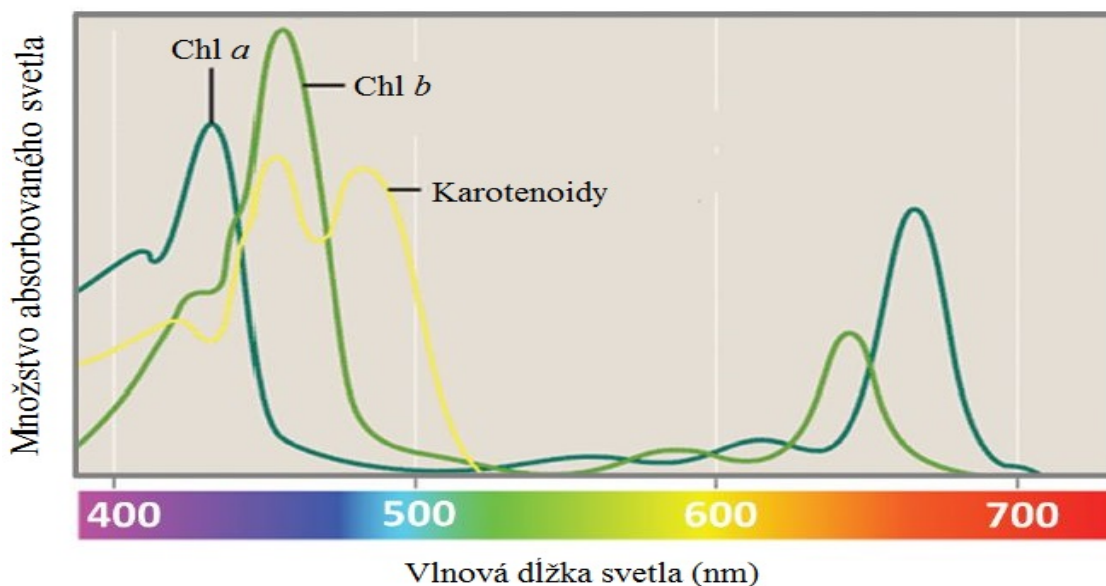
Chlorofyly (chl *a* a chl *b*) sú pigmenty zachytávajúce svetlo v modrej a červenej oblasti viditeľného spektra (chl *a* 430 nm, 662 nm a chl *b* 455 nm, 644 nm) a predstavujú hlavné fotosyntetické pigmenty u vyšších rastlín (Croce a van Amerongen, 2014; Johnson, 2016; Kuai *et al.*, 2018).

Karotenoidy (karotény – α , β -karotén atď.; xantofyly – zeaxantín, violaxantín, neoxantín, luteín atď.) zachytávajú svetelnú energiu v modrej oblasti viditeľného spektra, ale v iných vlnových dĺžkach (470 nm) ako chlorofyly (viz Obr. 3). Karotenoidy sú významné predovšetkým pri ochrane fotosystémov pred účinkami svetla o vysokej intenzite, pretože sa zúčastňujú regulovanej disipácie nadbytočnej energie (nefotochemické zhášanie) a chránia fotosystémy pred oxidatívnym poškodením (Mirkovic *et al.*, 2017).

2.4.1 Svetelná fáza fotosyntézy u vyšších rastlín

Na svetle závislá fáza fotosyntézy je zaistená spoluprácou rady proteínových a pigment-proteínových komplexov v tylakoidných membránach, kľúčové komplexy sú označované ako fotosystém I (PSI) a fotosystém II (PSII). PSII taktiež označovaný ako P680 (podľa vlnovej dĺžky absorpčného maxima špeciálneho páru chlorofylov v reakčnom centre tohto fotosystému) je prvý proteínový komplex vo svetelnej fáze oxygénnej fotosyntézy.

Úloha komplexu spočíva v prvotnom zachytení svetelnej energie, ktorá je transportovaná do reakčného centra (RC PSII) a využívaná na nábojovú separáciu. Elektróny sú z PSII prostredníctvom elektrón-transportného reťazca (plastochinóny,



Obr. 3 Absorpčné spektrum asimilačných pigmentov (chl *a*, chl *b* a karotenoidy) u vyšších rastlín; prevzaté (Guidi *et al.*, 2017) a upravené.

cytochróm *b6f* a plastocyanin) prenesené na PSI, kde dochádza k druhej nábojovej separácii (s využitím energie ďalšieho zachyteného fotónu) a následne sú elektróny transportované až na konečný akceptor NADP^+ . Prostredníctvom kyslík-vyvíjajúceho komplexu, ktorý je súčasťou PSII, dochádza k rozštiepeniu molekuly vody, čo vedie k uvoľneniu molekulárneho kyslíku a protónov do lumenu, a k redukcii oxidovaného RC PSII. Elektrónový transport zároveň vedie k translokácii protónov a tvorbe protónového gradientu cez tylakoidnú membránu, ktorý slúži na tvorbu ATP pomocou ATP syntázy (Gao *et al.*, 2018).

2.4.1.1 Fotosystém II

PSII je membránový proteínový komplex tvorený jadrom (core complex) a vonkajšími svetlozbernými anténami. Základ jadra PSII je tvorený dvojicou proteínov (D1 a D2), ktoré viažu všetky kofaktory nevyhnutné pre nábojovú separáciu a elektrónový transport, a na ktoré sú naviazané tzv. vnútorné svetlozberné antény (CP43, CP47). Na jadro PSII sú potom naviazané ďalšie, tzv. vonkajšie svetlozberné antény. Tieto vonkajšie antény sú na rozdiel od jadra do značnej miery variabilné a ich množstvo a usporiadanie je závislé na vonkajších podmienkach.

Slnecná energia, ktorá sa využíva na separáciu náboja, pochádza buď priamo z excitovanej molekuly Chl v RC PSII (veľmi malé percento pravdepodobnosti) alebo je

excitón transportovaný do RC PSII zo svetlozbernej antény. Prenos svetelnej energie medzi molekulami chlorofylu a následne aj do RC PSII je uskutočnený konceptom tzv. lievika; vonkajšie antény (najvzdialenejšie od RC PSII) absorbujú fotóny s najkratšími vlnovými dĺžkami, čiže s najväčšou energiou a vnútorné antény (bližšie k RC PSII) absorbujú fotóny s dlhšou vlnovou dĺžkou, čiže s menšou energiou. Koncept lievika zabezpečuje úspešné doručenie zachytenej svetelnej energie do RC PSII (Kouřil *et al.*, 2011).

2.4.1.2 Vonkajšie svetlozberné antény fotosystému II

Svetlozberné komplexy (light harvesting complexes; LHC) sú membránové proteíny s naviazanými asimilačnými pigmentami (chlorofyly a karotenoidy) (viz 2.4). Prepojenie medzi jednotlivými pigmentami je sprostredkované nekovalentnými väzbami ako sú napr. vodíkové, van der Waalsové interakcie či hydrofóbne interakcie, slúžiace na presun energie medzi pigmentmi navzájom (Johnson, 2016).

Majoritné svetlozberné antény

Majoritné LHC viažu až 70% všetkých chlorofylov z celého PSII (Nicol a Croce, 2019). Antény sú tvorené proteínmi, ktoré sa vo PSII vyskytujú výhradne vo forme heterotrimérov a sú kódované génmi *Lhcb1*, *Lhcb2* a *Lhcb3*. U *Arabidopsis* pestovaných pri normálnych svetelných podmienkach je pomer proteínov 6 : 2 : 1 pre *Lhcb1*, *Lhcb2* a *Lhcb3*, ale pomer je variabilný na základe podmienok pestovania (Jackowski *et al.*, 2001).

Signifikantne veľké rozdiely v pomeroch proteínov viedli k analýzam zameraným na bližšiu charakterizáciu svetlozberných proteínov. V prípade pestovania rastlín pri nízkej intenzite svetla dochádzalo ku zvýšenej akumulácii *Lhcb1/Lhcb2* proteínov, ale naopak pri vysokej intenzite svetla sa akumulácia znižovala. Akumulácia proteínu *Lhcb3* bola pomerne stabilná, čiže nebola tak veľmi ovplyvňovaná svetelnými podmienkami ako v prípade *Lhcb1* a *Lhcb2* proteínov (Damkjær *et al.*, 2009). Na druhej strane sa v neskoršej štúdii pozorovalo potlačenie expresie proteínu *Lhcb3* v prípade podmienok s vysokou intenzitou svetla (Kouřil *et al.*, 2013). Ba dokonca u *P. abies* bola dokázaná absencia proteínu *Lhcb3*, čo prelomilo dovtedajšiu dogmu o nutnej prítomnosti všetkých LHC proteínov (Kouřil *et al.*, 2016). V priebehu práce sa budeme bližšie zameriavať na *Lhcb3* majoritný LHC.

Lhcb3 proteín (kódovaný génom *Lhcb3*) patrí medzi najnovších členov LHC proteínov a predpokladá sa, že prvýkrát sa objavil až u suchozemských rastlín (Nicol a Croce, 2019).

Minoritné svetlozberné antény

Minoritné anténne komplexy vo PSII tvoria výrazne menší podiel (okolo 15 %) v naviazanom chlorofyle ako majoritné antény, z čoho vyplýva, že minoritné antény majú menšiu možnosť zachytávania svetelnej energie než majoritné antény. Minoritné antény sú dôležité predovšetkým pre reguláciu a distribúciu energie z majoritných antén do jadra PSII.

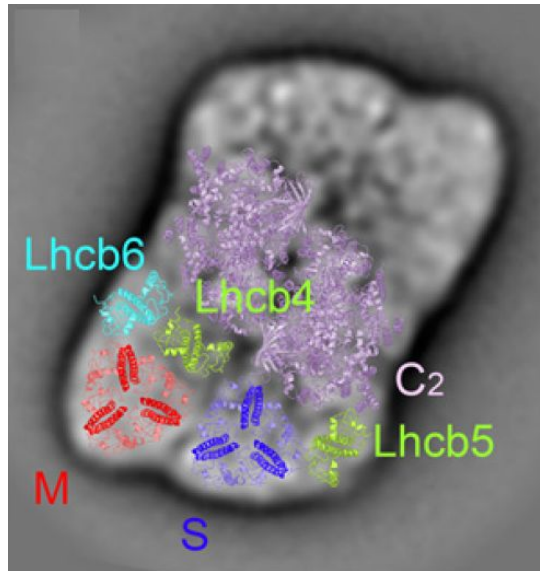
Medzi minoritné antény patria Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) a aj Lhcb6 (CP24), z pohľadu tejto práce sa budeme podrobnejšie zaoberať iba anténou Lhcb6. Lhcb6 proteín taktiež patrí k najmladším členom LHC proteínov, ktorí vznikli až po kolonizovaní súše. Podobne ako Lhcb3, i Lhcb6 je u *Arabidopsis* kódovaný iba jedným génom *Lhcb6* a jeho sekvencia je veľmi podobná majoritným LHC, ale v priebehu vývoja sa tu uskutočnili evolučné zmeny, takže jej vlastnosti sa líšia (Passarini *et al.*, 2009).

V priebehu testovania rastlín pestovaných pri rôznych svetelných podmienkach, bola pozorovaná znížená expresia proteínu Lhcb6 pri podmienkach s vysokou intenzitou svetla (Kouřil *et al.*, 2013).

2.4.1.3 Fotosystém II superkomplex

PSII je v tylakoidných membránach prítomný vo forme dimérov. Typická forma tohto diméru vyskytujúceho sa u vyšších rastlín za bežných podmienok je označovaná ako PSII superkomplex $C_2S_2M_2$, kde „ C_2 “ je dimér jadra PSII, na ktorý sú prostredníctvom minoritných antén naviazané štyri trimery tvorené majoritnými svetlozbernými proteínmi (trimery proteínov kódovaných génmi *Lhcb1* – *3*) – dva trimery sú zložené z proteínov kódovaných génmi *Lhcb1* a *Lhcb2*, sú silno naviazané („ S_2 “, strongly bound) a dva, ktoré okrem proteínov *Lhcb1* a *Lhcb2* obsahujú aj proteíny *Lhcb3*, sú naviazané slabšie („ M_2 “, moderately bound) (Boekema a Semchonok, 2019).

Monomérne minoritné antény sú kľúčové pre naviazanie S i M trimerov k C_2 . Trimery S sú viazané prostredníctvom minoritnej antény *Lhcb5* a M trimery sú viazané prostredníctvom *Lhcb4* a *Lhcb6* antén (viz. Obr. 4) (Hankamer *et al.*, 1997; Caffarri *et*



Obr. 4 Štruktúrne zloženie proteínových podjednotiek PSII $C_2S_2M_2$, superkomplex u *Arabidopsis*, C_2 – jadro, M a S – majoritné antény, Lhcb4 – 6 – minoritné antény; prevzaté (Kouřil *et al.*, 2016) a upravené.

al., 2009; Croce a van Amerongen, 2011; Duffy *et al.*, 2013; van Amerongen a Croce, 2013).

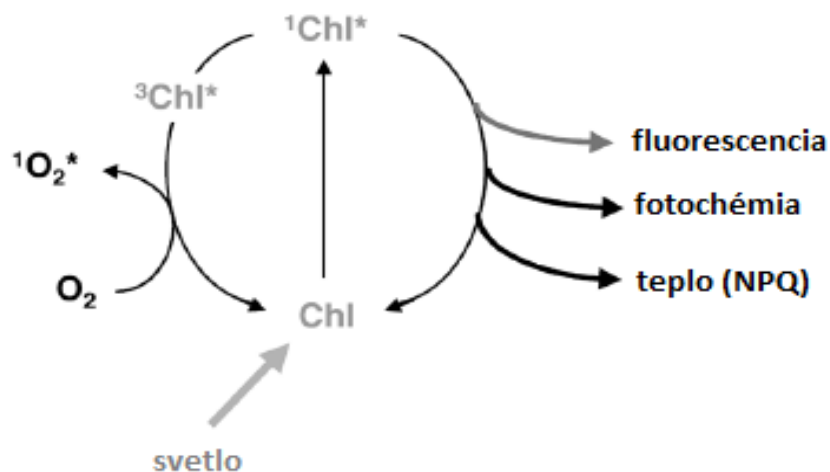
Superkomplex $C_2S_2M_2$ nie je jediná možná forma superkomplexu PSII, boli pozorované i iné formy, napríklad typicky u rastlín vystavených vysokej intenzite svetla dochádza k odpojeniu M trimeru a prevládajúca forma PSII je C_2S_2 (Boekema *et al.*, 2000).

2.4.2 Nefotochemické zhášanie, jeho význam a regulácia

2.4.2.1 Cesty absorbovanej energie

Rastliny ako sesilné organizmy – bez možnosti pohybu – si vyvinuli sofistikovanú sieť mechanizmov zabezpečujúcich čo najväčšiu výnosnosť fotosyntézy v rôznych variantách svetelných podmienok či už v priebehu dňa, alebo životného cyklu.

Absorpcia svetla spôsobuje excitáciu chlorofylu – prechod zo základnej spinovej hladiny do excitovanej hladiny ($^1\text{Chl}^*$). Takto excitovaný chlorofyl môže pohltenú energiu naspäť vyžiariť vo forme fotónu (tzv. fluorescencia chlorofylu) alebo ju môže preniesť až do reakčného centra (RC), kde je využitá na nábojovú separáciu (tzv. fotochemické zhášanie fluorescencie chlorofylu) (viz. Obr. 5).



Obr. 5 Spôsoby deexcitácie chlorofylu; prevzaté (Müller *et al.*, 2001) a upravené.

Ak sa rastlina nachádza v prostredí s vysokou intenzitou svetla, vzniká nadmerne excitovaný chlorofyl, ktorý rastlina nedokáže spracovať vo fotosyntéze. Predĺžená doba života excitovaného chlorofylu zvyšuje pravdepodobnosť jeho prechodu do tzv. tripletového excitovaného stavu ($^3\text{Chl}^*$), ktorý je schopný prenášať energiu na kyslík a tým vytvárať excitovaný singletový kyslík. Tento excitovaný singletový kyslík patrí medzi tzv. reaktívne formy kyslíku (reactive oxygen species; ROS) (viz. Obr. 5) (Müller *et al.*, 2001). Ďalšie formy ROS môžu vznikáť v prípade preredukovania elektrónového transportného reťazca v dôsledku nadmerného prísunu slnečnej energie. ROS sú pre rastlinný organizmus nebezpečné hlavne z pohľadu oxidatívneho stresu, ktorý môže spôsobovať rozsiahle poškodenia nie len PSII, ale akýchkoľvek biomolekúl, čo môže byť v krajných prípadoch pre rastlinu až letálne.

Aby rastliny zabránili prenosu energie na kyslík, vyvinuli si radu mechanizmov, ktorými sú schopné regulovane premieňať nadbytočnú energiu na teplo – hovoríme o tzv. nefotochemickom zhášaní (NPQ).

2.4.2.2 Nefotochemické zhášanie

NPQ je proces kľúčový pre prežitie rastlín v prírode s neustále sa meniacimi podmienkami, nakoľko napomáha optimalizovať prostredie pre najneefektívnejšie využitie fotosyntézy. Existuje niekoľko typov NPQ, tri najvýznamnejšie sa označujú ako qE (zhášanie závislé na energii), qT (zhášanie závislé na stavových prechodoch spojených s presunom svetlozberných antén medzi PSII a PSI) a qI (fotoinhibičné zhášanie).

Jednotlivé zložky sa líšia rýchlosťou relaxácie po umiestnení rastliny do tmy – qE relaxuje veľmi rýchlo, v priebehu v sekundách až minút, qT mizne v desiatkach minút a qI relaxuje veľmi pomaly v priebehu hodín (Müller *et al.*, 2001). Najdôležitejšou zložkou pre nás v priebehu tejto štúdie bude qE.

Existuje priame prepojenie medzi indukciou qE a prítomnosťou proteínu pomenovaného PsbS, ktorý nie je stabilnou súčasťou PSII. Tento proteín interaktívne reaguje na zmeny pH v lumene, ktoré sú spôsobené vysokou intenzitou svetla a funguje ako senzor, ktorý spúšťa procesy vedúce k qE (Li *et al.*, 2000; Betterle *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2017; Pinolla *et al.*, 2019).

PsbS polypeptid neobsahuje pigment-naväzujúce miesto, ktoré by priamo umožňovalo disipáciu energie, namiesto neho sa tu vyskytuje protonovateľné miesto (Müller *et al.*, 2001).

Nakoľko presný molekulárny mechanizmus účinkovania PsbS nie je doteraz známy, uskutočnilo sa mnoho projektov, ktoré by mohli pomôcť objasniť jeho princíp. Predpokladá sa, že by PsbS proteín mal interagovať s niektorou minoritnou anténou a/alebo indukovať zhášanie v LHC trimeroch. Počas štúdií sa zistilo, že v prípade pestovania rastlín pri vysokej intenzite svetla dochádza k akumulácii PsbS proteínu, čo má následnú koreláciu v podobe zrýchlenia qE zložky NPQ. V prípade nízkej intenzity svetla dochádza ku znižovaniu akumulácie PsbS, aby sa zabránilo nepotrebnému zhášaniu slnečnej energie (Ballottari *et al.*, 2007).

Arabidopsis mutant s inzerciou v géne *PsbS* je citlivý na vysokú intenzitu svetla v dôsledku nefunkčnosti qE. Zaujímavosťou je, že pri nízkej intenzite svetla vykazoval tento mutant rýchlejšiu rast v porovnaní s divokým typom (Dall'Osto *et al.*, 2005).

PsbS proteín je taktiež kľúčový pri ochrane PSII aj pomocou xantofylového cyklu, aj keď presný mechanizmus ešte nie je úplne známy. Xantofylový cyklus je aktivovaný po znížení pH v lumene tylakoidu, ktorý vzniká v dôsledku nerovnováhy medzi aktivitou fotosyntetického elektrónového transportu a aktivitou ATP syntázy. Táto nerovnováha nastáva napríklad pri vysokej intenzite svetla.

Na začiatku je nízkym pH aktivovaný enzým violaxantín deepoxidáza, ktorý konvertuje na anteraxantín a nakoniec na zeaxantín. Zatiaľčo violaxantín funguje ako svetlozberný pigment, hlavná rola zeaxantínu je v disipácii prijatej energie na teplo. V prítomnosti proteínu PsbS sa zeaxantín zapája do nefotochemického zhášania.

Po opätovnom nastavení podmienok s nízkou alebo nulovou intenzitou svetla dochádza k postupnému návratu ku violaxantínu cez anteraxantín pomocou enzýmu zeaxantín epoxidázy (Demming-Adams a Adams, 1996).

2.4.3 Chlorofylová fluorescencia ako nástroj štúdia fotosyntézy

2.4.3.1 Základné parametre

Pri využívaní chlorofylovej fluorescencie (vznikajúcej deexcitáciou chlorofylu) na štúdium fotosyntézy, sa využívajú definované parametre, ktoré slúžia na interpretáciu vlastností fotosyntézy. Medzi základne parametre patria:

- Minimálna fluorescencia, F_0 – fluorescencia získaná pri maximálne otvorených RC a minimálnom NPQ – minimálna fluorescencia, ktorú je možné namerať zábleskami o veľmi nízkej intenzite svetla po 20 – 30 min temnostnej adaptácie rastlín.

- Maximálna fluorescencia, F_m – maximálna fluorescencia nameraná u rastlín s minimálnym NPQ – u rastlín adaptovaných na tmu po prvej aplikácii saturačného pulzu (viz. nižšie).

- Maximálna fluorescencia na svetle, F_m' – maximálna fluorescencia, ktorá je zmeraná po F_m pomocou saturačného pulzu, ale počas zapnutého aktinického svetla. F_m' predstavuje nižšiu hodnotu ako F_m v dôsledku aktivovaného NPQ.

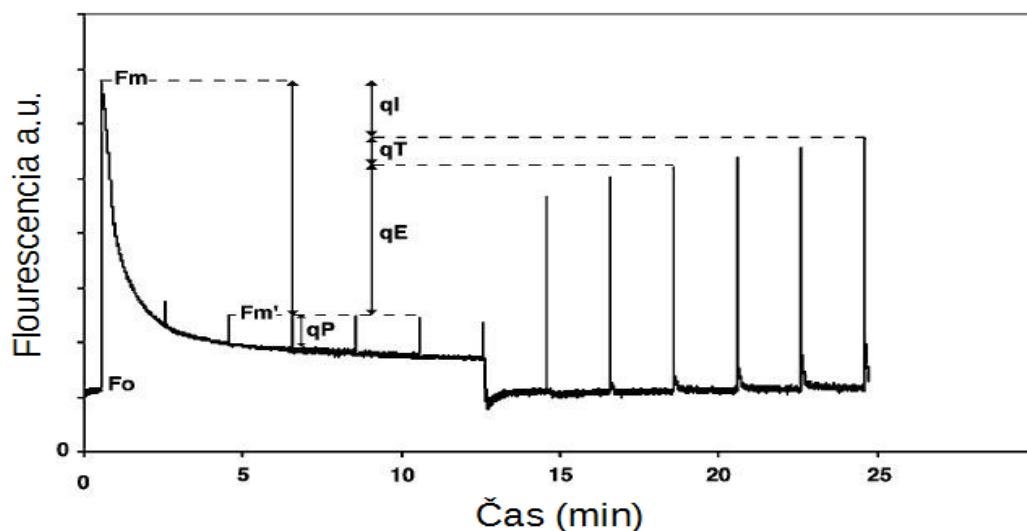
- Maximálny kvantový výťažok fotochémiie PSII, F_v/F_m – používa sa ako indikátor stresových podmienok. Za optimálnych podmienok u nestresovaných a dostatočne na tmu adaptovaných rastlín je $F_v/F_m \geq 0,8$. Hodnoty nižšie ako 0,8 sú indikátorom stresu. Hodnota F_v/F_m sa vypočíta podľa rovnice: $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$; kde F_v je tzv. variabilná fluorescencia (Heinz Walz GmbH, 2009).

2.4.3.2 Zhášacia analýza

Zhášacia analýza fluorescencie chlorofylu predstavuje jednu z najpopulárnejších metód na analýzu NPQ. Pre túto metódu sa používajú rastliny, ktoré sú adaptované na tmu 20 – 30 min pre docielenie úplnej oxidácie elektrónových prenášačov a relaxácie NPQ.

V prvom kroku sa stanoví parameter F_0 , získavaný pomocou svetelných pulzov o nízkej intenzite ($\sim 0,1 \mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR), kedy RC sú otvorené.

Následne sa zmeria parameter F_m aplikáciou saturačného pulzu ($\sim 4000 \mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) po dobu $\sim 1\text{s}$ na fotosyntetizujúce pletivo. Po osvietení saturačným pulzom, sa redukuje všetok plastochinón A (QA), čo má za následok „zatvorenie“ RC a zvýšenie fluorescencie.



Obr. 6 Analýza chlorofylovej fluorescence na listoch *Arabidopsis*. Parameter F_o je meraný pomocou slabého svetla v období s maximálne otvoreným RC. V ďalšom kroku sa saturačným pulzom uzavrie RC a zmeria sa F_m . Po zapnutí aktinického svetla sa meria F_m' za prítomnosti saturačných pulzov. Pri stálom osvetlení vzorky sa fluorescence znižuje v dôsledku fotochemického (q_P) a nefotochemického zhášania (NPQ ($q_E + q_T + q_I$)); prevzaté (Müller *et al.*, 2001) a upravené.

Následne dochádza ku zapnutiu tzv. aktinického svetla, v priebehu osvetlenia sú opäť aplikované saturačné pulzy pre zmeranie parametru F_m' (viz. Obr. 6) (Murchie a Lawson, 2013; Stirbet *et al.*, 2014; Pinolla *et al.*, 2019).

2.5 Motivácia bakalárskej práce

Nedávne výskumy poukázali na neprítomnosť svetlozberných komplexov Lhcb3 a Lhcb6 u *P. abies* (Kouřil *et al.*, 2016), čo indukovalo otázku – akým spôsobom *P. abies* hospodári so svetlom? A taktiež bola uverejnená iná štúdia s knockout mutantom v géne *Lhcb6*, v ktorej bola prezentovaná hypotéza, že q_E zhášanie (PsbS-závislé) je do veľkej miery závislé na prítomnosti Lhcb6 (Kovács *et al.*, 2006).

Z týchto dôvodov sa vytvorila „hrubá“ analógia *P. abies* pomocou knockout mutantov *Arabidopsis* v génoch *Lhcb3* a *Lhcb6*. V priebehu pilotných experimentov s pripraveným mutantom boli pozorované zmeny v nefotochemickom zhášaní a taktiež aj netypický fenomén – pokles maximálneho kvantového výťažku fotochemie PSII po dlhodobej adaptácii na tmu. Aby sa zistilo, či je toto chovanie mutantu *koLhcb3koLhcb6* závislé na prítomnosti proteínu PsbS, v rámci tejto bakalárskej práce sa vytvoril mutant

A. thaliana koLhcb3koLhcb6koPsbS. U tohto trojitého mutanta bola následne prevedená základná fyziologická charakterizácia so zameraním na analýzu funkcie PSII a nefotochemického zhášania.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Rastlinný materiál

Arabidopsis thaliana – ekotyp Columbia (Col-0)

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*

Arabidopsis thaliana – mutant *koPsbS* (SALK_095156) s T-DNA inzerciou v kódujúcej oblasti génu *PsbS*

3.1.2 Prístrojové vybavenie

Analytické váhy (Scaltec instruments GmbH, Nemecko)

Centrifúga (Labnet International, Inc., USA)

DUAL-Pam-100 (Walz, Nemecko)

Fotoaparát (Nikon D5600, Japonsko)

Fytotron (Weiss Gallenkamp, Veľká Británia)

Horizontálna elektroforetická komôrka (Thermo Fisher Scientific, USA)

Chlorofylmeter SPAD-502DL (Konica Minolta, Inc., Japonsko)

Lyofilizátor (LaboGene, Dánsko)

Malá centrifúga (VWR, Inc., USA)

Mixer Mill (Retsch GmbH, Nemecko)

PEA meter (Hansatech, Veľká Británia)

Sada automatických pipiet (Nichipet, USA)

Spektrofotometer NanoDrop[®] ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Svetelný mikroskop M400 (Wild Heerbrugg, Švajčiarsko)

Thermal cycler (Bio-Rad, USA)

UV transilluminátor (Syngene International Limited, India)

Vodná lázeň (Grant Instruments Ltd, Anglicko)

Vortex mixér (Heidolph, Nemecko)

Zdroj jednosmerného napätia (Thermo Fisher Scientific, USA)

Ostatné pomôcky: mikrovlnná rúra, nitky, papierové vrecúška, pinzety, plastové mikroskúmvavky (Eppendorf, Nemecko)

3.1.3 Softwary pre spracovanie výsledkov

Microsoft Excel (MS Office, USA)

ImageJ (online)

3.1.4 Chemikálie

0,5x TBE (Tris/Borate/EDTA) pufer, agaróza (Sigma, USA), destilovaná H₂O, etanol 70%, etanol 96%, etídium bromid, čistiaci prostriedok na GMO – Krystal SANAN KLASIK

Použité kity

NucleoSpin® Plant II kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

Thermo Scientific™Phire™Plant Direct PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.2 Metódy

3.2.1 Príprava trojitého mutantu *koLhcb3koLhcb6koPsbS*

3.2.1.1 Rastlinný materiál a podmienky pestovania

V priebehu experimentov sa využívali rastliny *Arabidopsis thaliana*. Konkrétne to boli genotypy divokého typu (wild type, WT; ekotyp Columbia, Col-0) a mutantné línie s inzerciou v géne pre proteín PsbS (*koPsbS*), a dvojitý mutant s inzerciami v génoch pre svetlozberné proteíny Lhcb3 a Lhcb6 (*ko3+6*). Tento dvojitý mutant bol pripravený skrížením individuálnych mutantov *Arabidopsis* s inzerciou v géne pre proteín Lhcb3 (*koLhcb3*) a s inzerciou v géne pre proteín Lhcb6 (*koLhcb6*) v rámci iného projektu (Ilíková *et al.*, nepublikované výsledky).

Pred výsevom sa semená stratifikovali v mikroskúmavkách naplnených destilovanou vodou a zabalených alobalovou fóliou, pri teplote 5 – 7 °C v priebehu dvoch dní. Následne sa semená vysadili do kvetináčov so zeminou a zakryli potravinárskou fóliou s dierkami na podporu klíčenia, po dobu jedného týždňa. Pestovanie prebiehalo vo fytotrone pri podmienkach: deň – 16 h, 19 °C, 65% vlhkosť, intenzita svetla – 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; noc – 8 h, 18 °C, 65% vlhkosť, nulová intenzita svetla – tma.

3.2.1.2 Kríženie rastlín

Kríženie rastlín sa realizovalo podľa protokolu na kríženie *Arabidopsis* zostaveného Rivero *et al.* (2014).

Pracovalo sa so štvortýždňovými rastlinami, u ktorých sa upravili vybrané stonky s vhodnými kvetmi – odstrihli sa samoopelené kvety a šesule. Následne sa u kvetov určených na kríženie odstránili všetky tyčinky pomocou pinziet očistených v 96% etanole pod svetelným mikroskopom (Wild Heerbrugg, Švajčiarsko).

Po 2 – 3 dňoch od odstránenia tyčiniek bolo uskutočnené kríženie – materské kvety boli opelené priložením otcovských zrelých tyčiniek na bliznu materskej rastliny. Dozreté semiačka sa pozbierali a použili na ďalší experiment.

3.2.1.3 Genotypová analýza mutantov

3.2.1.3.1 Príprava vzorky – priama metóda

Pri príprave vzoriek pomocou priamej metódy sa využíval postup doporučený v manuále Thermo Scientific™ Phire™ Plant Direct PCR Master Mix kitu, ktorý sme používali pri celom genotypovaní.

Do mikroskúmavky s 20 μl dilučného puftru (súčasť Phire Plant Direct PCR Master Mix kitu, ThermoFisher Scientific) sa vložila vzorka listu minimálne zo štrnásťdňové rastliny o rozmeroch približne 1 – 2 mm^2 , ktorá sa extrahovala rozotrením o stenu mikroskúmavky pomocou špičky pipety. Tento extrakt bol následne použitý pre PCR. Na odstrihnutie vzorky sa používali nožnice, ktoré boli medzi jednotlivými vzorkami očistené pomocou kombinácie – čistiaceho prostriedku na GMO – Krystal SANAN KLASIK, 70% etanolu a nakoniec destilovanej vody. V prípade potreby boli tieto vzorky uschované pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.1.3.2 Príprava vzorky – nepriama metóda

U nepriamej metódy sa využíva izolovaná DNA. Pred izoláciou DNA je nutné rastlinný materiál špeciálne upraviť – listy zo štvortýždňových rastlín o rozmeroch cca 3 cm^2 boli cez noc lyofilizované a zároveň aj vákuovo vysušené v mikroskúmavkách. V ďalšom kroku boli listy homogenizované za prítomnosti sklenených guľôčiek – 4 min pri 130 min^{-1} .

Na izoláciu DNA sa využíval NucleoSpin® Plant II kit. V prvom kroku sa v homogenizovanej vzorke docielila lýza buniek za použitia puftru PL1, RNázy a inkubácie pri $65\text{ }^\circ\text{C}$. Novovzniknutý hrubý lyzát sa prečisťoval v NucleoSpin® Filtri a ku vzniknutému filtrátu sa pridal PC pufer, ktorý zvýšil väzbovosť DNA. DNA sa naviazala na NucleoSpin® Column počas ďalšej filtrácie. NucleoSpin® Column sa následne vymýval trikrát kvôli prečisteniu vzorky – jedenkrát v PW1 pufre a potom dvakrát v PW2 pufre. Posledným krokom pri izolácii DNA z listov bola elúcia DNA z NucleoSpin® Column a to pomocou dvojitého filtrovania PE pufrom, ktorý bol zohriaty na teplotu $65\text{ }^\circ\text{C}$.

Po izolácii DNA sa osobitne spektrofotometricky stanovovala koncentrácia pre každú vzorku pri vlnových dĺžkach 260 nm a 280 nm na NanoDrop® ND-1000 (ThermoFisher Scientific, USA).

3.2.1.3.3 Polymerázová reťazová reakcia

Genotypizácia sa uskutočnila pomocou Thermo Scientific™ Phire™ Plant Direct PCR Master Mix kitu podľa protokolu doporučeného výrobcom. Pri príprave jednej reakčnej zmesi o objeme 20 μl sa postupne pipetovalo 9,1 μl destilovanej vody, 10 μl Phire Plant Direct PCR Master Mix (MM), 0,4 μl zmesi požadovaných primerov o koncentrácii 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (viz. Tab. 4), ktoré boli kombinované, ako je uvedené v tabuľke č. 5 a objem

Tab. 4 Sekvencie primerov použitých počas genotypizácie.

Sledovaný gén	Typ primeru	Sekvencia primeru
LBb1 – T-DNA v SALK inzerčných líniách	univerzálny	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
<i>Lhcb3</i>	FP	AGAATTCCTGGCGATTATGG
	RP	ATAAAGGTCGTCACCGGAAATG
<i>Lhcb6</i>	FP	GGTGAGGAACGAAGAACCAA
	RP	CCAAACTCCCGACTTTACCA
<i>PsbS</i>	FP	TGGACGCACTTTAAGCCCAT
	RP	CGGACACTACACTTAGGCCA

Tab. 5 Kombinácie primerov využitých na genotypovanie.

Sledovaný gén	Kombinácia primerov	Označenie amplifikačného produktu	Odhadovaná veľkosť produktu (bp)
<i>Lhcb3</i>	Lhcb3 FP + Lhcb3 RP	WT_3	920
	Lhcb3 FP + LBb1	MUT_3	600
<i>Lhcb6</i>	Lhcb6 FP + Lhcb6 RP	WT_6	730
	Lhcb6 FP + LBb1	MUT_6	300
<i>PsbS</i>	PsbS FP + PsbS RP	WT_S	950
	PsbS RP + LBb1	MUT_S	600

bol doplnený 0,5 µl testovanej vzorky (extrakt získaný v dilučnom pufre, respektíve vyizolovaná DNA; viz. 3.2.1.3.1, respektíve 3.2.1.3.2). Všetky komponenty reakčnej zmesi boli premiešané a vzorky sa nechali zmnožiť podľa PCR protokolu s podmienkami uvedenými v tabuľke č. 6. Teplota použitá v kroku nasadenia primerov sa vypočítala pomocou nástroju na stránke ThermoFisher Scientific Home Page (www.thermoscientific.com/pcrwebtools).

3.2.1.3.4 Agarózová elektroforéza

Amplifikácia génov bola overená agarózovou elektroforézou na 1,5% géli, ktorý sa pripravil rozmiešaním agarózy v 0,5x TBE (Tris/borate/EDTA) pufre a nechal sa rozpustiť v mikrovlnnej rúre. Po schladení asi na teplotu 60°C sa tekutý gél vylial na elektroforetickú vaničku s elektroforetickými hrebeňmi a ponechal stuhnúť. Na gél sa naniesli vzorky spoločne s veľkostným markerom (100 bp ladder). Elektroforéza

Tab. 6 PCR protokol využívaný v priebehu genotypizácie rastlinných vzoriek.

Cyklický krok	Teplota	Čas	Cykly
Iniciálna denaturácia	98 °C	5 min	1
Denaturácia	98 °C	5 s	
Nasadenie primerov	63 °C	5 s	39
Elongácia	72 °C	25 s	
Finálne ukončenie	72 °C	1 min	1
	4 °C	∞	

prebiehala 60 minút pri 4 V·cm⁻¹. Po ukončení elektroforézy sa gél vyfarbil v EtBr v priebehu 15 – 20 min a vyfotografoval v UV transilluminátore (600 ms).

3.2.2 Fyziologická charakterizácia rastlín

3.2.2.1 Rastlinný materiál a podmienky pestovania

Semena *Arabidopsis* (WT, *koPsbS*, *ko3+6* a *koLhcb3koLhcb6koPsbS*), boli stratifikované a vysadené do zemi (viz. tiež 3.2.1.1). Rastliny určené pre fyziologickú charakterizáciu boli pestované vo fytotrone pri podmienkach: deň – 8 h, 21 °C, intenzita svetla 100 μmol·m⁻²·s⁻¹, 65% vlhkosť; noc – 16 h, 21 °C, 65% vlhkosť. Rastliny pre experimenty boli odobrané v priebehu 7 týždňa ontogenézy.

3.2.2.2 Stanovenie obsahu chlorofylu v listoch

Množstvo chlorofylu v listoch sa stanovovalo nedeštruktívnou metódou – chlorofylmetrom (SPAD-502DL, Japonsko), ktorý pracuje na základe merania priepustnosti listu pre dve rôzne vlnové dĺžky – 650 nm (veľká absorbanca chlorofylu) a 940 nm (minimálna absorbanca chlorofylu). Získané hodnoty z prístroja sú v jednotkách SPAD (soil-plant analysis developmnet), čo sú relatívne jednotky podľa názvu prístroja chlorofylmetra SPAD-502DL.

Merané listy sa ponechali na pôvodnej rastline, vysunuli sa do meracieho klipu, ktorý sa po vložení listu uzavrel a výsledný obsah chlorofylu sa stanovil ako priemer 5 hodnôt z viacerých listov na rastline.

3.2.2.3 Vyhodnotenie hmotnosti čerstvej biomasy nadzemnej časti rastliny

Čerstvá hmotnosť nadzemnej časti rastliny (rastlina bola odstrihnutá tesne pod prízemnou ružicou) jednotlivých genotypov (WT, *koPsbS*, *ko3+6*, *koLhcb3koLhcb6koPsbS*) bola stanovená ako priemer hmotností, ktoré sa zistili pomocou analytických váh.

3.2.2.4 Meranie fotosyntetických parametrov

3.2.2.4.1 Dual-PAM

Aktivita PSI a PSII bola meraná pomocou prístroja Dual-PAM-100 (Walz, Nemecko), ktorý umožňuje simultánne meranie pomalého fluorescenčného indukčného javu a zmien absorpcie P700. Pre meranie sa využíval nasledujúci protokol: meracie svetlo bolo 24 μE ($\mu\text{E} = \mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$), aktinické svetlo – 800 μE a saturačné pulzy – 10000 μE po dobu 300 ms; aktinické svetlo bolo zapnuté v prvej polovici merania (po 900 s) a tma bola v druhej polovici merania (od 900 s po 1800 s) a saturačné pulzy sa aplikovali 10 s, 30 s a 60 s po zapnutí aktinického svetla a následne v 60s intervaloch až do ukončenia merania (1800 s). V prípade, že rastliny boli odoberané zo svetelnej fázy, boli pred meraním adaptované 30 min na tmu.

Na testovanie sa využíval odstrihnutý list, ktorý bol umiestnený medzi meracie hlavice prístroja a stopka listu zostala ponorená v stojane s vodou počas celého merania.

3.2.2.4.2 PEA meter (Plant Efficiency Analyzer)

Maximálny kvantový výťažok fotochémie PSII (F_v/F_m) počas 24 h bol meraný pomocou prístroja PEA meter (Hansatech, Veľká Británia) a na základe protokolu v Tab. 7). Na meranie sa využívalo svetlo o intenzite 4000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ po dobu 5 s.

U testovaných rastlín sa odstrihol list, ktorý bol vložený do klipu a klip sa upevnil do meracej hlavice prístroja. Ak boli rastliny odobraté v priebehu svetelnej fázy dňa (viz. Tab. 7), tak sa ponechali v tme 30 min pred meraním.

3.2.2.5 Štatistické vyhodnotenie

Štatistické vyhodnotenie vhodných vzoriek sa vykonávalo pomocou t-testu v programe Microsoft Excel a signifikantný rozdiel sa stanovoval ako $p < 0,05$.

Tab. 7 Prehľad meraní Fv/Fm v priebehu 24 h – zobrazuje čas odobratia rastlín na testovanie s bližšou charakterizáciou svetelných podmienok a počtu hodín vo svetelných podmienkach v momente odobratia vzorky a prípadná adaptácia na tmu pred začatím merania.

Hodina merania	Svetelné podmienky dňa	Počet hodín v daných podmienkach	Adaptácia na tmu pred meraním (min)
10:00	svetlo	4	30
14:00		8	30
15:00	tma	1	0
16:00		2	0
17:00		3	0
18:00		4	0
6:00		16	0
7:00	svetlo	1	30

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Podnetom prípravy knockout mutanta *A. thaliana* v génoch *Lhcb3*, *Lhcb6* a *PsbS* boli nedávno potvrdené informácie o absencii svetlozberných antén *Lhcb3* a *Lhcb6* u *P. abies* (Kouřil *et al.*, 2016), čo viedlo k vytvoreniu dvojitého mutanta *Arabidopsis ko3+6* ako hrubej analógie *P. abies*. Pretože *P. abies* rastie typicky na slnečnom stanovisku – vysvitla otázka či neprítomnosť proteínov *Lhcb3* a *Lhcb6* má nejaký vplyv na spôsob hospodárenia s nadbytočným slnečným žiarením.

Rastliny sú vybavené sofistikovanými mechanizmami, ktoré im umožňujú prežiť v prostredí s dynamicky sa meniacimi svetelnými podmienkami. Jedným z kľúčových procesov je NPQ, ktoré zaisťuje bezpečnú disipáciu nadbytočnej svetelnej energie, ktorá by inak mohla viesť k poškodeniu fotosyntetického aparátu (viz. 2.4.2). Bolo zistené, že NPQ je silno závislé na prítomnosti proteínu *PsbS* i keď presný mechanizmus funkcie tohto proteínu v indukcii a regulácii NPQ je stále predmetom debát (Ruban, 2016). Z výsledkov niektorých štúdií vyplýva, že práve proteín *Lhcb6* by mohol byť dôležitým interakčným partnerom proteínu *PsbS* (Kovács *et al.*, 2006). Na druhú stranu je známe, že *P. abies* je schopný indukovať NPQ i bez prítomnosti proteínu *Lhcb6* (Štroch *et al.*, 2008; Štroch, nepublikované výsledky).

Cieľom tejto práce bolo zistiť, akým spôsobom ovplyvňuje absencia proteínu *PsbS* NPQ u mutantov *A. thaliana* bez proteínov *Lhcb3* a *Lhcb6*. Práca zahŕňala vytvorenie trojitého mutanta *Arabidopsis koLhcb3koLhcb6koPsbS (ko3+6+S)* a jeho následnú fyziologickú charakterizáciu predovšetkým z pohľadu nefotochemického zhášania a funkcie fotosyntetického aparátu.

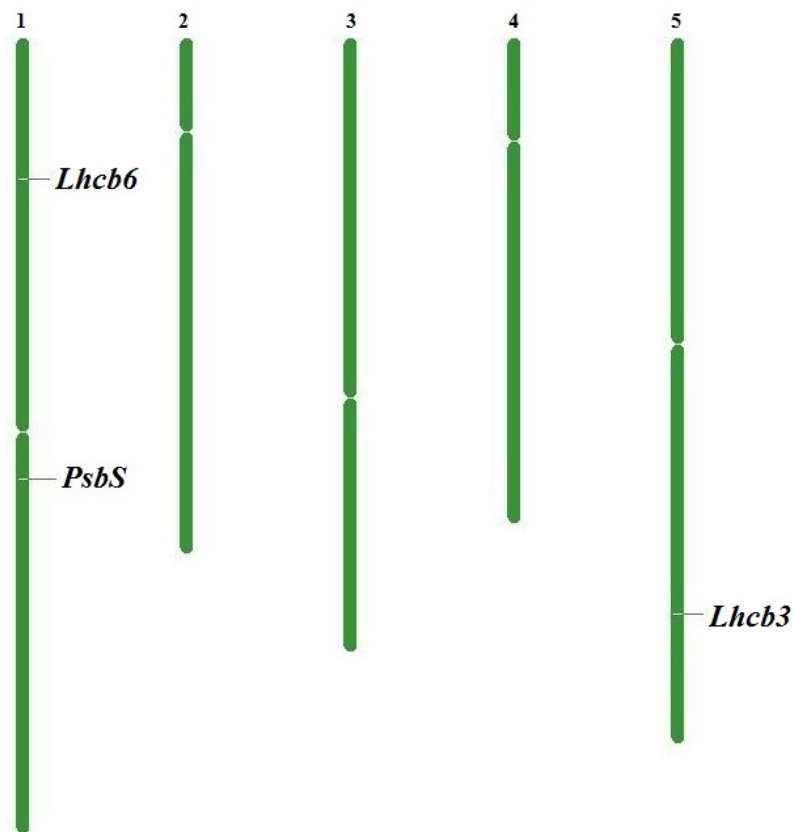
4.1 Kríženie rastlín

Na prípravu trojitého mutanta *ko3+6+S* sme zvolili metódu postupného kríženia mutantných inzerčných línií *koPsbS* a *ko3+6* (viz. Obr. 7). Dvojitého mutant *ko3+6* bol pripravený v priebehu iného projektu skrížením rastlín *koLhcb3* a *koLhcb6* (Ilíková, nepublikované). Všetky tri línie majú inzerciu v kódujúcej oblasti génu a absencie proteínov v týchto jednotlivých líniách boli overené biochemicky – u *koLhcb3* v štúdiu Adamiec *et al.* (2015), u *koLhcb6* v publikácii Kovács *et al.* (2006) a u *koPsbS* v štúdiu Dong *et al.* (2015).

P: *ko3+6* x *koPsbS*
 F1: *ko3+6+S(HZ)* x *ko3+6*
 F2: *ko3+6(HM)+S(HZ)* x *ko3+6(HM)+S(HZ)*
 F3: *ko3+6+S*

Obr. 7 Ilustratívny postup pri krížení.

Dôvodom voľby postupného kríženia je rozmiestnenie génov na chromozómoch. Gén *Lhcb3* sa nachádza samostatne na piatom chromozóme, ale gény *Lhcb6* a *PsbS* sú lokalizované spoločne na prvom chromozóme (viz. Obr. 8). U génov *Lhcb6* a *PsbS* dochádza ku vzniku génovej väzby, vďaka čomu sa prestáva uplatňovať jednoduchosť kríženia podľa Mendelových zákonov (viz. 2.2.2.3). Toto rozmiestnenie génov pomerne komplikuje jednoduchosť kríženia, ale pretože vzdialenosť medzi génmi je dostatočne veľká (nachádzajú sa na rozdielnych chromatídach) je možné uskutočniť úspešné kríženie, pri ktorom prebehne crossing-over medzi génmi.



Obr. 8 Rozloženie sledovaných génov (*Lhcb3*, *Lhcb6* a *PsbS*) na chromozómoch *Arabidopsis thaliana* – chromozómová mapa pripravená pomocou Arabidopsis Home Page (<https://www.arabidopsis.org/>).

Ak by sa sledované gény nenachádzali vo väzbe bolo by teoreticky možné izolovať mutanta s tromi HM mutáciami už v F2 generácii a to s pravdepodobnosťou 1 : 63 (výpočet pomeru pomocou Punnettovho štvorca (SciencePrimer Home Page, <https://scienceprimer.com/punnett-square-calculator>). Pomer 1 : 63 je veľmi nízky na úspešnú izoláciu a keďže sa ešte u týchto génov nachádza spomínaná väzba génov, ich pravdepodobnosť selekcie by bola výrazne nižšia, a tak sa pristúpilo k metóde postupného kríženia (viz. Obr. 7).

Ako parentálnu (P) generáciu sme použili homozygotných mutantov *ko3+6* a *koPsbS*, ktorých sme navzájom skrížili za účelom prípravy F1 generácie, ktorá obsahovala rastliny so všetkými tromi mutáciami v HZ stave. Rastliny z F1 generácie boli skrížené s HM mutantom *ko3+6*, za účelom prípravy F2 generácie. Medzi rastlinami z F2 generácie sme selektovali mutanta, ktorý bol HM v mutáciách génov *Lhcb3* a *Lhcb6* a HZ v mutácii génu *PsbS* (*ko3+6(HM)+S(HZ)*). V prípade, že by gény neboli vo väzbe, podľa Mendelových zákonov bola frekvencia takéhoto mutantu 1 : 7. V našom prípade sa sme mutantu *ko3+6(HM)+S(HZ)* vyseletovali s približnou pravdepodobnosťou 1 : 40. Vyselektovaný mutant z F2 generácie sa ponechal samoopeliť a v F3 generácii sa homozygotný mutant *ko3+6+S* hľadal s pomerom 1 : 3.

Takto zvolenou stratégiou sa nám podarilo znížiť počet rastlín potrebných na genotypizáciu, čo nám ušetrilo čas v priebehu genotypizácie v laboratóriu. Na druhej strane celkový proces prípravy finálneho mutantu sa predĺžil o jednu generáciu potomkov. Rastliny z F4 generácie, ktoré vznikli samoopelením mutantu identifikovaného v F3 generácii sa použili na fyziologickú charakterizáciu zameranú na nefotochemické zhášanie.

4.2 Genotypizácia

Charakterizácia rastlín v jednotlivých generáciách prebiehala PCR metódou. Získané PCR produkty sa vizualizovali po agarózovej elektroforéze zafarbením v EtBr. Na základe amplifikovaných produktov PCR reakcie sa vyhodnocovali alelové zloženia génov u daných rastlín (WT, HZ, HM).

Využívali sme génovo špecifické primery LP a RP (viz. 3.2.1.3.3) navrhnuté na jednotlivé gény tak, aby T-DNA inzercia bola v oblasti medzi nimi a ako špecifický primer na vloženie T-DNA bol použitý univerzálny primer LBB1. Veľkosť jednotlivých ampliconov bola odhadnutá podľa pozície jednotlivých primerov na DNA (viz.

3.2.1.3.3) a na základe miesta vloženia T-DNA v jednotlivých inzerčných líniách (Arabidopsis Home Page, <https://www.arabidopsis.org/>). Vzdialenosť priemerov LBb1 od ľavej hranice (LB – left border) vloženého inzertu je v SALK líniách priemerne 110 bp (údaje z SIGnAL Salk Institute Genomic Analysis Laboratory Home Page, <http://signal.salk.edu/>).

Princípom genotypovania bolo využitie kombinácie šiestich typov primerov. Primere sa amplifikujú špecificky – WT primere exprimujú gén, iba ak sa v oblasti génu nenachádza inzerčná T-DNA, tým pádom nevzniká MUT amplikon, pretože LBb1 nemá miesto, kde by sa mohol naviazať.

Na druhej strane u HM mutantu v sledovanom géne nevzniká produkt WT primeru, pretože inzerčná T-DNA bráni k úspešnému dokončeniu replikácie, takže vznikajú iba produkty MUT primerov.

Nakoniec u HZ mutantov dochádza ku vzniku amplikonov u WT aj MUT primerov, pretože jedno vlákno DNA neobsahuje inzerčnú T-DNA, a tým pádom prebehne úspešná replikácia s WT primerom. A druhé vlákno HZ mutantu obsahuje inzerčnú T-DNA, vďaka čomu je vhodné pre nasadenie MUT primeru, dokončeniu replikácie a vytvoreniu druhého amplikonu. Pre lepšie pochopenie a vyobrazenie genotypovania rastlín bola vytvorená tabuľka č. 8, ktorá obsahuje amplikony primerov použitých pri testovaní rôznych genotypov rastlín.

Na obrázku 9 sú typické príklady amplikonov získaných pre rôzne typy mutantných rastlín. Ako je tam možné vidieť, u vzorky odobratej z WT rastliny dochádzalo k amplifikácii iba predpokladaných produktov, čo nám potvrdilo špecificitu použitých primerov. Taktiež boli testované aj rastliny, ktoré sa používali na kríženie, tj. HM *ko3+6* a *koPsbS* (viz. Obr. 9). Na ilustráciu sú na obrázku 9 uvedené výsledky amplifikácie i u homozygotných mutantov *koLhcb3* a *koLhcb6*, ktoré boli použité na prípravu *ko3+6*.

V niektorých prípadoch pri PCR amplifikácii s primerom LBb1 dochádzalo ku vzniku artefaktov. Najčastejšie išlo o produkty o veľkosti zhruba 450 bp, ktoré boli pozorované i inými vedeckými skupinami a o tomto produkte je diskutované aj na webových stránkach laboratória SALK Institute Genomic Analysis Laboratory Home Page (http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html). V niekoľkých ďalších prípadoch sme pozorovali i iné artefakty (napr. u rastliny *koPsbS* u MUT_3 a MUT_6 primerov,

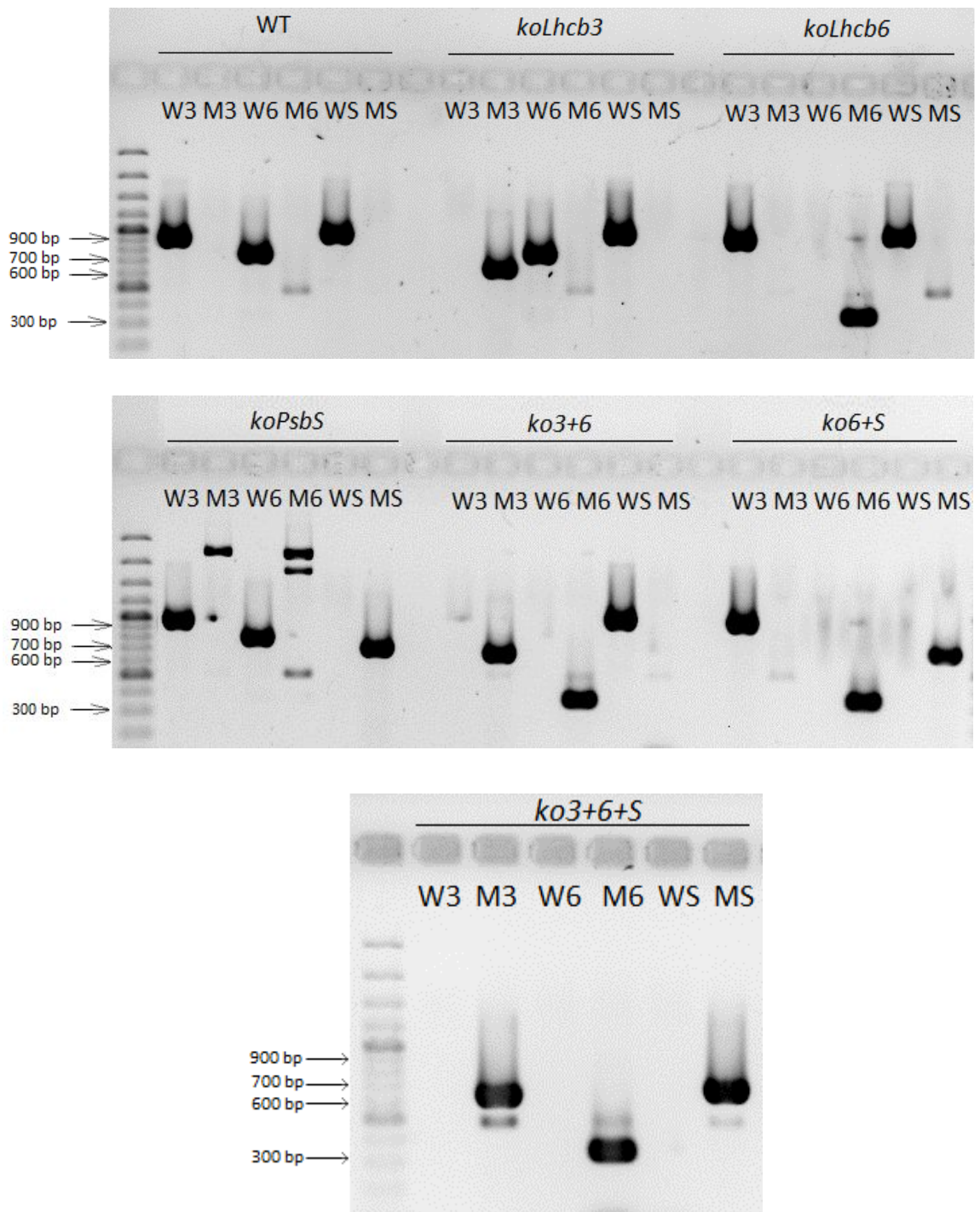
Tab. 8 Ilustratívne zobrazenie ampliconov primerov použitých pri genotypovaní pomocou špecifických primerov na sledované gény aj s očakávanou veľkosťou vzniknutého ampliconu u testovaných mutantov; WT – kontrola; *ko3+6* a *koPsbS* – P generácia; *ko3+6+S(HZ)* – HZ vo všetkých génoch, F1 generácia; *ko3+6+S* – HM vo všetkých génoch, F3 generácia; + – vznik ampliconu, – – nevzniká amplicon.

Označenie ampliconu	Predpokladaná veľkosť ampliconu (bp)	WT	<i>ko3+6</i>	<i>koPsbS</i>	<i>ko3+6+S(HZ)</i>	<i>ko3+6+S</i>
WT_3	920	+	–	+	+	–
MUT_3	600	–	+	–	+	+
WT_6	730	+	–	+	+	–
MUT_6	300	–	+	–	+	+
WT_S	950	+	+	–	+	–
MUT_S	600	–	–	+	+	+

ko3+6 u WT_3 primeru), ktoré mohli byť spôsobené používaním čerstvého listu ako vzorky určenej na genotypizáciu, nakoľko pri testovaní sa osobitne neizolovala DNA.

Ako už bolo vyššie spomínané, vyselektovanie trojitého mutantu *ko3+6+S* predstavovalo časovo náročný proces, približne 9 mesiacov, keďže ontogenéza *Arabidopsis* trvá 8 – 10 týždňov v závislosti na podmienkach. Jednotlivé generácie sa postupne genotypovali na overenie alebo vyhľadanie požadovaného mutantu. V F1 generácii sme genotypovali najmenej rastlín (10), nakoľko išlo iba o overenie úspešného skríženia P generácie. F2 generácia predstavovala pre nás najnáročnejšiu genotypizáciu, pretože sme genotypovali 75 rastlín a z toho sme vyselektovali len 2 požadovaných mutantov. V našom prípade bol pomer úspešnej selekcie približne 1 : 40, čo je omnoho menší, ako bol teoretický pomer 1 : 7 pre gény bez väzby. Posledná generácia F3 zameraná na selekciu mutantu (*ko3+6+S*) bola s úspešnosťou 8 mutantov zo 40 testovaných rastlín, čo predstavuje pomer 1 : 4, ktorý je približne v zhode aj s teoretickým pomerom 1 : 3 vypočítaným pomocou Punnettovho štvorca.

V priebehu genotypizácie vzoriek sa nám podarilo vyselektovať aj rastlinu HM knockout v génoch *lhcb6* a *PsbS* (*ko6+S*). Spomínaná rastlina nebola v cieľoch tejto práce, ale nakoľko dané gény ležia na rovnakom chromozóme (viz. Obr. 8), je náročné docieľiť vyselektovanie takejto rastliny, a preto sme sa rozhodli uviesť aj tento výsledok do práce (viz. Obr. 9).



Obr. 9 Genotypizácia mutantných rastlín *Arabidopsis thaliana* so zameraním na amplifikačné produkty primerov W3 – WT_3; M3 – MUT_3; W6 – WT_6; M6 – MUT_6; WS – WT_S; MS – MUT_S, čierna linka vyznačuje rozsah jamiek s primermi patriacimi ku testovanej vzorke.

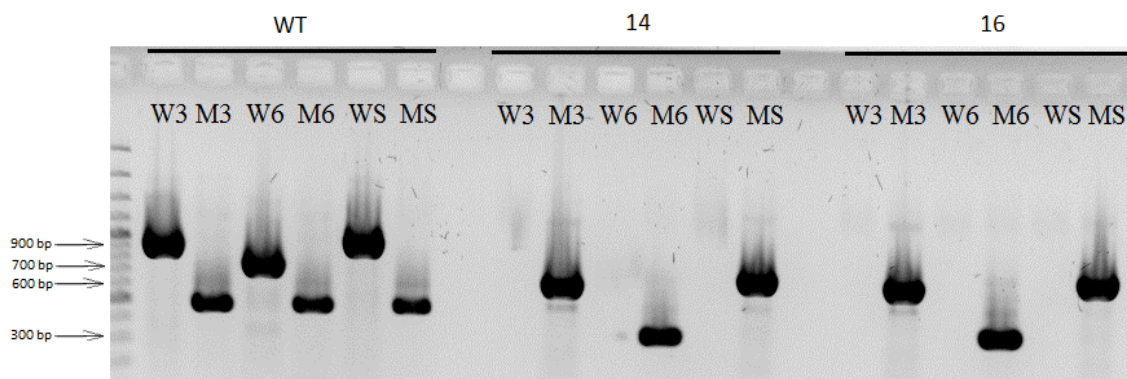
Pre overenie genotypu mutantov *ko3+6+S* vyselektovaných pomocou priamej PCR metódy, sa tieto rastliny použili aj k izolácii čistej DNA, ktorá bola znovu overená pomocou PCR. DNA bola z listov troch kandidátnych rastlín (č. 3, 14 a 16) a jednej WT rastliny izolovaná pomocou kitu NucleoSpin® Plant II a koncentrácia vyizolovanej DNA bola stanovená spektrofotometricky (viz. Tab. 9). Následne PCR metóda prebiehala identicky ako v prípade priamej metódy (viz 3.2.1.3.3). Testovaná vzorka pre PCR bola použitá vyizolovaná DNA – na jednu 20 µl reakčnú zmes bolo použitých 100 ng DNA a na obrázku 10 môžeme vidieť ako kontrolnú vzorku WT a 2 mutantov *ko3+6+S*.

Z neznámeho dôvodu sa v PCR reakcii u WT rastliny objavil pomerne intenzívny pás zodpovedajúci vyššie diskutovanému 450 bp artefaktu (viz Obr. 10). Tento artefakt je viditeľný i u ďalších dvoch vzoriek (*ko3+6+S*), viacmenej v týchto dvoch prípadoch je veľmi slabý.

PCR na izolovanej DNA teda potvrdila, že rastliny vyselektované pomocou priamej PCR sú HM mutanty vo všetkých troch znakoch a môžu byť ďalej použité na testovanie.

Tab. 9 Koncentrácia izolovanej DNA z rastlinných vzoriek aj potrebnými objemami pre 20 µl reakčnú zmes o DNA koncentrácii 10 ng·µl⁻¹.

Testovaná rastlina	Koncentrácia (ng·µl ⁻¹)	Použitý objem (µl) s koncentráciou 10 ng·µl ⁻¹
WT	45,0	2,2
3	51,7	1,9
14	31,8	3,1
16	36,0	2,8



Obr. 10 Genotypizácia rastlín *A. thaliana* za použitia izolovanej DNA; kontrolná rastlina je WT a vzorky č. 14 a 16 sú *ko3+6+S*. Použité primere sú W3 – WT_3; M3 – MUT_3; W6 – WT_6; M6 – MUT_6; WS – WT_S; MS – MUT_S.

4.3 Fyziologická charakterizácia rastlín

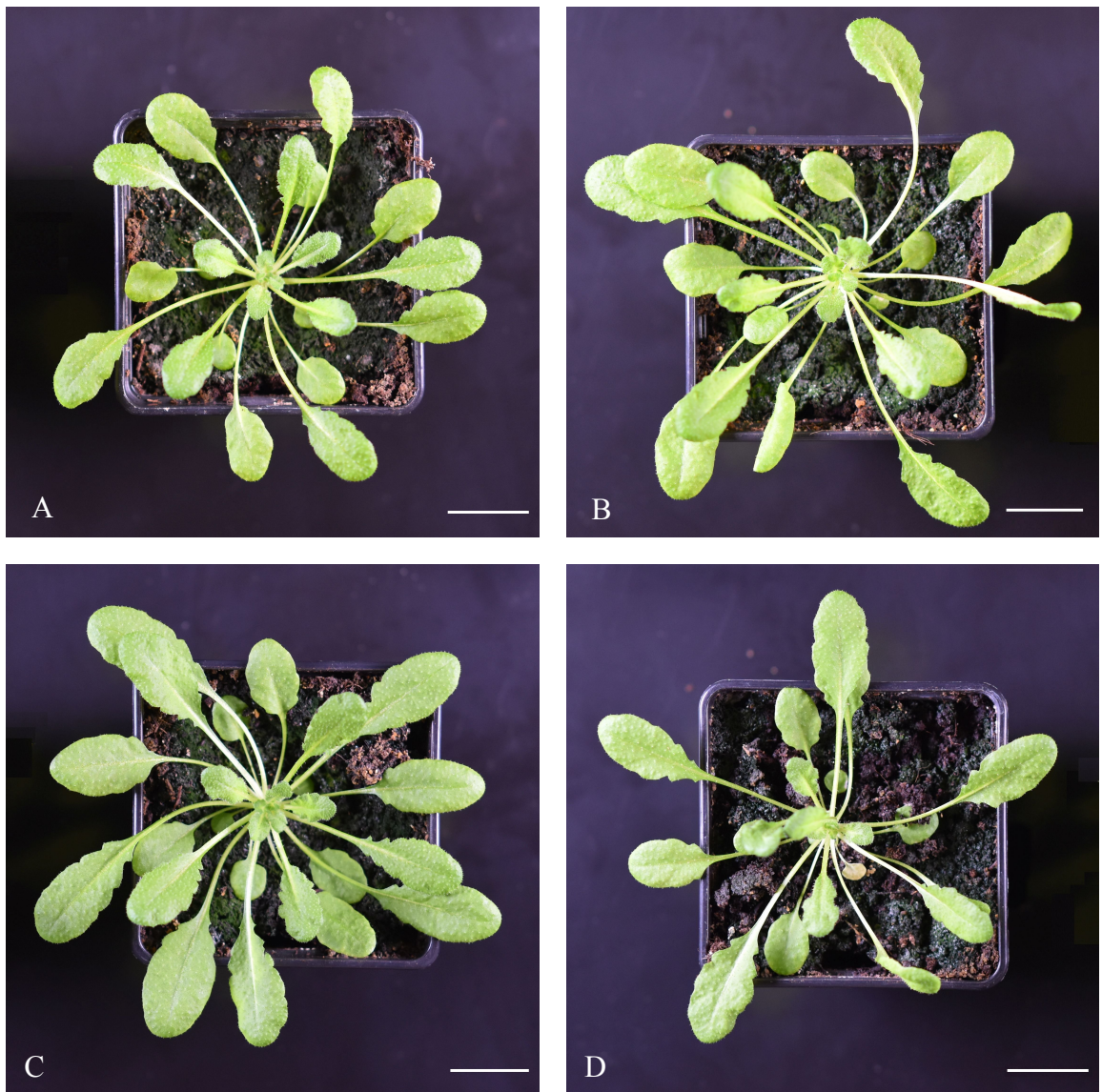
Fyziologická charakterizácia pripravených mutantov bola zameraná hlavne na charakterizáciu spôsobu hospodárenia so svetelnou energiou a vysvetlenie fenoménu klesania NPQ v priebehu dlhodobej adaptácie na tmu pozorovaného v pilotných štúdiách u *ko3+6*.

Testovanie a charakterizácia jednotlivých genotypov prebiehala na rastlinách v siedmom týždni ontogenézy, ktoré boli pestované na fotoperióde 8/16 h (detailnejšie informácie v metódach; viz. 3.2.1.1). Pre ilustráciu fyziologického stavu jednotlivých genotypov rastlín v období testovania sa vytvorila fotodokumentácia reprezentatívnych vzoriek (viz. Obr. 11). Ako je možné vidieť i na snímkach, sledované gény *Lhcb3*, *Lhcb6* a *PsbS* nemajú žiadne charakteristické fenotypové prejavy, ktoré by boli pozorovateľné voľným okom.

4.3.1 Stanovenie hmotnosti čerstvej biomasy nadzemnej časti rastliny

Parameter hmotnosť čerstvej biomasy nadzemnej časti rastlín nám napomáha pri určovaní vyhovujúceho prostredia pre vývoj rastliny. Čím kvalitnejšie prostredie, tým ľahšie rastliny zvyšujú svoju hmotnosť, pretože majú dostatočné množstvo energie, ktoré môžu pravidelne využívať na vyživovanie novovzniknutých pletív.

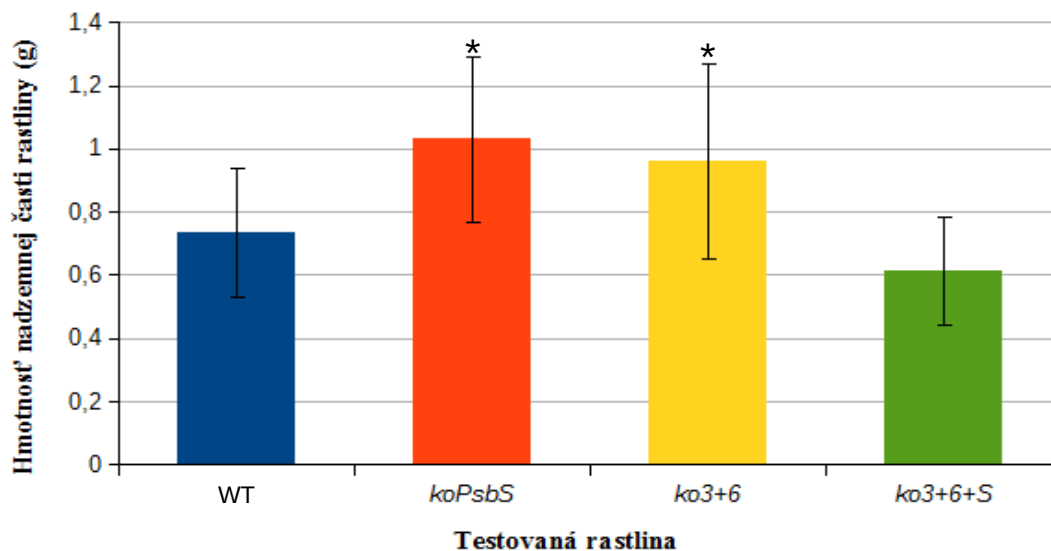
Z predchádzajúcich pilotných štúdií sa vychádzalo, že WT je v porovnaní s *ko3+6* signifikantne ľahší, keďže bol pozorovaný úbytok hmotnosti u rastlín s absenciou génu *Lhcb6* (*koLhcb6*) (de Bianchi *et al.*, 2008). Avšak v našom prípade hmotnosť *ko3+6* je signifikantne väčšia ako hmotnosť WT, čo nevieme vysvetliť. Jeden z možných dôvodov môže byť pomerne veľká heterogenita vypestovaných rastlín, čo viedlo



Obr. 11 Fotodokumentácia reprezentatívnych rastlín v siedmom týždni ontogenéze, ktoré boli využívané na fyziologickú charakterizáciu; A: WT; B: *koPsbS*; C: *ko3+6*; D: *ko3+6+S*. Snímky boli vyhotovené fotoaparátom Nikon D5600. Mierka je 2,5 cm.

k relatívne veľkej smerodajnej odchýlke (viz. Obr. 12). Napriek tomu, že testované rastliny boli pestované pri rovnakých podmienkach, boli už voľným okom viditeľné pomerne výrazné rozdiely vo veľkosti rastlín. Z tohto dôvodu by bolo vhodné v budúcnosti tieto experimenty zopakovať.

Ďalší rozdiel v hmotnostiach sa vyskytol u *koPsbS*, ktorý je signifikantne ťažší než WT. Takýto jav je v súlade s prácou Dall'Osto *et al.* (2005), kde sa tento výsledok bol popisovaný ako dôsledok častejšej deexcitácie chlorofylu u WT, spôsobenej prítomnosťou proteínu PsbS i za bežných pestovateľských podmienok. U *koPsbS*



Obr. 12 Hmotnosti nadzemnej časti rastliny v čerstvom stave. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, $n = 15$. Skupiny dát so signifikantným rozdielom voči WT podľa t-testu ($p < 0,05$) sú označené hviezdíčkou.

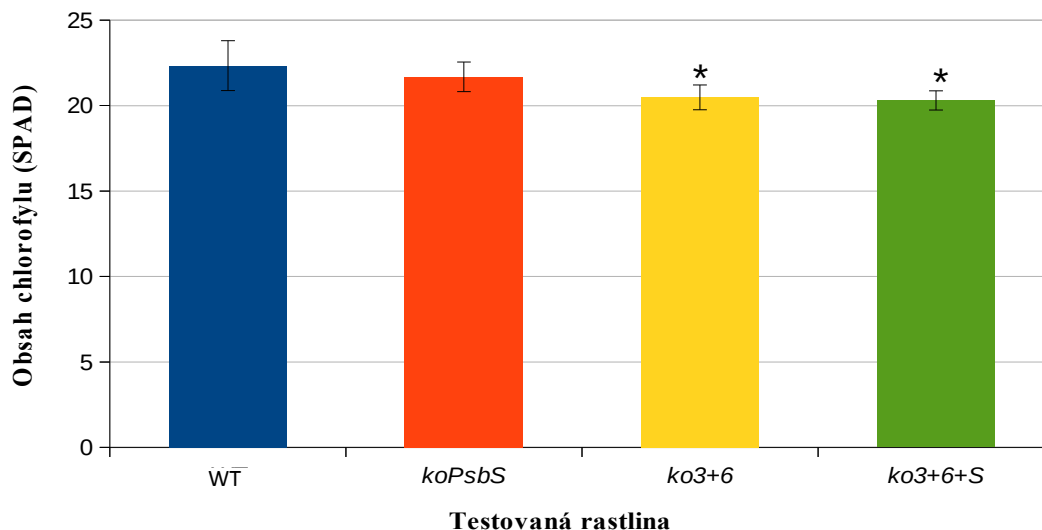
v dôsledku absencie PsbS, nedochádza ku „stratám“ absorbovanej energie vplyvom nefotochemického zhášania, čo môže byť za určitých podmienok výhodné (rast v stabilných svetelných podmienkach za optimálnej intenzity svetla), tým pádom viacej energie môže byť využitej na tvorbu biomasy.

4.3.2 Obsah chlorofylu

Obsah chlorofylu v listoch rastlín ako jeden z parametrov rastlinnej fyziológie nám vie napovedať o fyziologickom stave rastlín. Za stresových podmienok alebo v prípadne podmienok, ktoré nie sú pre rastlinu úplne optimálne, obvykle dochádza k poklesu obsahu chlorofylu v listoch.

Množstvo chlorofylu v rastlinách sa meralo nedeštruktívnou metódou pomocou chlorofylmetra (SPAD-502DL), ktorý vyhodnocuje obsah chlorofylu na základe priepustnosti listu – list je ožiarený dvoma LED osvetľujúcimi systémami, ktoré emitujú žiarenie o vlnových dĺžkach 650 nm (veľká absorbanca chlorofylu) a 940 nm (minimálna absorbanca).

Dôvodom uprednostnenia tejto nedeštruktívnej metódy pred spektrofotometrickou bolo hlavne využitie rastlín na nadväzujúce testovania. Taktiež aj ďalším dôvodom bola minimalizácia chyby spôsobenej ľudským faktorom, ktorá sa vyskytuje



Obr. 13 Obsah chlorofylu v listoch rastlín testovaných chlorofylmetrom. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, $n = 15$. Skupiny dát so signifikantným rozdielom voči WT podľa t-testu $p < 0,05$ sú označené hviezdičkou.

u spektrofotometrického stanovenia chlorofylu, v dôsledku práce s rýchlo sa odparujúcim acetónom.

Výsledný priemerný obsah chlorofylu u WT a *koPsbS* je v porovnateľných hodnotách, tak ako sa predpokladali. Opačný prípad je u *ko3+6* a *ko3+6+S*, kde sa objavil obsah chlorofylu zhruba o 10 % nižší než v porovnaní s WT. Nižší obsah chlorofylu môže byť spôsobený absenciou proteínov Lhcb3 a Lhcb6, ktoré vo svetlozberných anténach naväzujú molekuly chlorofylu (viz. Obr. 13).

Do budúca by bolo vhodné analyzovať tieto genotypy vypestované pri vysokej intenzite svetla, ktorá by mala stimulovať degradáciu chlorofylu v dôsledku fotooxidačného stresu. Veľký efekt je možné očakávať u rastlín bez PsbS, ktoré majú problémy pri vysporiadaní sa so svetelnou energiou pri vysokej intenzite svetla (Ware *et al.*, 2015). Otázkou je, či by súčasný stav absencie Lhcb3, Lhcb6 a PsbS mohol byť pre rastlinu menej zaťažujúci než samotná absencia PsbS, pretože práve redukcia množstva proteínov Lhcb3 a Lhcb6 je typickou odozvou rastlín na vysokú intenzitu svetla (Ballottari *et al.*, 2007).

4.3.3 Maximálny kvantový výt'azok fotochémie fotosystému II

Ako už bolo spomínané, parameter F_v/F_m sa v rastlinnej fyziológii využíva ako parameter bežne detekujúci stres rastlín. Za fyziologické hodnoty sú považované

hodnoty okolo 0,8, ktoré rastlina nadobúda za optimálnych vonkajších podmienok. Hodnoty nižšie ako 0,8 už signalizujú, že rastlina je vystavená určitej forme stresu .

Parameter Fv/Fm bol testovaný u rastlín odobratých v priebehu svetelnej fázy (LA) a temnostnej fázy (DA) denného cyklu, aby sa preskúmal fenomén pozorovaný v priebehu pilotného projektu – vznikajúci pokles Fv/Fm u *ko3+6* počas dlhodobej temnostnej adaptácie.

Zo získaných výsledkov vieme stanoviť, že parameter Fv/Fm u WT a *koPsbS* je vyšší než 0,8 a prakticky nezávislý na svetelných podmienkach – rastliny merané v priebehu oboch častí denného cyklu majú hodnoty Fv/Fm prakticky totožné (viz. Obr. 14). U *ko3+6* a *ko3+6+S* sme zaznamenali signifikantne nižší Fv/Fm než u WT (viz. Obr. 14), čo je v súlade s predchádzajúcimi štúdiami, v nich bol pokles Fv/Fm zaznamenaný u *koLhcb6* (Kovács *et al.*, 2006). Pokles Fv/Fm bol ešte výraznejší u rastlín analyzovaných na konci nočnej fázy (tj. dlhodobej adaptácie na tmu). Tento fakt potvrdil predbežné výsledky z pilotných meraní na mutantných rastlinách *ko3+6*, u ktorých bol pozorovaný pokles Fv/Fm v priebehu temnostnej adaptácie.

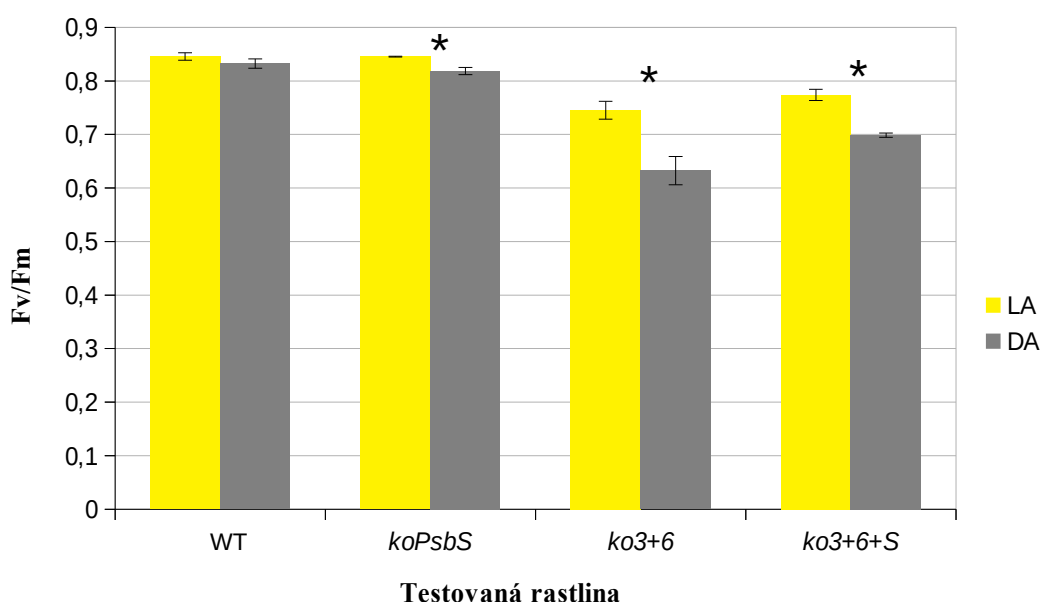
Na objasnenie časového priebehu tohto fenoménu sa vytvoril 24 h protokol, ktorý mal zhodnotiť priebeh klesania Fv/Fm v tme a hlavne časový interval potrebný na stabilizáciu Fv/Fm. Pre toto meranie bol využitý iný prístroj ako na merania prezentované na obrázkoch č. 14, 16 a 17, čo viedlo k mierne odlišným absolútnym hodnotám parametru Fv/Fm.

Prvé meranie parametru Fv/Fm prebehlo po 4 hodinách od začiatku svetelnej fázy s rastlinami adaptovanými 30 min na tmu. Vo výsledkoch tohto testovania môžeme pozorovať u WT aj *koPsbS* stabilný charakter Fv/Fm po prechode do temnostnej fázy, ale aj po opätovnom návrate do svetelnej fázy (viz. Obr. 15).

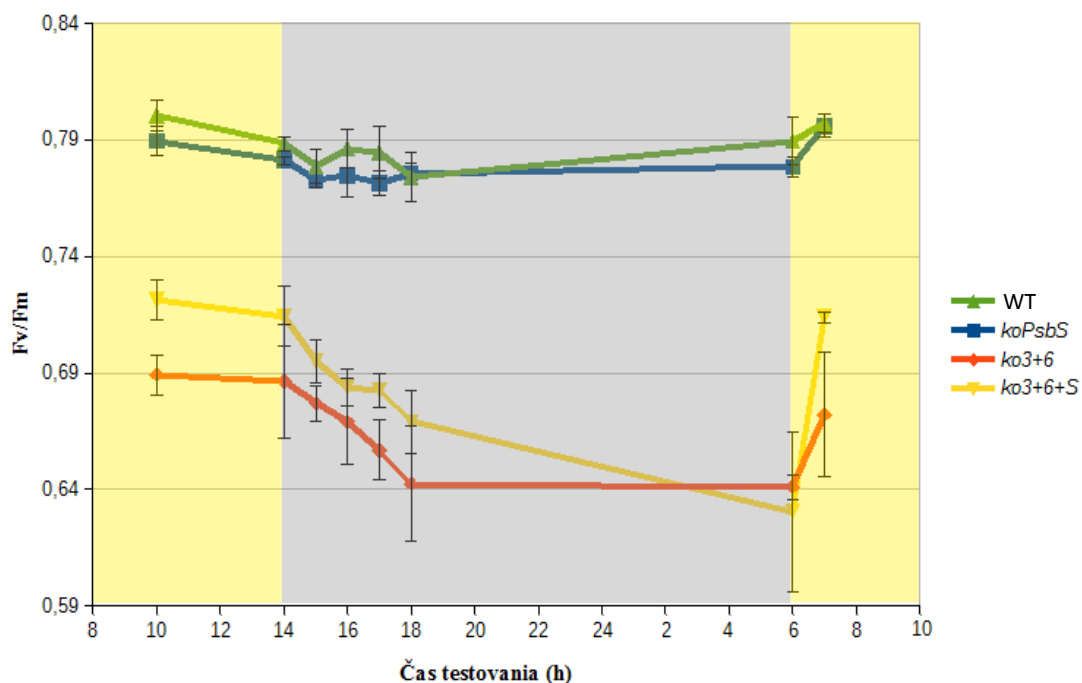
Radikálnejšie rozdiely sú u *ko3+6* a *ko3+6+S*, u ktorých je vidieť postupné klesanie Fv/Fm s rastúcou dobou adaptácie na tmu. Naše výsledky ukazujú, že tento pokles sa zastavil približne po 4 hodinách temnostnej adaptácie a následne sa parameter Fv/Fm vrátil približne na pôvodné hodnoty po zhruba 30 min aklimácii na svetlo. Trend i veľkosť poklesu Fv/Fm sú približne rovnaké u *ko3+6* a *ko3+6+S*, čo naznačuje, že proteín PsbS tento pokles výrazne neovplyvňuje.

Dôvodov vysvetľujúcich zníženie parametru Fv/Fm v priebehu DA môže byť viacero. Podrobnejšia analýza ukazuje, že zatiaľ čo hodnota maximálnej fluorescencie

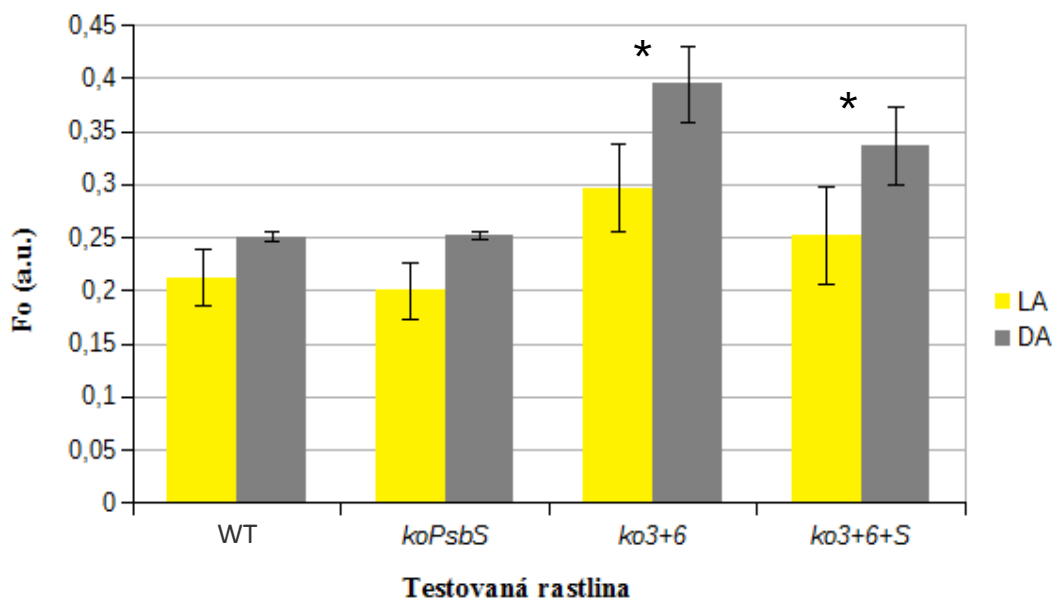
F_m sa u LA a DA rastlín výrazne nemení (viz. Obr. 17), minimálna fluorescencia F_o sa pri dlhodobej adaptácii na tmu u genotypov *ko3+6* a *ko3+6+S* zvyšuje (viz. Obr. 16). Medzi možné príčiny nárastu F_o patrí odpojenie svetlozberných antén od RC, čiže antény prijímajú svetelnú energiu, ale nedokážu ju odovzdať do RC, tým pádom nefungujú ako kolektor pre RC. Takto odpojené antény pasívne svietia a dochádza ku vzniku zvýšenej fluorescencie (Ruban, 2012), čo spôsobuje výrazný nárast F_o u mutantov *ko3+6* a *ko3+6+S* (viz. Obr. 16), zatiaľ čo F_m zostáva prakticky nezmenené, ako je potvrdené i v našich výsledkoch (viz. Obr. 17).



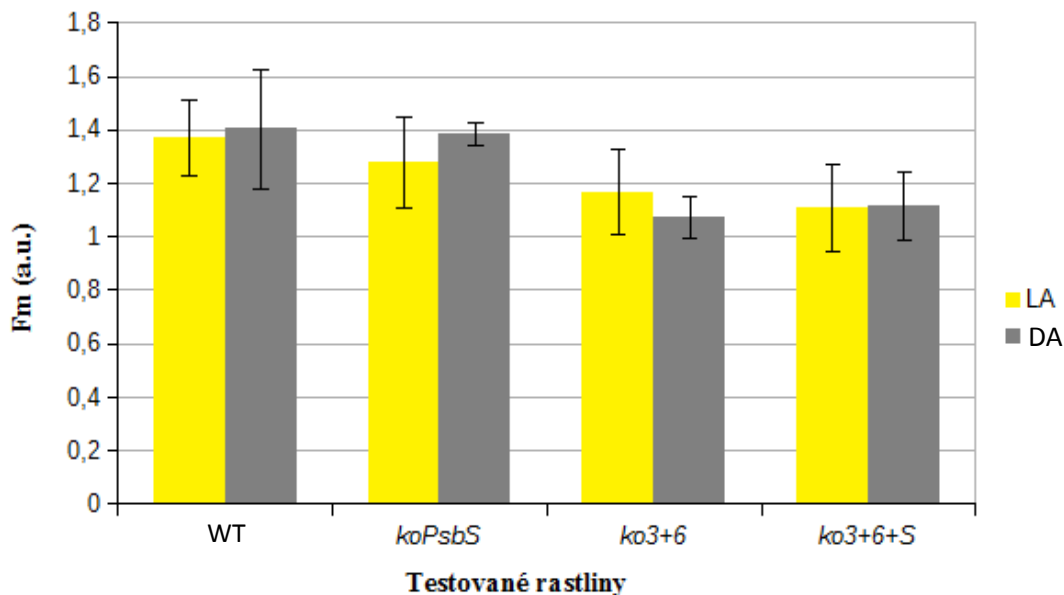
Obr. 14 Maximálny kvantový výťažok fotochémiie PSII (F_v/F_m) s porovnaním zmien nastávajúcich počas LA a DA denného cyklu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SD, n = 4. Skupiny dát so signifikantným rozdielom, medzi DA a LA v rámci genotypu, podľa t-testu (p < 0,05) sú označené hviezdíčkou.



Obr. 15 Vývoj maximálneho kvantového výťažku fotochémiie PSII (F_v/F_m) v priebehu 24 h. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, $n = 4 - 6$; svetelná fáza je naznačená žltou farbou, šedá reprezentuje temnostnú fázu.



Obr. 16 Minimálna fluorescencia (F_o) s porovnaním zmien nastávajúcich u jednotlivých genotypoch rastlín počas LA a DA denného cyklu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, $n = 4$. Skupiny dát so signifikantným rozdielom, medzi LA a DA v rámci genotypu, podľa t-testu ($p < 0,05$) sú označené hviezdíčkou.



Obr. 17 Maximálna fluorescencia PSII (Fm) s porovnaním zmien nastávajúcich v genotypoch testovaných rastlín počas LA a DA denného cyklu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, $n = 4$.

4.3.4 Nefotochemické zhášanie

NPQ je jeden zo spôsobov ochrany rastlín pred nadbytočným slnečným žiarením, ktoré nie sú schopné efektívne využiť vo fotosyntéze. Ak u rastlín funguje qE zložka NPQ, jej nástup sa uskutoční rýchlym znížením maximálnej fluorescencie (v sekundách až minútách) po nastolení podmienok so zvýšenou intenzitou svetla. V našom prípade sme upriamovali pozornosť predovšetkým na NPQ u mutantov bez proteínu PsbS, v porovnaní s rastlinami obsahujúcim PsbS proteín, na ktorom je qE priamo závislé a hlavne na odlišnosti nastávajúce počas LA a DA. A druhú dôležitú rolu pre nás zohrávali rastliny bez proteínu Lhcb6, pretože podľa Kovács *et al.* (2006) by minoritná anténa Lhcb6 mala priamo interagovať s proteínom PsbS.

U WT rastlín sme pozorovali NPQ krivku s typickým priebehom (viz. Obr. 18 a Obr. 20), danú predovšetkým aktiváciou qE zhášania, ktoré veľmi rýchlo relaxuje po vypnutí svetla. U mutantov *koPsbS* je NPQ výrazne znížené, aktivácia zhášania je veľmi pomalá a taktiež dochádza k veľmi pomalej relaxácii zhášania po vypnutí svetla (viz. Obr. 18 a Obr. 20). Tento typ chovania je v súlade s predchádzajúcimi štúdiami (Li *et al.*, 2000; Dall’Osto *et al.*, 2005).

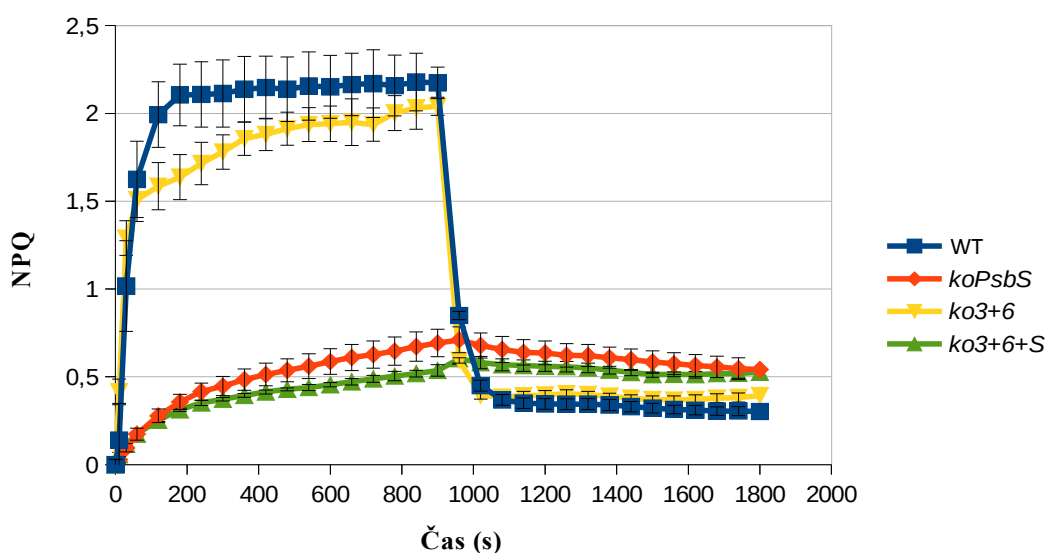
U mutantov *ko3+6* je vidieť, že aktivácia NPQ prebieha vo dvoch fázach (viz. Obr. 18 a Obr. 20). Toto chovanie je pozorované predovšetkým u rastlín po dlhodobej adaptácii na tmu (po 16 – 20 hodinách) (viz. Obr. 20). Tento dvojfázový nárast NPQ bol už pozorovaný na mutantoch *Arabidopsis* bez všetkých troch minoritných antén (Lhcb4, Lhcb5 a Lhcb6) (NoM mutanty) (Dall’Osto *et al.*, 2017). U tohto mutantu, ale nebola potrebná dlhodobá temnostná adaptácia. Podľa hypotézy prezentovanej Townsend *et al.* (2018) je prvá rýchla fáza nárastu NPQ u NoM závislá na prítomnosti protónovaného PsbS, zatiaľ čo druhá pomalšia fáza nárastu pravdepodobne súvisí s tvorbou protónového gradientu a aktiváciou tzv. xantofylového cyklu. V porovnaní s WT u NoM dochádza ku tvorbe gradientu pomalšie v dôsledku pomalšieho elektrónového transportu, tj. dochádza ku spomaleniu tvorby zeaxantínu. Podobný efekt teda predpokladáme i u *ko3+6* po dlhej adaptácii na tmu.

Počiatkový nárast NPQ u *ko3+6* je skutočne závislý na prítomnosti PsbS, pretože u *ko3+6+S* sa tento strmý nárast nevyskytuje (viz. Obr. 19 a Obr. 21). Je teda zrejme, že i u mutantov bez Lhc6 hrá PsbS dôležitú úlohu v indukcii NPQ. Zo získaných výsledkov môžeme povedať, že hypotéza, ktorá bola položená v článku Kovács *et al.* (2006) ohľadom priamej závislosti qE na prítomnosti Lhcb6 proteínu, nie je v korelácii s našimi získanými výsledkami. Zároveň naše výsledky ukazujú, že nefotochemické zhášanie u smreka a jeho príbuzných rastlín, ktorým chýbajú proteíny Lhcb3 a Lhcb6, pravdepodobne je taktiež výrazne závislé na PsbS rovnako, ako je NPQ u iných vyšších rastlín.

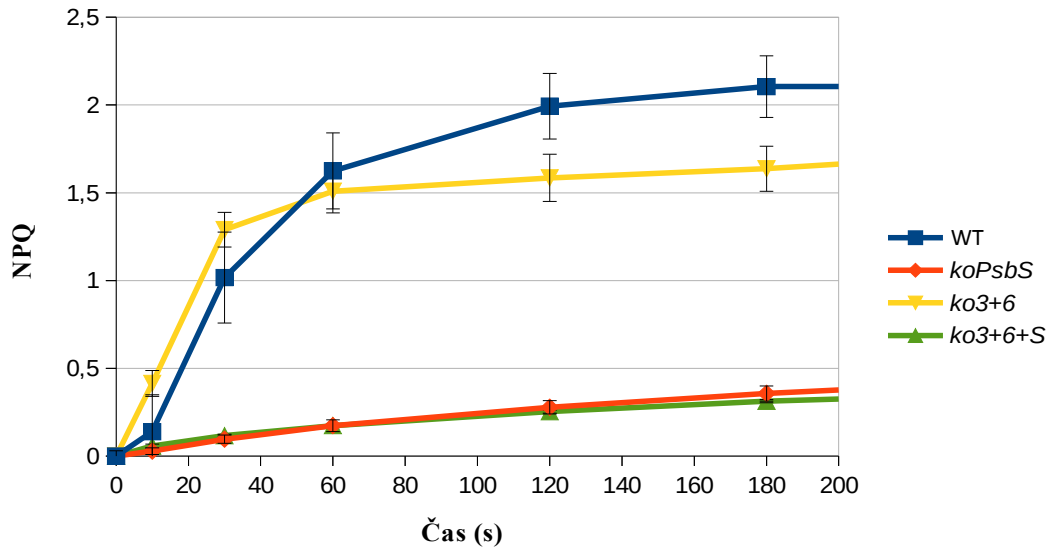
Z porovnaní kriviek NPQ u mutantov bez PsbS vyplýva, že aktivácia u *ko3+6+S* je pomalšia než u mutantov *koPsbS*. Pokiaľ prijmeme vyššie zmienenú hypotézu Townsend *et al.* (2018), že táto fáza nárastu NPQ súvisí s aktiváciou xantofylového cyklu prostredníctvom tvorby protónového gradientu, je možné pomalšiu aktiváciu zhášania u *ko3+6+S* pravdepodobne pripísať spomalenému elektrónovému transportu, tj. spomaleniu tvorby protónového gradientu. Tento jav je opäť výraznejší u rastlín po dlhodobej adaptácii na tmu a dá sa teda vysloviť hypotéza, že pri dlhodobej adaptácii na tmu dochádza u *ko3+6* ku zníženiu rýchlosti elektrónového transportu.

Zaujímavým javom je taktiež skorší nárast NPQ u *ko3+6* v porovnaní s WT, ktorý bol pozorovaný (u LA aj DA rastlín). Tento efekt by mohol byť vysvetlený „lepšou pripravenosťou“ PSII pre indukciu zhášania vďaka „slabšej väzbe“ majoritných LHC

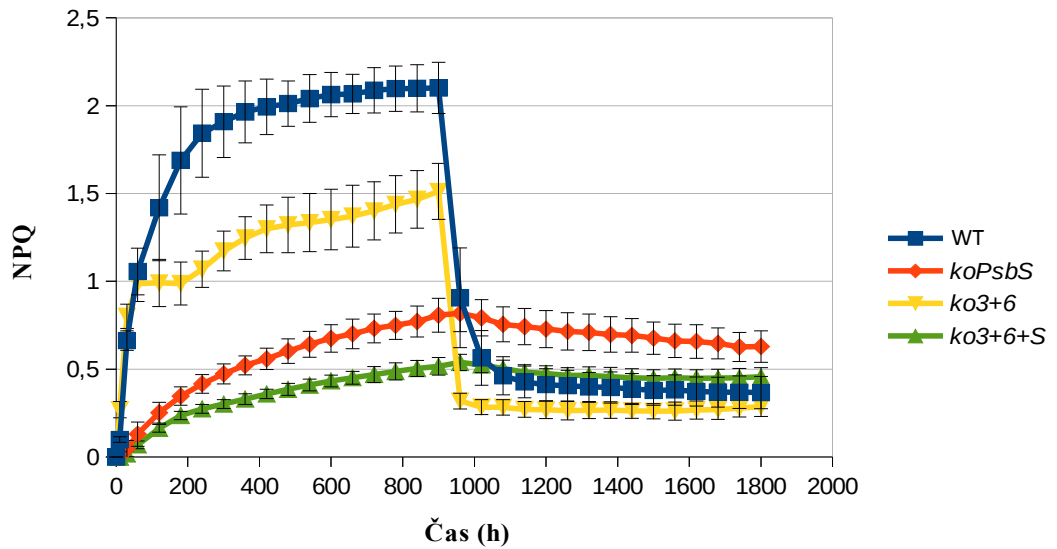
v dôsledku chýbajúcich proteínov Lhcb3 a Lhcb6 (viz. Obr. 19 a Obr. 21). To, že u *ko3+6* by mohlo dochádzať k čiastočnému odpojeniu LHC, je v súlade so zvýšenou minimálnou fluorescenciou F_0 (viz. vyššie). Predpokladá sa, že aby mohla prebehnúť indukcia NPQ, je potrebné najskôr odpojiť majoritné LHC, čo je spúšťané acidifikáciou lumenu po osvetlení lumenu intenzívnym svetlom (Ruban, 2016). V prípade, že sú u *ko3+6* LHC trimery naviazané slabšie než u WT alebo pokiaľ sú čiastočne odpojené, môže to viesť k rýchlejšiemu nárastu NPQ. Tento jav je v korelácii aj s predchádzajúcou štúdiou (Townsend *et al.*, 2018), v ktorej nastala rýchlejšia indukcia NPQ u NoM.



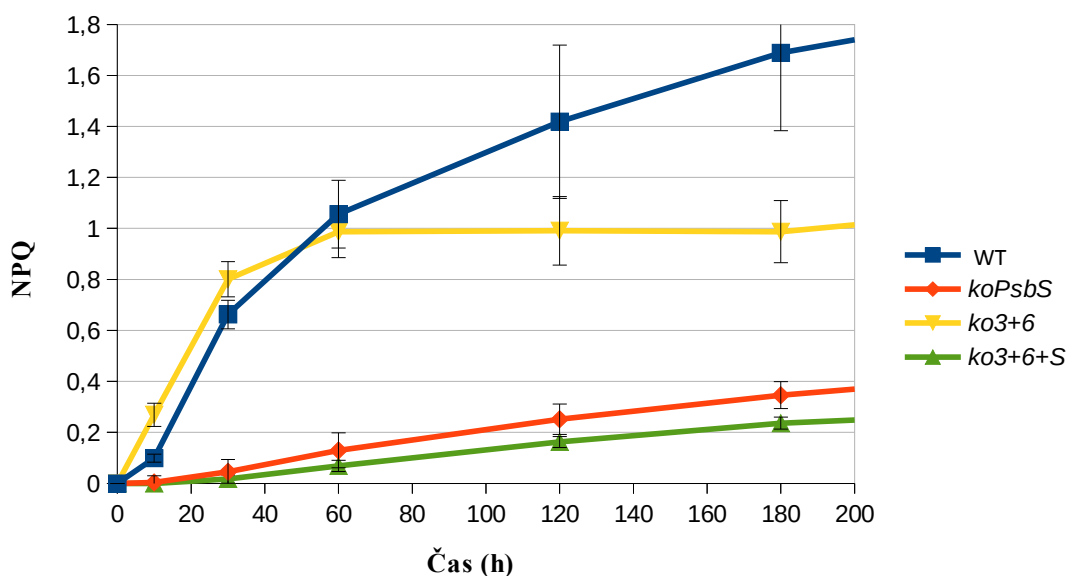
Obr. 18 Nefotochemické zhášanie nastávajúce u rastlín vo svetelnej fáze dňa po 30 min adaptácii na tmu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, $n = 4$.



Obr. 19 Zaostrenie Obr. 18 na počiatočnú fázu NPQ v priebehu 200 s. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, $n = 4$.



Obr. 20 Priemerné NPQ u testovaných rastlín odobratých z temnostnej fázy, ktorá bola následne v rozmedzí 16 – 20 h. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, $n = 4$.



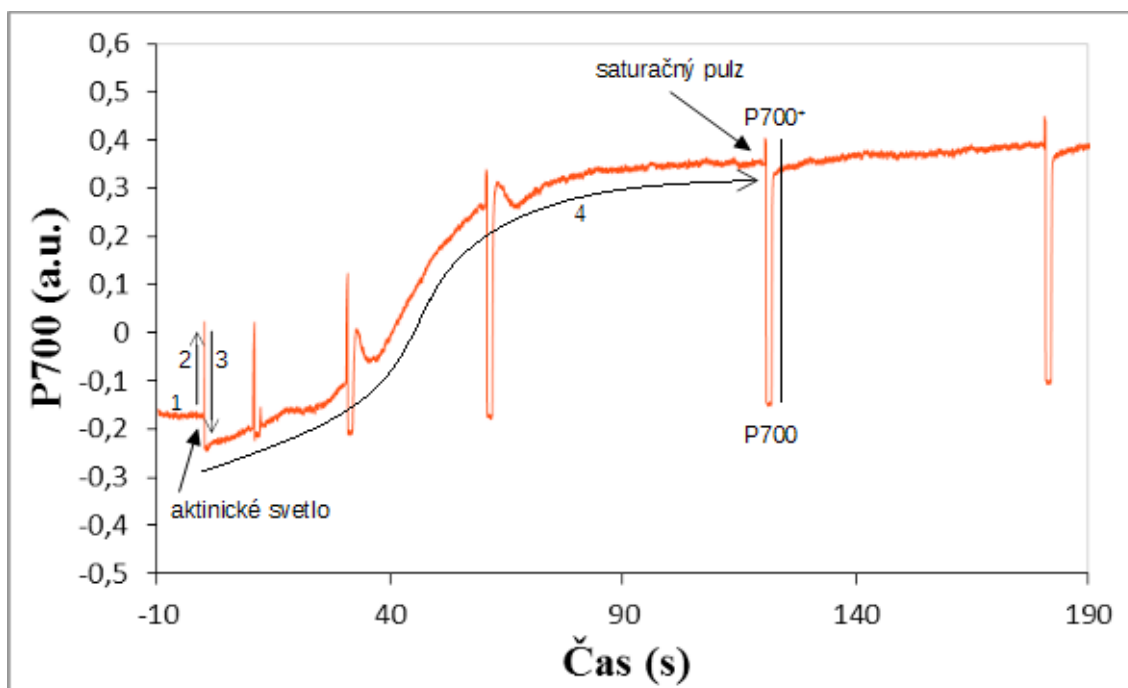
Obr. 21 Zaostrenie Obr. 20 na počiatočnú fázu NPQ v priebehu 200 s. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, $n = 4$.

4.3.5 Reoxidácia P700

P700 je dimérické RC s naviazaným chl a , ktoré je asociované s PSI a má rovnakú funkciu ako P680 u PSII. Redoxný stav P700 je možné sledovať spoločne s meraním fluorescence na základe merania absorpčných zmien v oblasti 700 nm. Odozva P700 na zapnutie aktinického svetla má typický trojfázový priebeh (viz. Obr. 22).

U rastlín adaptovaných na tmu je RC P700 naplno redukované (bod 1, viz. Obr. 22). Po osvetlení nastáva rýchla oxidácia P700 (prechod zo základnej formy do oxidovanej; P700⁺) v dôsledku odtoku elektrónov na akceptor (ferredoxin) (fáza 2, viz. Obr. 22). Snahou P700⁺ je vrátenie sa do základnej formy a to pomocou redukcie P700⁺ – prijatia elektrónov od PSII. Akonáhle elektróny dorazia z PSII, dochádza opätovne k dočasnej redukcii (fáza 3, viz. Obr. 22). Aktivácia odtoku elektrónov z PSI na NADP⁺ potom postupne vedie k opätovnej oxidácii (reoxidácii) (fáza 4, viz. Obr. 22). Rýchlosť reoxidácie P700 teda odráža rovnováhu medzi prítokom elektrónov z PSII do PSI a odtokom elektrónov z PSI na konečné akceptory.

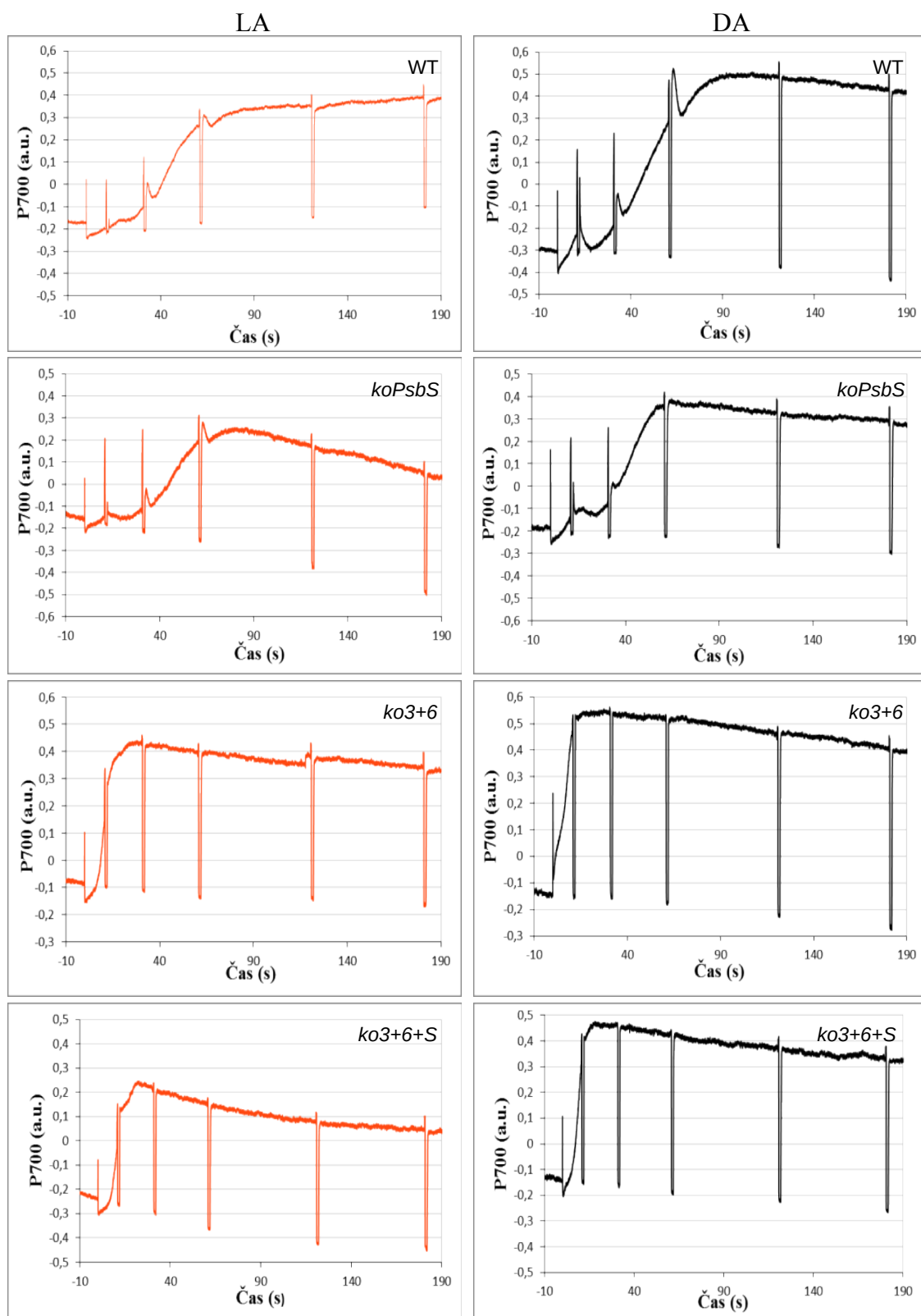
Na obrázku č. 23 sú typické priebehy absorpčných zmien P700 po zapnutí aktinického svetla. Aktinické svetlo (800 μ E) bolo zapnuté v čase 0 s. V časoch 10 s, 30 s, 60 s a v ďalších 60s intervaloch boli aplikované saturačné pulzy nasledované



Obr. 22 Ilustratívny priebeh reoxidácie P700. Bod 1 – základná hladina odpovedajúca 30 min adaptácii na tmu; fáza 2 – oxidácia P700 nastávajúca po spustení aktinického svetla; fáza 3 – redukcia P700; fáza 4 – reoxidácia P700; P700⁺ – oxidovaný stav, P700 – redukovaný stav.

krátkymi vypnutiami aktinického svetla. Tieto pulzy boli využité pre výpočet parametrov chlorofylovej fluorescence, ktorá bola meraná paralelne s meraním P700.

Vo výsledkoch, ktoré boli namerané na testovaných genotypoch môžeme pozorovať u WT aj *koPsbS* omnoho dlhší časový interval potrebný na dosiahnutie úplnej reoxidácie P700 voči *ko3+6* a *ko3+6+S*. U WT aj *koPsbS* je potrebných približne 120 s na dosiahnutie reoxidácie, zatiaľ čo *ko3+6* a *ko3+6+S* je reoxidácia podstatne rýchlejšia (cca 40 s). Absencia PsbS teda nemá na priebeh P700 výraznejší efekt. Rýchlejšia reoxidácia PSI u mutantov *ko3+6* a *ko3+6+S* môže byť vysvetlená spomalením lineárneho elektrónového transportu z PSII, napríklad v dôsledku zhoršenej difúzie plastochinonových prenášačov (PQ) v tylakoidných membránach (de Bianchi *et al.*, 2008), ktorý môže byť spôsobený tvorbou semikryštálov PSII v granách (Kovács *et al.*, 2006) (viz. Obr. 23). Porovnanie LA a DA rastlín u *ko3+6* a *ko3+6+S* taktiež naznačuje, že dlhodobá adaptácia na tmu ešte rýchlosť reoxidácie mierne zvyšuje. Toto pozorovanie je v súlade s výsledkami analýzy fluorescence chlorofylu diskutovanej vyššie, tj. že dlhodobá adaptácia na tmu pravdepodobne vedie ku spomaleniu fotosyntetického elektrónového transportu z PSII na PSI.



Obr. 23 Priebch reprezentatívnych kriviek reoxidácie P700 počas zhášacej analýzy u všetkých testovaných genotypov rastlín (WT, *koPsbS*, *ko3+6* a *ko3+6+S*) po odobratí zo LA a DA denného cyklu. Rastliny z LA boli 30 min pred analýzou adaptované na tmu.

5 ZÁVER

V tejto bakalárskej práci sme v teoretickej časti postupne rozoberali dve hlavné témy a to *Arabidopsis thaliana* ako modelový organizmus a jeho rôzne využitie počas výskumných projektov. A druhá časť opisovala oxygénnu fotosyntézu so zameraním na svetlozberné antény a ochranu voči svetlu s vysokou intenzitou.

Experimentálna časť bola taktiež rozdelená na dva celky, úlohou prvého celku bola príprava mutanta *koLhcb3koLhcb6koPsbS* pomocou postupného kríženia mutantov *koLhcb3koLhcb6* a *koPsbS* s priebežnou selekciou pomocou PCR podľa predpripravenej stratégie. Výsledného homozygotného mutanta sme vyseletovali v F3 generácii a jeho semiačka sa využili na pestovanie rastlín pre druhú časť experimentálnej práce. V druhej časti sa uskutočnila u rastlín fyziologická charakterizácia na základe parametrov chlorofylovej fluorescencie so sústredením sa na qE zložku nefotochemického zhášania.

Táto práca naviazala na výsledky pilotného projektu, pri ktorom bol charakterizovaný mutant *Arabidopsis thaliana koLhcb3koLhcb6*, ktorý bol pripravený ako „hrubá“ analógia fotosyntetického aparátu u *P. abies*. Na základe experimentov s novo pripraveným mutantom sa dá konštatovať, že prvá „rýchla“ fáza nefotochemického zhášania u *koLhcb3koLhcb6* je závislá na proteíne PsbS. Tento výsledok sponchyňuje hypotézu publikovanú v článku Kováč *et al.*(2006), že Lhcb6 je jedným z hlavných interakčných partnerov PsbS. Dá sa teda predpokladať, že proteín PsbS je kľúčový i pre indukciu nefotochemického zhášania u *P. abies*, napriek tomu, že proteínové zloženie PSII je u neho odlišné od ostatných vyšších rastlín (Kouřil *et al.*, 2016).

Výsledky fyziologickej analýzy *koLhcb3koLhcb6* a *koLhcb3koLhcb6koPsbS* taktiež ukázali, že u týchto mutantov dochádza pravdepodobne k rozvolneniu / čiastočnému odpojeniu svetlozberných antén, čo má za následok netypický dvojfázový priebeh krivky nefotochemického zhášania, zvýšenie minimálnej fluorescencie F_0 a spomalenie elektrónového transportu z PSII. Potvrdil sa taktiež netypický jav, a to že tieto efekty sú výraznejšie u rastlín dlhodobo (viacej než 4 h) adaptovaných na tmu. Presný mechanizmus ani prípadný fyziologický význam týchto zmien zatiaľ nie je známy, ale bude predmetom ďalších analýz.

Do budúca by bolo zaujímavé zistiť, aká bude fyziologická odozva mutantov *koLhcb3koLhcb6koPsbS* na aklimáciu na vysokú intenzitu svetla. Je známe, že *koPsbS* je citlivý na vysokú intenzitu svetla a zároveň vieme, že u rastlín pestovaných pri vysokej intenzite svetla dochádza ku zníženiu množstva proteínov Lhcb3 a Lhcb6. Ponúka sa otázka, či by absencia Lhcb3 a Lhcb6 mohla napríklad znížiť senzitivitu *koPsbS* voči vysokej intenzite svetla. V pláne je taktiež ďalej pokračovať v projekte zameranom na vytvorenie „modelu“ PSII z *P. abies* pomocou mutácií *A. thaliana*. Nedávne práce ukazujú, že pre vysvetlenie rozdielov v štruktúre a chovaní PSII u *P. abies* a ďalších vyšších rastlín by mohla byť kľúčová minoritná anténa Lhcb4 a týmto smerom budú zamerané ďalšie štúdie.

6 LITERATÚRA

- Adamiec, M., Gibasiewicz, K., Luciński, R., Giera, W., Chelminiak, P., Szewczyk, S., Sipińska, W., van 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.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., Ecker, J.R. (2003): Genome-Wide Insertional Mutagenesis of. *Science* **301**, 653-657.
- Al-Soud, W.A., Rådström, P. (1998): Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 3748-3753.
- Arabidopsis Home Page: <https://www.arabidopsis.org/> (20.3.2020).
- Azpiroz-Leehan, R., Feldmann, A.K. (1997): T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends in Genetics* **12**, 152-156.
- Ballottari, M., Dall'Osto, L., Morosinotto, T., Bassi, R. (2007): Contrasting Behavior of Higher Plant Photosystem I and II Antenna Systems during Acclimation. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 8947-8958.
- Betterle, N., Ballottari, M., Zorzan, S., de Bianchi, S., Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., Morosinotto, T., Bassi, R. (2009): Light-induced Dissociation of an Antenna Heterooligomer Is Needed for Non-photochemical Quenching Induction. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 15255-15266.
- Boekema, E.J., van Breemen, J.F.L., van Roon, H., Dekker, J.P. (2000): Arrangement of photosystem II supercomplexes in crystalline macrodomains within the thylakoid membrane of green plant chloroplasts. *Journal of Molecular Biology* **301**, 1123-1133.
- Boekema, E. J., Semchonok, D.A. (2019): Organization of photosynthetic membrane proteins into supercomplexes. In: *Light harvesting in Photosynthesis*. (Croce, R., van Grondelle, R., van Stokkum, I.H.M. & van Amerongen, H., eds.), CRC Press, Boca Ratona, 207-217.
- Bouché, N. (2001): *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 111-117.
- Bourque, G., Burns, K.H., Gehring, M., Gorbunova, V., Seluanov, A., Hammell, M., Imbeault, M., Izsvák, Z., Levin, H.L., Macfarlan, T.S., Mager, D.L., Feschotte, C. (2018): Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biology* **19**, 199-211.
- Caffarri, S., Kouřil, R., Kereiche, S., Boekema, E.J., Croce, R. (2009): Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *The EMBO Journal* **28**, 3052-3063.
- Cambon-Bonavita, M.-A., Schmitt, P., Zieger, M., Flaman, J.-M., Lesongeur, F., Gérard, Raguénès., Bindel, D., Frisch, N., Lakkis, Z., Dupret, D., Barbier, G., Quérellou, J. (2000): Cloning, expression, and characterization of DNA polymerase I from the hyperthermophilic archaea *Thermococcus fumicolans*. *Extremophiles* **4**, 215-225.
- Chien, A., Edgar, D.B., Trela, J.M. (1976): Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*. *J. BACTERIOL.* **127**, 1550-1557.
- Choi, J.J., Jung, S.E., Kim, H.-K., Kwon, S.-T. (1999): Purification and properties of *Thermus filiformis* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **30**, 19-25.
- Croce, R., van Amerongen, H. (2011): Light-harvesting and structural organization of Photosystem II: From individual complexes to thylakoid membrane. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **104**, 142-153.

- Croce, R., van Amerongen, H. (2014): Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nature Chemical Biology* **10**, 492-501.
- Dall'Osto, L., Caffarri, S., Bassi, R. (2005): A Mechanism of Nonphotochemical Energy Dissipation, Independent from PsbS, Revealed by a Conformational Change in the Antenna Protein CP26. *The Plant Cell* **17**, 1217-1232.
- Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., Bressan, M., Paleček, D., Židek, K., Niyogi, K.K., Fleming, G.R., Zigmantas, D., Bassi, R. (2017): Two mechanisms for dissipation of excess light in monomeric and trimeric light-harvesting complexes. *Nature Plants* **3** : 17033. <https://www.nature.com/articles/nplants201733>.
- Damkjær, J.T., Kerešič, S., Johnson, M.P., Kovacs, L., Kiss, A.Z., Boekema, E.J., Ruban, A.V., Horton, P., Jansson, S. (2009): The Photosystem II Light-Harvesting Protein Lhcb3 Affects the Macrostructure of Photosystem II and the Rate of State Transitions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 3245-3256.
- 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.
- Demming-Adams, B., Adams W.W. (1996): The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* **1**, 21-26.
- Dong, L., Tu, W., Liu, K., Sun, R., Liu, C., Wang, K., Yang, C. (2015): The PsbS protein plays important roles in photosystem II supercomplex remodeling under elevated light conditions. *Journal of Plant Physiology* **172**, 33-41.
- Duffy, C.D.P., Valkunas, L., Ruban, A.V. (2013): Light-harvesting processes in the dynamic photosynthetic antenna. *Physical Chemistry Chemical Physics* **15**, 18752-18770.
- Edwards, A.W.F. (2012): Reginald Crundall Punnett: First Arthur Balfour Professor of Genetics, Cambridge, 1912. *Genetics* **192**, 3-13.
- Gao, J., Wang, H., Yuan, Q., Feng, Y. (2018): Structure and Function of the Photosystem Supercomplexes. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1-7.
- Gelvin, S.B. (2009): Agrobacterium in the Genomics Age. *Plant Physiology* **150**, 1665-1676.
- Gibbs, R.A. (1990): DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry* **62**, 1202-1214.
- Guidi, L., Tattini, M., Landi, M. (2017): How Does Chloroplast Protect Chlorophyll Against Excessive Light? In: *Chlorophyll*. (Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q. & Queiroz, M.I., eds.), IntechOpen, London, 21-36.
- Hankamer, B., Nieldi, J., Zheleva, D., Boekema, E., Jansson, S., Barber, J. (1997): Isolation and Biochemical Characterization of Monomeric and Dimeric Photosystem II Complexes from Spinach and Their Relevance to the Organisation of Photosystem II *in vivo*. *European Journal of Biochemistry* **243**, 422-429.
- Heinz Walz GmbH (2009): *Dual-PAM-100 Measuring System*. 2nd ed. Heinz Walz GmbH, Eichenring, 87 strán.
- Ishino, S., Ishino, Y. (2014): DNA polymerases as useful reagents for biotechnology — the history of developmental research in the field. *Frontiers in Microbiology* **5**, 1-8.
- Jackowski, G., Kacprzak, K., Jansson, S. (2001): Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of Photosystem II (LHC II). *Biochimica et Biophysica Acta* **1504**, 340-45.
- Johnson, M.P. (2016): Photosynthesis. *Essays In Biochemistry* **60**, 255–273.
- Joshi, M., Deshpande, J.D. (2011): POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research* **2**, 81-97.
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Korber, H., Redei, G.P., Schell, J. (1989): High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 8467-8471.
- Koornneef, M., Meinke, D. (2010): The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal* **61**, 909-921.

- Kouřil, R., Oostergetel, G.T., Boekema, E.J. (2011): Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1807**, 368-374.
- 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.
- Kouřil, R., Nosek, L., Bartoš, J., Boekema, E.J., Ilík, P. (2016): Evolutionary loss of light-harvesting proteins Lhcb6 and Lhcb3 in major land plant groups – break-up of current dogma. *New Phytologist* **210**, 808-814.
- Kovács, L., Damkjær, J., Kerešič, 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.
- Krysan, P.J., Young, J.C., Sussman, M.R. (1999): T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **11**, 2283-2290.
- Kuai, B., Chen, J., Hörtensteiner, S. (2018): The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown. *Journal of Experimental Botany* **69**, 751-767.
- Kuusisto, P., Chum, P.Y. (2013): Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Kit: Plant Genotyping And Transgene Detection Without DNA Purification., *Thermo Fisher Scientific Inc.*, 1-3.
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/plant-genotyping-transgene-detection-app-note.pdf>.
- Lane, D., Prentki, P., Chandler, M. (1992): Use of Gel Retardation To Analyze Protein-Nucleic Acid Interactions. *Microbiological Reviews* **56**, 509-528.
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., Kim, Y.H. (2012): Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, e3923.
<http://www.jove.com/video/3923>.
- Li, X.-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K. (2000): A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**, 391-395.
- McClintock, B. (1950): The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **36**, 344-355.
- Meinke, D.W. (1998): *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* **282**, 662-682.
- Mirkovic, T., Ostroumov, E.E., Anna, J.M., van Grondelle, R., Govindjee, Scholes, G.D. (2017): Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms. *Chemical Reviews* **117**, 249-293.
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K. (2001): Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology* **125**, 1558-1566.
- Murchie, E.H., Lawson, T. (2013): Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3983-3998.
- Murray, M.G., Thompson, W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**, 4321-4326.
- Nelson, N., Junge, W. (2015): Structure and Energy Transfer in Photosystems of Oxygenic Photosynthesis. *Annual Review of Biochemistry* **84**, 659-683.
- Nicol, L., Croce, R. (2019): Light harvesting in higher plants and green algae. In: *Light Harvesting in Photosynthesis*. CRC Press, Boca Raton, 59-76.
- O'Malley, R.C., Barragan, C.C., Ecker, J.R. (2017): A User's Guide to the *Arabidopsis* T-DNA Insertional Mutant Collections, *Methods Mol Biol*, **1284**, 323-342.
- O'Malley, R.C., Ecker, J.R. (2010): Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant collection. *The Plant Journal* **61**, 928-940.

- Parinov, S., Sevugan, M., Ye, D., Yang, W.-C., Kumaran, M., Sundaresan, V. (1990): Analysis of Flanking Sequences from Dissociation Insertion Lines: A Database for Reverse Genetics in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **11**, 2263-2270.
- Passarini, F., Wientjes, E., Hienerwadel, R., Croce, R. (2009): Molecular Basis of Light Harvesting and Photoprotection in CP24, *Journal of Biological Chemistry* **284**, 29536-29546.
- Pinolla, A., Kirilovsky, D., Bassi, R. (2019): Photoprotective excess energy dissipation. In: *Light Harvesting in Photosynthesis*. 1st ed. (Croce, R., van Grondelle, R., van Amerongen, H. & van Stokkum, I.H.M., eds.), CRC Press, Boca Raton, 219-243.
- Rivero, L., Scholl, R., Holomuzki, N., Crist, D., Grotewold, E., Brkljacic, J. (2014): Handling *Arabidopsis* Plants: Growth, Preservation of Seeds, Transformation, and Genetic Crosses. In: *Arabidopsis Protocols*. (Sanchez-Serrano, J.J. & Salinas, J., eds.), Humana Press, Totowa, 3-25.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., Weisshaar, B. (2003): An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* **53**, 247-259.
- Ruban, A. (2012): *The Photosynthetic Membrane: Molecular Mechanisms and Biophysics of Light Harvesting*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 267 strán.
- Ruban, A.V. (2016): Nonphotochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching: Mechanism and Effectiveness in Protecting Plants from Photodamage. *Plant Physiology* **170**, 1903-1916.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988): Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- SciencePrimer Home Page: <https://scienceprimer.com/punnett-square-calculator> (20.3.2020).
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., Goff, S.A. (2002): A High-Throughput *Arabidopsis* Reverse Genetics System. *The Plant Cell* **14**, 2985-2994.
- SIGnAL Salk Institute Genomic Analysis Laboratory Home Page: <http://signal.salk.edu/> (20.3.2020).
- SIGnAL Salk Institute Genomic Analysis Laboratory Home Page: http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html (8.3.2020).
- Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2012): *Principles of genetics*. 6th ed. Wiley, Hoboken, 766 strán.
- Staehelein, L.A. (2005): Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. In: *Discoveries in Photosynthesis*. (Govindjee, Beatty, J.T., Gest, H. & Allen, J.F., eds.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 717-728.
- Stirbet, A., Riznichenko, G.Yu., Rubin, A.B., Govindjee (2014): Modeling chlorophyll a fluorescence transient: Relation to photosynthesis. *Biochemistry (Moscow)* **79**, 291-323.
- Štroch, M., Kuldová, K., Kalina, J., Špunda, V. (2008): Dynamics of the xanthophyll cycle and non-radiative dissipation of absorbed light energy during exposure of Norway spruce to high irradiance. *Journal of Plant Physiology* **165**, 612-622.
- Su, X., Ma, J., Wei, X., Cao, P., Zhu, D., Chang, W., Liu, Z., Zhang, X., Li, M. (2017): Structure and assembly mechanism of plant C₂S₂M₂-type PSII-LHCII supercomplex. *Science* **357**, 815-820.
- Terpe, K. (2013): Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**, 10243-10254.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- ThermoFisher Scientific Home Page: <https://www.thermoscientific.com/pcrwebtools> (20.3.2020).
- Townsend, A.J., Saccon, F., Giovagnetti, V., Wilson, S., Ungerer, P., Ruban, A.V. (2018): The causes of altered chlorophyll fluorescence quenching induction in the *Arabidopsis* mutant

- lacking all minor antenna complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1859**, 666-675.
- van Amerongen, H., Croce, R. (2013): Light harvesting in photosystem II. *Photosynthesis Research* **116**, 251-263.
- Wang, Y.H. (2008): How effective is T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*? *J Biochem Tech* **1**, 11-20.
- Ware, M.A., Belgio, E., Ruban, A.V. (2015): Comparison of the protective effectiveness of NPQ in *Arabidopsis* plants deficient in PsbS protein and zeaxanthin. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1259-1270.
- Wise, R.R. (2007): The Diversity of Plastid Form and Function. In: *The Structure and Function of Plastids*. (Wise, R.R. & Hooper, J.K., eds.), Springer Netherlands, Dordrecht, 3-26.
- Woody, S.T., Austin-Phillips, S., Amasino, R.M., Krysan, P.J. (2007): The *WiscDsLox* T-DNA collection: an arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *Journal of Plant Research* **120**, 157-165.
- Ylmaz, M., Ozic, C., Gok, I. (2012): Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis. In: *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. (Magdeldin, S., ed.), InTech, London, 33-40.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

CTAB	cetyltrimetylamonium bromid
EtBr	etídium bromid – 2,7-diamino-10-etyl-9-fenylfenanthridiniumbromid
F generácia	filiálna generácia
Fm	maximálna fluorescencia chlorofylu
Fm'	maximálna fluorescencia chlorofylu na svetle
Fo	minimálna fluorescencia chlorofylu
FP	fenotypový pomer
Fv/Fm	maximálny kvantový výťažok fotochémie fotosystému II
GP	genotypový pomer
HM	homozygot
HZ	heterozygot
Chl	chlorofyl
ko	knockout
<i>ko3+6</i>	<i>koLhcb3koLhcb6</i>
<i>ko3+6+S</i>	<i>koLhcb3koLhcb6koPsbS</i>
LHC	svetlozberný komplex
LHCII	svetlozberný komplex fotosystému II
NoM	mutanty <i>Arabidopsis thaliana</i> bez minoritných svetlozberných antén
NPQ	nefotochemické zhášanie
P generácia	parentálna generácia
P700 ⁺	oxidovaný stav P700
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PQ	plastochinon
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
QA	plastochinon A
qE	zhášanie závislé na energii
qI	fotoinhibičné zhášanie
qP	fotochemické zhášanie
qT	zhášanie závislé na stavových prechodoch spojených s presunom svetlozberných antén z medzi PSII a PSI
RC	reakčné centrum
RC PSII	reakčné centrum fotosystému II

ROS	reaktívne formy kyslíka
T-DNA	transferová DNA
TAE	Tris/Acetate/EDTA
TBE	Tris/Borate/EDTA
Ti-plazmid	tumor-indikujúci plazmid
μE	$\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$