

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Nefotochemické zhášení excitací u rostlin
Arabidopsis thaliana s absencí vybraných
monomerních světlosběrných antén fotosystému II**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Vojtěch Chýlek
Studijní program:	B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Petr Ilík, Ph.D.
Rok:	2023

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

V Olomouci dne

.....
Podpis studenta

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce, prof. RNDr. Petru Ilíkovi, Ph.D., za odborné vedení, užitečné rady a pomoc při sepisování této práce. Dále bych chtěl poděkovat mé konzultantce, Mgr. Tereze Vánské, za pomoc s experimentální částí práce a za poskytnutí výsledků validace mutantů použitých v této práci. Také chci poděkovat grantu UP v Olomouci: IGA_PrF_2023_023 Aktuální studie a směry výzkumu v obecné a molekulární biofyzice.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Vojtěch Chýlek
Název práce:	Nefotochemické zhášení excitací u rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> s absencí vybraných monomerních světlosběrných antén fotosystému II
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra biofyziky
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Petr Ilík, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2023

Abstrakt: Cílem této bakalářské práce bylo přispět k charakterizaci nefotochemického zhášení u rostlin s absencí světlosběrných antén fotosystému II LHCB5 a LHCB6. V předchozím výzkumu, který se týkal mutantní linie *lhcb6*, byly u mutantu *lhcb6* pozorovány nízké hodnoty fotosyntetických parametrů a obecně nízká životaschopnost, ale v případě dvojitého mutantu *lhcb5lhcb6* byl pozorován částečný návrat k fenotypu a k hodnotám fotosyntetických parametrů divokého typu. V návazné studii nebyla u mutantu *lhcb6* pozorována nižší životaschopnost nebo výrazně nižší hodnoty fotosyntetických parametrů.

V této práci byly využity mutantní linie *Arabidopsis thaliana lhcb5* a *lhcb6* a dvojitý mutant *lhcb5lhcb6*. Rostliny byly aklimatizovány na tři různé světelné intenzity a následně charakterizovány zejména metodami založenými na detekci chlorofylové fluorescence *in vivo*. Výsledky této práce nepotvrzují sníženou životaschopnost mutantu *lhcb6* ani výrazný pokles fotosyntetických parametrů tohoto mutantu, ale po aklimaci na vysokou intenzitu světla byly u *lhcb6* pozorovány oba tyto fenomény, především výrazně snížená indukce nefotochemického zhášení excitací. Zajímavým výsledkem je výrazné zvýšení obsahu chlorofylů u všech mutantů aklimovaných na vysokou intenzitu světla.

Klíčová slova:	nefotochemické zhášení, světlosběrné antény, chlorofylová fluorescence, aklimatizace na světelnou intenzitu
Počet stran:	63
Počet příloh:	6
Jazyk:	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name

and Surname: Vojtěch Chýlek

Title: Non-photochemical quenching of excitations in *Arabidopsis thaliana* plants lacking selected monomeric light-harvesting antenna complexes of photosystem II

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Biophysics

Supervisor: prof. RNDr. Petr Ilík, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Abstract: The aim of this bachelor thesis was to contribute to the characterization of non-photochemical quenching in plants lacking light-harvesting antennae LHCB5 and LHCB6 of photosystem II. In previous research concerning the *lhcb6* mutant line, low photosynthetic parameter values and generally low viability were observed in the *lhcb6* mutant, but in the case of the *lhcb5lhcb6* double mutant, a partial return to wild-type phenotype and photosynthetic parameter values was observed. In a follow-up study, lower viability or significantly lower values of photosynthetic parameters were not observed in the *lhcb6* mutant.

In this thesis were used mutant lines of *Arabidopsis thaliana lhcb5* and *lhcb6* and the double mutant *lhcb5lhcb6*. The plants were acclimatized to three different light intensities and subsequently characterized mainly by methods based on the detection of chlorophyll fluorescence *in vivo*. The results of this work do not confirm the reduced viability of the *lhcb6* mutant or a significant decrease in the photosynthetic parameters of this mutant, but after acclimation to high light intensity, both of these phenomena were observed in *lhcb6*, especially a significantly reduced induction of non-photochemical quenching by excitation. An interesting result is a significant increase in chlorophyll content in all mutants acclimated to high light intensity.

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

Number of pages: 63

Number of appendices: 6

Language: Czech

OBSAH:

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1 Fotosyntéza.....	3
2.1.1 Světelná fáze fotosyntézy u vyšších rostlin.....	5
2.1.1.1 Fotosystém II.....	7
2.1.1.2 Superkomplexy fotosystému II.....	8
2.1.2 Stres nadměrnou intenzitou světla.....	9
2.1.2.1 Cesty absorbované energie.....	10
2.1.2.2 Nefotochemické zhášení.....	12
2.1.2.3 Zhášení závislé na energii.....	12
2.1.2.4 Role periferních antén v nefotochemickém zhášení.....	15
2.1.2.5 Role antén LHCB5 a LHCB6 v nefotochemickém zhášení.....	16
2.2 Aklimace rostlin na různé intenzity světla.....	17
2.3 Metody měření indukce chlorofylové fluorescence.....	18
2.3.1 Základní fotosyntetické parametry.....	18
2.4 Motivace bakalářské práce.....	22
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1 Materiál.....	23
3.1.1 Rostlinný materiál.....	23
3.1.2 Chemikálie.....	23
3.1.3 Technický materiál.....	23
3.1.4 Softwarové vybavení.....	24
3.2 Metody.....	24
3.2.1 Rostlinný materiál a podmínky pěstování.....	24
3.2.2 Měření fotosyntetických parametrů.....	24
3.2.2.1 Dual-PAM.....	24
3.2.2.2 PEA meter („Plant Efficiency Analyzer“)......	25
3.2.3 Izolace pigmentů.....	25
3.2.4 Validace inzerčních mutantů.....	26
3.2.5 Vyhodnocení fenotypu a hmotnosti čerstvé biomasy nadzemní části rostliny..	27
3.2.6 Statistické vyhodnocení.....	27
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	28
4.1 Validace inzerčních mutantů.....	28
4.2 Vyhodnocení fenotypu a hmotnosti čerstvé biomasy nadzemní části rostliny.....	29
4.3 Pigmenty.....	33
4.4 Parametry indukce chlorofylové fluorescence.....	36
4.5 Stanovení fotosyntetických parametrů fotosystému I a fotosystému II.....	39
5 ZÁVĚR	50
6 LITERATURA	52
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	56
8 PŘÍLOHY	59

CÍLE PRÁCE

TEORETICKÁ ČÁST

1. Vypracování přehledu problematiky role světlosběrných antén LHCB5 a LHCB6 ve fotosyntéze se zaměřením na jejich roli při indukci nefotochemického zhášení fluorescence (NPQ) a přehledu parametrů vypočtených z naměřených indukčních křivek chlorofylové fluorescence.

PRAKTICKÁ ČÁST

1. Měření kinetiky NPQ a dalších parametrů funkce fotosystému II a I *in vivo* u mutantních linií *Arabidopsis thaliana* s absencí proteinů LHCB6 a/nebo LHCB5 aklimovaných na různou ozářenost.
2. Izolace pigmentů z listů napěstovaných rostlin a stanovení koncentrací těchto pigmentů pomocí spektrofotometrické metody.
3. Analýza naměřených dat a diskuze výsledků.

1 ÚVOD

Fotosyntéza je jeden z nejdůležitějších biochemických procesů pro život na naší planetě. Jde o hlavní způsob, skrze který získává energii většina autotrofních organismů, mezi které patří například rostliny. Zásadní se stala oxygenní fotosyntéza, která využívá světlo, oxid uhličitý a vodu za vzniku glukózy a kyslíku, který se stal základním předpokladem evoluce a existence komplexnějších organismů (viz např. Johnson, 2016).

I přesto, že světlo je jeden z předpokladů pro fotosyntézu, jeho nadměrná intenzita může pro rostliny představovat výrazný problém, a proto musí rostliny neustále balancovat mezi využitím absorbovaného záření ve fotosyntéze a zapojením ochranných mechanismů. Nadměrná absorpce světla může vést k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou poškodit klíčové proteiny v rostlinných buňkách. Proti této nadměrné excitaci si rostliny vyvinuly řadu ochranných mechanismů. Jedním z nich je nefotochemické zhášení (NPQ), které umožňuje tuto přebytečnou energii přeměnit na teplo. Rostliny disponují dvěma fotosystémy, na kterých probíhají fotochemické reakce. Pro studium procesů NPQ je pozorován především fotosystém II (PSII), protože u PSII je možné pozorovat NPQ při pokojové teplotě. PSII se skládá z jádra a periferních antén. Na periferních světlosběrných anténách probíhají procesy sběru a transferu světelné energie do jádra nebo procesy nefotochemického zhášení. Nefotochemické zhášení je složeno z několika komponent, přičemž pro rostliny je nejdůležitější zhášení závislé na energii (qE), které je nejrychleji regulovatelnou komponentou NPQ a zprostředkovává tak první odpověď rostliny na stres z nadměrné intenzity absorbovaného světla (viz např. Müller *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009).

Při biologickém výzkumu jsou využívány modelové organismy. Tyto organismy jsou nenáročné na pěstování, jednoduché a vhodné pro studium biologických procesů typických pro určitou skupinu organismů. Znalosti ze studia těchto organismů jsou použitelné při studiu komplexnějším organismů. Nejvyužívanější organismus pro studium vyšších dvouděložných rostlin je huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). *Arabidopsis thaliana* patří do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Samotná rostlina se skládá z růžice malých listů s hlavním stonkem zakončeným květenstvím. Mezi hlavní výhody rostlin *A. thaliana* patří malá velikost, rychlá generační doba, velké množství semen, nenáročnost na podmínky, malý genom a samosprašnost (Meyerowitz, 1987).

Jedním z nejdůležitějších nástrojů pro objasnění funkce jednotlivých genů organismu je mutagenese. Knockout mutace umožňují přímé studium funkce jednotlivých genů. Výsledkem těchto mutací je vznik organismů s jedním nebo více nefunkčními geny. Pozorování fenotypu takového organismu s absencí genu může odhalit funkci tohoto genu při porovnání s divokým typem. Knockout mutace vzniká vložením cizorodé DNA kazety do genu zájmu, což vede k znefunkčnění promotoru nebo posunu čtecího rámce. Nejčastější metoda pro *A. thaliana* je infekce bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, která nese upravený Ti-plazmid „tumor-indukující plazmid“. Z Ti-plazmidu je část DNA přenesena do jádra rostlinné buňky. Tento úsek DNA se nazývá T-DNA. Tímto přenosem jsou transformovány nezralé vaječné buňky, z kterých po oplodnění vznikají transgenní semena. Příprava nových „knockout“ mutantů je náročný a zdoluhavý proces, proto bylo vytvořeno několik kolekcí inzerčních linií. Mezi tyto kolekce patří například SAIL, WISC a SALK (O'Malley *et al.*, 2015).

Bližší výzkum periferních antén PSII byl prováděn pomocí vyřazování nebo umlčování jednotlivých genů kódujících dané antény. Zatímco většina těchto mutantů neměla pozměněnou funkci NPQ, v případě mutantu *lhcb6* byla pozorována snížená schopnost NPQ a změněná organizace periferních antén (Kovács *et al.*, 2006). V navazující studii byl u mutantu *lhcb6* popsán kromě výrazně zhoršené schopnosti pro NPQ i zhoršený fenotyp a v případě dvojitého mutantu *lhcb5lhcb6* částečný návrat k fenotypu a hodnotám NPQ divokého typu (De Bianchi *et al.*, 2008). V nedávné studii katedry biofyziky nebyl u mutantu *lhcb6* pozorován ani zřetelně horší fenotyp, ani výrazně horší hodnoty NPQ oproti divokému typu (Ilíková *et al.*, 2021). V této práci byla měřena a vyhodnocována indukce chlorofylové fluorescence u mutantních linií *lhcb5* a *lhcb6* a na dvojitém mutantu *lhcb5lhcb6*. Dále na těchto mutantech byla provedena aklimační studie na různou ozářenost.

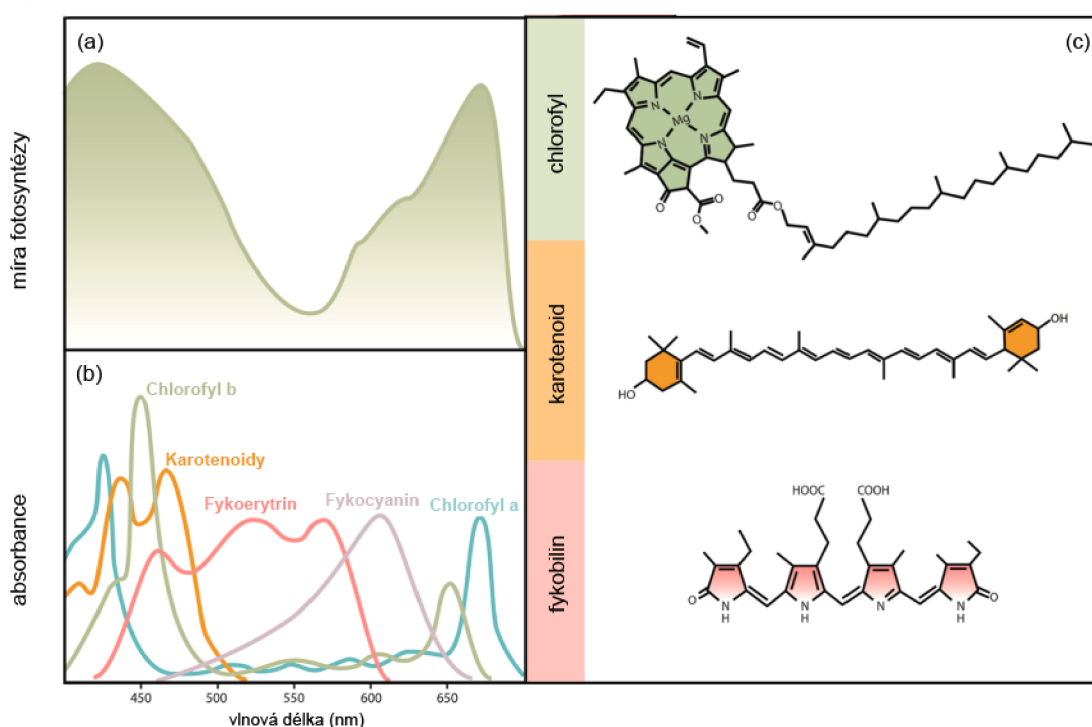
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je jedním z klíčových metabolických procesů pro život na Zemi. Jde o světlem indukovaný proces, kterým je fotosyntetizující organismus schopen přeměňovat zachycenou světelnou energii na energii chemickou. Pro tyto organismy je světlo nejen nezbytné, ale i určující pro jejich vývin a růst. Fotosyntéza se dělí na základě primárního donoru elektronů na oxygenní a anoxygenní. Oxygenní fotosyntézu využívají rostliny, řasy a sinice, které redukuje oxid uhličitý (CO_2) na sacharidy a oxidují vodu (H_2O) za vzniku molekulárního kyslíku (O_2). Naproti tomu anoxygenní fotosyntetické bakterie nevyužívají jako donor elektronů H_2O , ale využívají například H_2S nebo jiné organické sloučeniny. Proto produkují namísto O_2 oxidovanou formu dané chemické sloučeniny, například síru. Fotosyntéza má tři části: 1. absorpce světla, 2. využití této energie k produkci ATP a k redukcí NADP^+ na NAPDH , 3. syntéza sacharidů. Celý tento proces probíhá při přítomnosti světla, ale světlo je nutné k správné funkci pouze pro část 1 a 2, které spadají do „světelné fáze“, zatímco část 3 je na světle nezávislá a bývá ne zcela přesně označovaná jako „temnostní fáze“, protože nemusí probíhat při přítomnosti světla (viz např. Mirkovic *et al.*, 2017; Croce & Van Amerongen, 2014; Anderson, 1986).

Ve všech fotosyntetizujících organismech zajišťují absorpci světla specializované pigmenty, kterými jsou chlorofyly (Chl), karotenoidy (car) a fykobiliny. Chlorofyly jsou po chemické stránce cyklické tetrapyrroly, které jsou schopny absorbovat záření ve viditelné oblasti spektra. Optimální rozsah vlnových délek absorpce světlosběrných pigmentů se pohybuje v červené oblasti (650–690 nm) a v modré oblasti (420–450 nm), protože tyto vlnové délky poskytují chlorofylům energii potřebnou k štěpení vody (Mirkovic *et al.*, 2017). Existují různé druhy chlorofylů, které se liší substituenty na pyrolovém kruhu. Některé z těchto substitucí významně mění absorpční spektra chlorofylu (viz Obr. 1c). Chlorofyly méně absorbují záření v oblasti 500–600 nm, která odpovídá zelené barvě. V této oblasti naopak dobře absorbují pigmenty jako fykoerytrin a fykocyanin, které jsou specifické pro sinice a některé druhy řas. Dále v této oblasti částečně absorbují i karotenoidy, které se nacházejí i u vyšších rostlin (viz Obr. 1b). Fotosyntetické pigmenty jsou navázané v proteinech a tvoří protein-pigmentové komplexy, také označované jako světlosběrné antény (viz např. Liguori *et al.*, 2020).

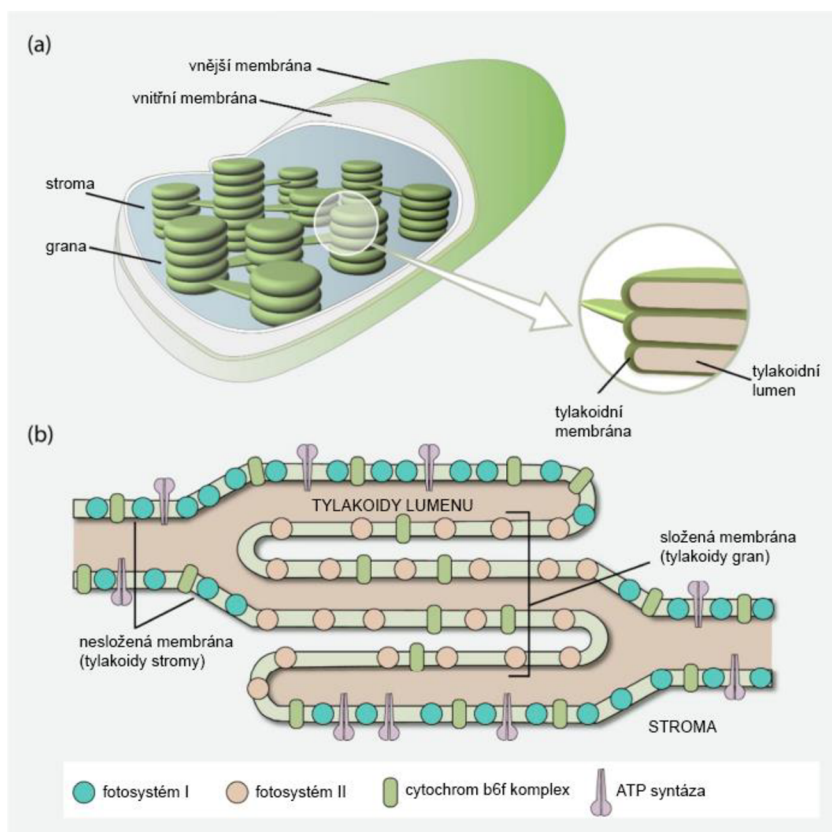
Tyto protein-pigmentové komplexy jsou uspořádány do vyšších celků, kterými jsou fotosystémy I (PSI) a II (PSII). V rámci těchto fotosystémů mohou být fotony absorbovány kteroukoli molekulou fotosyntetického pigmentu, což vede k přechodu této molekuly do nestabilního excitovaného stavu. Excitační energie se přenáší z místa absorpce fotonů postupným předáváním z pigmentu na pigment až do reakčního centra příslušného fotosystému, kde je využita k separaci nábojů. Přenos excitací probíhá nekoherentním přeskokováním (Försterův přenos) z jednoho pigmentu na druhý (Nelson & Junge, 2015).



Obrázek 1. a) graf závislosti míry fotosyntézy na vlnové délce b) graf závislosti absorpance na vlnové délce fotosyntetických pigmentů c) chemické struktury chlorofylu, karotenoidu, fykobilinu (podle Mirkovic *et al.*, 2017, upraveno)

2.1.1 Světelná fáze fotosyntézy u vyšších rostlin

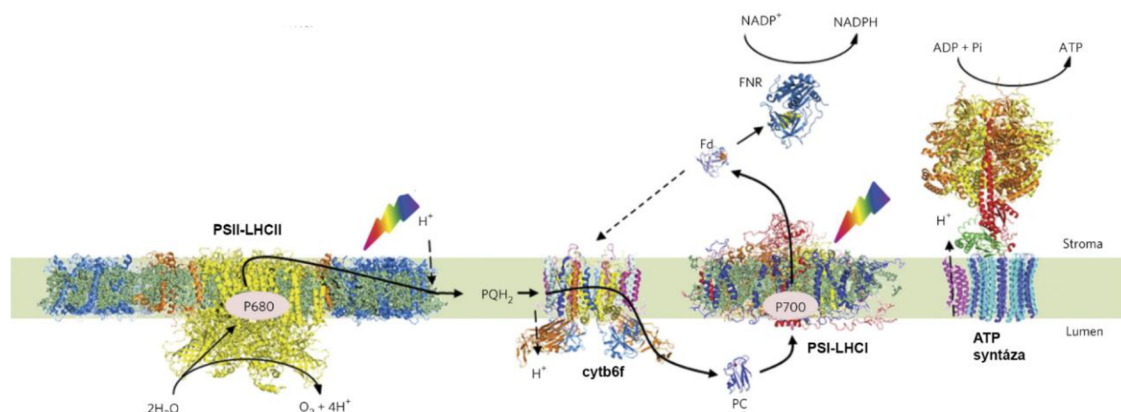
Pro zachycení světla, na co největší ploše, se u suchozemských rostlin vyvinuly listy jako hlavní fotosyntetizující orgán. Každá buňka zeleného pletiva listu obsahuje asi 100 chloroplastů, drobných organel, ve kterých probíhají fotosyntetické reakce. Chloroplast je obalen dvěma membránami, které uzavírají tekutý prostor nazývaný stroma (viz Obr. 2a). Uvnitř chloroplastu se kromě stromatu nacházejí tylakoidy (Johnson, 2016). Tylakoidy jsou malé (5 μm) elipsoidní struktury tvořeny lipidickou dvouvrstvou, která uzavírá vnitřní prostor. Tylakoidní membrána je složena z galaktolipidů a fosfolipidů se zabudovanými proteinovými komplexy. Vnitřní prostor tylakoidu se nazývá lumen. Na tylakoidní membráně probíhají reakce světelné fáze fotosyntézy. Tyto reakce probíhají na čtyřech multiproteinových komplexech, kterými jsou cytochrom b_6/f komplex, ATP-syntáza, fotosystém I (PSI), fotosystém II (PSII) (viz Obr. 2b). Tylakoidy mohou být organizovány do sloupců (grana), ve kterých se nachází PSII, nebo jsou tylakoidy distribuovány volně ve stromatu (stromální tylakoidy), kde se nachází preferenčně PSI (viz např. Liguori *et al.*, 2020).



Obrázek 2. a) Schéma stavby chloroplastu b) rozložení multiproteinových komplexů na tylakoidní membráně (podle Mirkovic *et al.*, 2017, upraveno)

Excitační energie může vstoupit do reakčního centra fotosystému PSI nebo PSII. V případě reakčního centra PSII je excitační energie předána na dvojici chlorofylů *a* (Chl *a*) P680, kde dochází k separaci nábojů, při které je z chlorofylového páru uvolněn elektron a vzniká tak P680⁺ a e⁻. Tento volný elektron je předán na feofytin a poté na molekulu vázaného plastochinonu (PQ) označovaného jako Q_A. Současně s tím dochází k fotolýze dvou molekul H₂O, ze kterých vznikají 4 H⁺, 4 e⁻ a O₂. Elektrony ze štěpení vody slouží k redukci P680⁺. Z Q_A je pak elektron přenesen na molekulu PQ v tzv. Q_B kapse (plastochinon Q_B). V Q_B kapse přijímá plastochinon také 2 H⁺ ze stromatu a uvolňuje se z kapsy ve formě plastochinolu (PQH₂). Tato molekula prochází membránou do cytochromu b₆f komplexu. Zde jsou elektrony z PQH₂ předány do Q-cyklu a na plastocyanin (PC) (přes cytochrom f), který následně předává elektron do PSI. Uvolněné protony z PQH₂ zvyšují kyselost lumenu (viz např. Liguori *et al.*, 2020).

V případě, že excitační energie vstoupí do reakčního centra PSI, dochází k separaci nábojů na dvojici chlorofylů *a* P700, při které je z chlorofylového páru uvolněn elektron a vzniká P700⁺ a e⁻. Uvolněný elektron putuje prostřednictvím několika kofaktorů na ferredoxin (Fd), zatímco PC opět redukuje P700⁺ zpět na P700. Z Fd putují elektrony na Fd-NADP⁺-oxidoreduktázu (FNR) k redukci NADP⁺ na NADPH. Tento tok elektronů z PSII na PSI přes cytochrom b₆f komplex se nazývá lineární (viz Obr. 3). Existuje i cyklický tok elektronů, při kterém elektrony z PSI putují z Fd na cytochrom b₆f komplex a z něj zpět na PSI. Tento cyklický tok elektronů vede k vytvoření protonového gradientu napříč tylakoidní membránou bez redukce NADP⁺. Celkový protonový gradient vytvořený oběma transportními procesy nakonec pohání ATP-syntázu k produkci ATP. NADPH a ATP jsou využity spolu s CO₂ v Calvin-Bensonově cyklu, ve kterém z nich vznikají sacharidy (viz např. Liguori *et al.*, 2020).



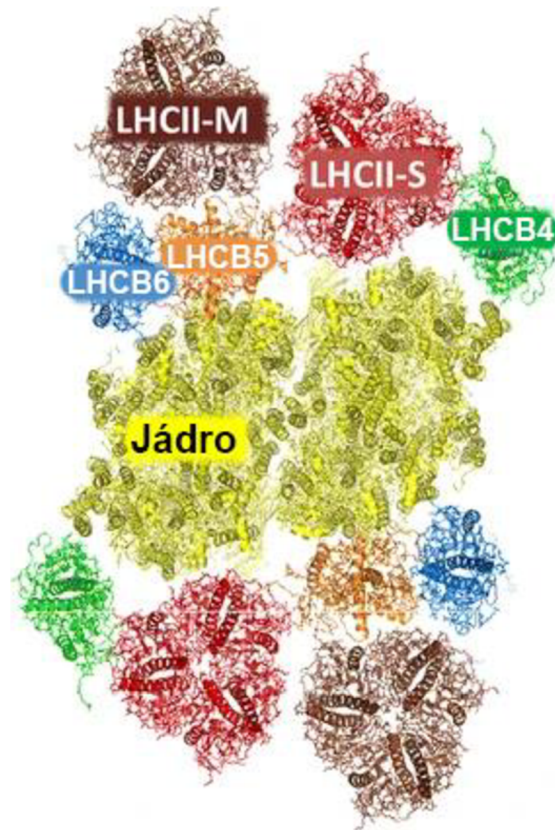
Obrázek 3. Schéma světelných reakcí fotosyntézy (podle Croce & Van Amerongen, 2014, upraveno)

2.1.1.1 Fotosystém II

Fotosystém II (PSII) je makromolekulární komplex, který se nachází v membráně tylakoidů gran. PSII, vyskytuje se ve fotosyntetických organismech v dimerní formě. Každý monomer je složen z 27–28 podjednotek organizovaných do dvou skupin: komplex jádra a periferní systém antén. Jádro je tvořeno několika proteiny. Jednak D1 a D2, které obsahují reakční centrum s dvojicí chlorofylů P680 a ostatní kofaktory elektronového transportního řetězce a jednak proteiny CP47 a CP43, které vážou molekuly chlorofylu *a*, a fungují jako vnitřní anténa PSII. K těmto základním proteinům jádra PSII je připojeno několik nízkomolekulárních podjednotek, jejichž role zatím nebyla plně objasněna. Jádro fotosystému II sinic obsahuje 35 molekul chlorofylu *a*, 2 feofytiny a 12 molekul β -karotenu. Součástí jádra je komplex vyvíjející kyslík „oxygen-evolving complex“ (OEC), který se skládá ze tří částí (OEC33, 23 a 17), které jsou kódovány geny *psbO*, *psbP* a *psbQ*. Tento komplex stabilizuje Mn klastr, který je nezbytný k rozkladu vody, čímž vzniká molekula kyslíku (Caffarri *et al.*, 2009).

Primární funkcí periferních antén je absorpce světla a transfer vzniklé excitační energie do reakčního centra. Tento systém antén obsahuje šest komplexů patřících do multigenní rodiny *LHCB* („light-harvesting complex“), které jsou schopny v různých poměrech vázat chlorofyly *a*, chlorofyly *b* a xantofyly. Produkty genů *LHCB1-3* tvoří trimerní světlosběrné antény LHCI, které jsou organizovány buď jako homotrimery ($(LHCB1)_3$ a $(LHCB2)_3$ nebo heterotrimery $LHCB1/LHCB2/LHCB3$. Další tři podjednotky LHCB6 (alternativně CP24 „chlorophyll *a/b*-binding protein 24“), LHCB5 (CP26) a LHCB4 (CP29) se vyskytují jako monomery. LHCB4 se vyskytuje ve třech isoformách LHCB4.1, LHCB4.2 a LHCB4.3 (označovaná také jako LHCB8). Většinu LHCB4 u nestresovaných rostlin *Arabidopsis* tvoří isoformy LHCB4.1 a LHCB4.2 (Albanese *et al.*, 2016; Caffarri *et al.*, 2009).

S jádry PSII se může asociovat variabilní počet periferních antén za vzniku takzvaných superkomplexů PSII-LHCI. Větší superkomplex se skládá z dimerního jádra „core“ C_2 , dvou „strongly bound“ trimerů LHCI S_2 , které se silně vážou na komplexy CP43 a LHCB5 a dalších dvou „moderately bound“ trimerů LHCI M_2 , vázaných středně silně na komplexy LHCB4 a LHCB6. Tento superkomplex je znám jako $C_2S_2M_2$ (viz Obr. 4). Při absenci LHCB6 může vzniknout menší superkomplex C_2S_2 (Caffarri *et al.*, 2009; Ilíková *et al.*, 2021).



Obrázek 4. Model superkomplexu ($C_2S_2M_2$) PSII z *Arabidopsis thaliana* (podle Van Amerongen & Croce, 2013, upraveno)

2.1.1.2 Superkomplexy fotosystému II

Zvláštní případ nastává u špenátu (*Spinacia oleracea*), kde je superkomplex tvořen občas ještě dvojicí slabě vázaných „loosely bound“ trimerů LHCII (L_2), které jsou vázány s jádrem přes LHCB6 (Kouřil *et al.*, 2011). Tyto slabě vázané trimery mohou být pozorovány také u zelených řas, jako například *Chlamydomonas reinhardtii*, u které vzniká superkomplex ($C_2S_2M_2L_2$). Na rozdíl od suchozemských rostlin u zelených řas není přítomen protein LHCB6, takže jsou L trimery řas připojeny přímo k jádru PSII. Tyto trimery bývávají také označovány jako „naked“ N a superkomplex PSII jako $C_2S_2M_2N_2$ (Tokutsu *et al.*, 2012). Proteiny LHCB3 a LHCB6 se vyskytují specificky pouze u suchozemských rostlin. Nedávná pozorování odhalila, že se tyto dva proteiny nevyskytují ani u smrku ztepilého (*Picea abies*), což vede k rozdílné struktuře superkomplexu. Toto uspořádání se podobá evolučně starším organismům, jako jsou například řasy, které rovněž postrádají protein LHCB6. Protein LHCB3, který je běžně součástí heterotrimeru LHCII typu M, zde byl nahrazen jiným LHCB proteinem (Kouřil *et al.*, 2016).

Superkomplexy fotosystému II většinou nejsou organizovaně uspořádány v membráně tylakoidů gran, ale jak u špenátu (*Spinacia oleracea*) tak u *Arabidopsis thaliana* byly menšinově pozorovány semi-krystalické domény superkomplexů PSII-LHCII. Interakce sousedních vrstev membrány gran ovlivňuje uspořádání superkomplexu PSII-LHCII, což má za následek, že se tyto superkomplexy organizují do specifických úhlů. Tuto makroorganizaci pravděpodobně ovlivňuje protein PsbS, podjednotka S fotosystému II („subunit S of photosystem II“). Vyšší hladina PsbS narušuje tuto krystalickou makroorganizaci superkomplexů PSII-LHCII (Kouřil *et al.*, 2011). Superkomplexy fotosystému II mohou tvořit megakomplexy, které se většinou skládají ze dvou superkomplexů, ke kterým se můžou vázat přídatné LHCII antény (Nosek *et al.*, 2017). Antény LHCII mohou být fosforylovány, čímž nastává změna jejich konformace a přechod k fotosystému I. Tento jev se nazývá stavový přechod („state transition“). Tímto přechodem vzniká superkomplex PSI-LHCII, což umožňuje rovnoměrnější distribuci excitační energie při stresu spojeného s vysokou intenzitou světla (viz např. Kouřil *et al.*, 2005).

2.1.2 Stres nadměrnou intenzitou světla

Množství světla absorbovaného fotosyntetickými organismy často převyšuje množství, které je využitelné pro fotosyntetické reakce. Tato vysoká intenzita způsobuje rychlé nasycení a uzavření reakčních center. Vzniklá přebytečná excitační energie může vést ke tvorbě nebezpečných vedlejších produktů, které působí foto-oxidativní poškození, vedoucí k inhibici fotosyntézy. Fotosyntetická kapacita je pro fotosyntetické organismy různá. V přírodě se množství světla může dramaticky lišit v rámci sekund, dnů nebo ročních období. Efekt stresu nadměrnou intenzitou světla může být umocněn jiným stresovým faktorem, jakým je např. sucho, vysoká teplota, solný stres nebo nedostatek živin. (viz např. Li *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2001; Murchie & Ruban, 2020)

Evoluce fotosyntetickým organismům poskytla řadu řešení problému vysoké intenzity světla, které se liší účinností, úrovní účinku a rychlostí reakce. Tyto regulační mechanismy buď ovlivňují množství světla, které dopadne na fotosyntetické pigmenty, nebo ovlivňují, jak je spotřebována přebytečná excitační energie, která již byla fotosyntetickými pigmenty zachycena. Prvním typem je dlouhodobá aklimace, která probíhá na úrovni transkripce, translace a posttranslačních změn, které vedou ke změně morfologie a organizace fotosystémů. Avšak aklimace nedokáže ochránit rostliny před

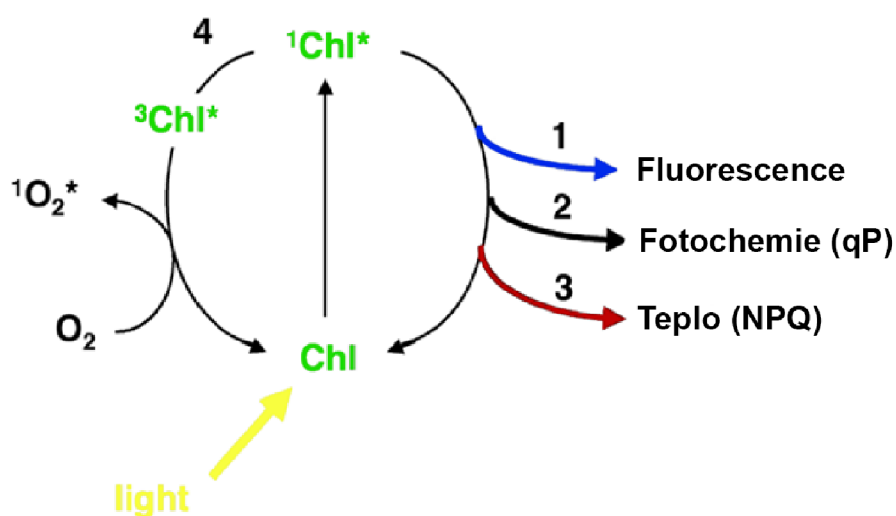
náhlými výkyvy intenzity záření a spotřebovává velké množství energie a zdrojů. Druhým typem je nefotochemické zhášení, což je daleko dynamičtější proces, který probíhá ve světlosběrných anténách a který chrání fotosynteticky aktivní komplexy před foto-poškozením pomocí reorganizace proteinů antén, změny složení pigmentů a disipace excitační energie ve formě tepla (viz např. Ruban, 2016).

Dalším z ochranných mechanismů je pohyb či růst fotosynteticky aktivních částí organismů mimo tuto vysokou intenzitu světla. Fotosyntetické organismy mohou detekovat intenzitu světla pomocí fotoreceptorů. U rostlin a zelených řas existuje několik tříd fotoreceptorů, mezi které patří fototropiny, neochromy, fytochromy, rhodopsiny a kryptochromy. Při nadměrném záření fototropiny a neochromy zodpovídají za pohyb chloroplastů, které jsou natočeny tak, aby světlo dopadalo na co nejmenší plochu chloroplastů. Rhodopsiny u zelených řas řídí fototaxi a foto-fobický pohyb. Kryptochromy u rostlin regulují expresi genů spojených s reakcí na nadměrnou intenzitu záření. Nepřímými způsoby mohou být metabolické signály, které vedou k rychlé fotoprotekci nebo dlouhodobé aklimaci. Takovými signály může být snížení pH lumenu, nárůst redukované formy plastochinonu, nebo produkce reaktivních forem kyslíku ROS „reactive oxygen species“, které narušují biosyntézu chlorofylu (viz např. Li *et al.*, 2009).

2.1.2.1 Cesty absorbované energie

Při absorpci slunečního světla chlorofylem v pigment-proteinových komplexech přechází chlorofyl do excitovaného singletního stavu ($^1\text{Chl}^*$), který může přejít zpět do základního stavu několika způsoby. Excitační energie může být znovu emitována ve formě chlorofylové fluorescence, může být přeměněna na chemickou energii a využita pro reakce fotosyntézy, může být přeměněna na teplo pomocí nefotochemického zhášení (NPQ) nebo může sloužit pro přechod chlorofylu do tripletního excitovaného stavu ($^3\text{Chl}^*$), (viz obr. 5). Tato forma tripletního chlorofylu je nebezpečná, jelikož může předat energii molekulárnímu kyslíku. Molekulární kyslík se standardně vyskytuje ve tripletním stavu ($^3\text{O}_2$), ale při dodání potřebné energie může přejít do vysoce reaktivního singletního stavu ($^1\text{O}_2^*$). $^1\text{O}_2^*$ je jedna z reaktivních forem kyslíku (ROS), která může vést k poškození fotosystémů. Podíl excitační energie, která může způsobovat vznik tripletního chlorofylu se pohybuje mezi 4 % až 25 %. Podíl excitační energie, která je vyzářena fluorescencí, je daleko nižší a pohybuje se mezi 0,6 % až 3 %. Při pokojové

teplotě většina chlorofylové fluorescence pochází z fotosystému II. Podíl energie, která je využita pro neřízené samovolné procesy, jakými jsou fluorescence a stavový přechod chlorofylu, do velké míry závisí na regulovaných procesech de-excitace chlorofylu. První z těchto procesů je fotochemické zhášení „photochemical quenching“ (qP). Při fotochemickém zhášení dochází k aktivaci primárních reakcí fotosyntézy, čímž dochází ke snížení úrovně chlorofylové fluorescence. Druhým procesem je nefotochemické zhášení „non-photochemical quenching“ NPQ (nebo qN), které nevyužitou excitační energii disipuje na teplo. qP a NPQ pomáhají minimalizovat produkci $^1\text{O}_2^*$ v PSII (Müller *et al.*, 2001).



Obrázek 5. Způsoby de-excitace chlorofylu (podle Müller *et al.*, 2001, upraveno)

2.1.2.2 Nefotochemické zhášení

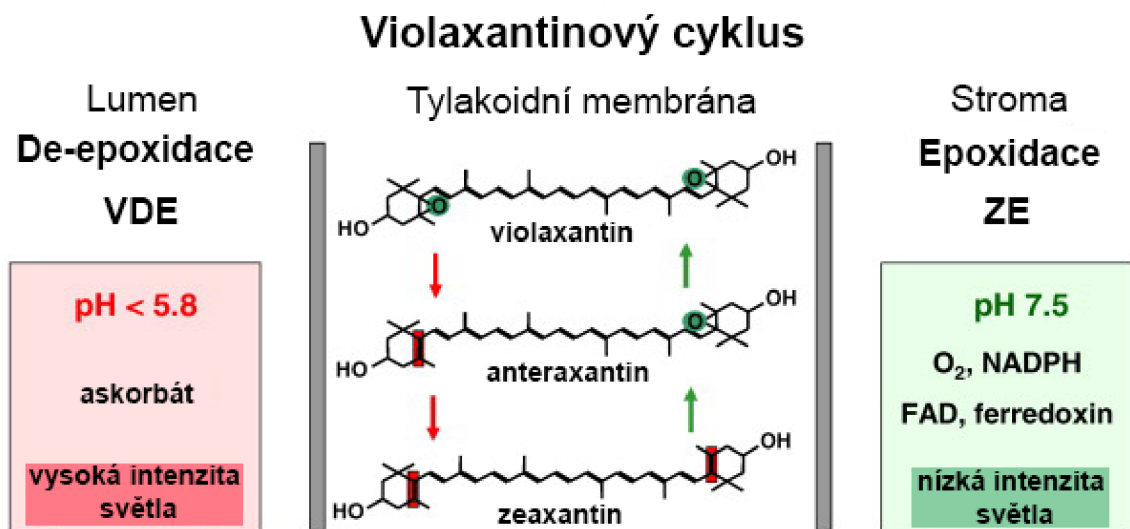
NPQ zahrnuje tři hlavní identifikovatelné komponenty, které se liší mechanismem a rychlostí indukce. Hlavní a nejrychleji regulovatelnou složkou u většiny řas a rostlin je zhášení závislé na energii „energy-dependent quenching“ qE. Druhou složkou je zhášení stavovým přechodem „state-transition quenching“ qT. qT je regulovatelné v rámci minut a je důležitější u řas než u většiny rostlin, kde je při vystavení nadměrnému světlu spíše zanedbatelné. qT nastává při stavovém přechodu odpojením LHCIII antén ze superkomplexu PSII a jejich připojením k PSI. Třetí složkou je fotoinhibiční zhášení „photoinhibitory quenching“ qI. qI souvisí s inhibicí fotosyntézy. Jde o nejméně prozkoumanou komponentu s nejpomalejší indukcí (Müller *et al.*, 2001).

2.1.2.3 Zhášení závislé na energii

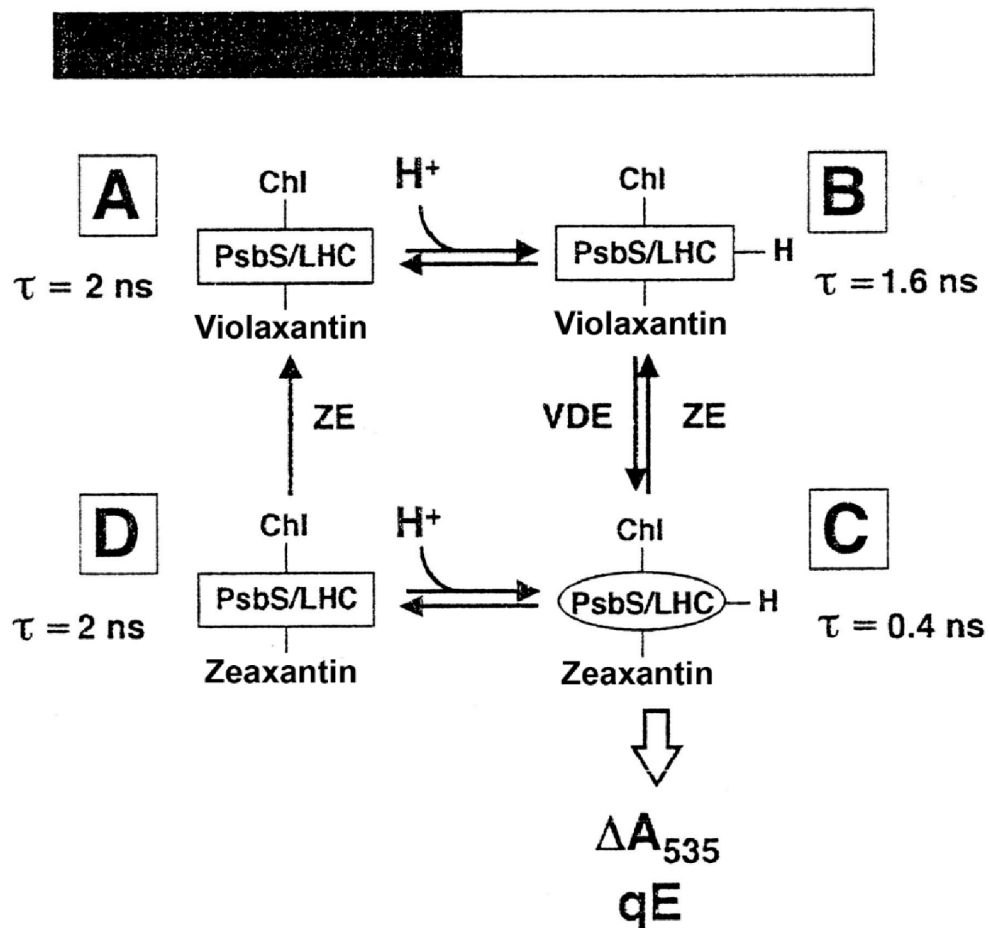
Vyšší intenzita světla má obecně za následek posílení průběhu primárních reakcí fotosyntézy. Produkty těchto reakcí nejsou kompletně spotřebovány pro syntézu sacharidů kvůli omezené rychlosti fixace CO₂. To vede ke změně toku elektronů na fotosystémech z lineárního, při kterém dochází ke štěpení vody a tvorbě NADPH, na cyklický kolem PSI, který vede ke zvýšenému transportu protonů do lumenu tylakoidu za účelem produkce ATP. Tím dochází k okyselení lumenu a zvětšuje se rozdíl mezi pH lumenu a stromatu, ΔpH. Tento pokles pH lumenu spouští qE v řádu sekund. Tento systém je dostatečně citlivý, aby umožnil ochranu nebo optimalizaci funkce fotosystémů při přirozených výkyvech intenzity světla během dne. Tento mechanismus byl prokázán pomocí experimentů s mutanty s defektním elektronovým transportem nebo při použití nigericinu, který narušuje acidifikaci lumenu tylakoidů. V obou případech byla pozorována inhibice qE. Indukce qE pomocí nízkého pH lumenu může být dosaženo i ve tmě přidáním kyselého pufru. Mechanismus indukce qE spočívá v protonaci LHC komplexů, v interakci proteinu PsbS s LHC komplexy a v navázání zeaxantinu (antheraxantinu) na LHC komplexy. ΔpH indukuje qE přímo protonací antén a proteinu PsbS a aktivací enzymu xantofylového cyklu, violaxantin deepoxidázy. Tyto reakce vedou ke konformačním změnám antény, ve které vzniklý ¹Chl* má krátkou dobu života, takže nedochází k inter-systémovému přechodu (Müller *et al.*, 2001; Ruban, 2016).

Existují dva hlavní typy xantofylových cyklů. Prvním je diadinoxantinový cyklus, který se vyskytuje např. u rozsivek a ve kterém je diadinoxantin přeměňován na dianoxantin. Druhým cyklem je violaxantinový cyklus, který se vyskytuje u zelených a hnědých řas a u rostlin. U tohoto cyklu dochází k přeměně violaxantinu na zeaxantin přes anteraxantin pomocí enzymu violaxantin deepoxidázy (VDE). VDE je aktivována při snížení pH lumenu. Při zvýšení pH je zeaxantin opětovně přeměňován na violaxantin pomocí enzymu zeaxantin epoxidázy (ZE) (viz obr. 6). Jak zeaxantin, tak anteraxantin mají schopnost se vázat na protonované antény PSII a tím vyvolávat konformační změny těchto antén, které indukují qE. Dalším xantofylem, který má schopnost ovlivňovat qE u rostlin a řas je lutein, který vzniká činností lykopen ϵ -cyklázy. U mutantů *Chlamydomonas* nebo *Arabidopsis*, kterým chyběla schopnost produkce zeaxantinu i luteinu nebylo pozorováno snížené qE. Při snížení pH lumenu mohou být pozorovány dvě změny absorbance spojené s qE. První nastává při 505 nm a je způsobena přeměnou violaxantinu na zeaxantin. Druhá nastává při 535 nm a souvisí s konformační změnou antén PSII. Tato změna absorbance nebyla pozorována u mutantů s absencí PsbS. Nízké pH umožňuje protonaci proteinu PsbS, který interaguje s LHCI. To vedlo k původní domněnce, že je protein PsbS nezbytný při konformační změně antén PSII. Novější studie ukázaly, že antény mohou být protonovány i přímo bez přítomnosti PsbS (Müller *et al.*, 2001; Johnson & Ruban, 2010; Ruban, 2016).

Pokud záření nepřesahuje kapacitu fotosyntézy, LHC antény nejsou protonovány a mají navázaný violaxantin. Tento stav je optimální pro sběr světla a transfer excitační energie do reakčního centra. Doba života excitovaných chlorofylů této antény je kolem 2 ns. V případě, že záření přesáhne fotosyntetickou kapacitu, během několika sekund dochází ke snížení pH a protonaci LHC antén. Doba života excitovaného chlorofylu v těchto protonovaných anténách je snížena na 1,6 ns. Při snížení pH dochází dále k tvorbě zeaxantinu, který se váže na LHC antény za vzniku zhášecího komplexu (viz Obr. 7). Doba života excitovaného chlorofylu v zhášecím komplexu je pouze 0,4 ns, což zabraňuje reakcím jako mezi-systémový přechod. Při opětovném snížení intenzity světla pH lumenu roste, čímž dochází k deprotonaci antén a přeměně zeaxantinu na violaxantin (Müller *et al.*, 2001).



Obrázek 6. Schéma violaxantinového cyklu (VDE: violaxantin deoxydáza, ZE: zeaxantin epoxydáza) (podle Jahns *et al.*, 2009, upraveno)



Obrázek 7. Schéma zhašecího cyklu: (A) LHC anténa s violaxantinem (ve tmě), (B) protonovaná LHC anténa s violaxantinem (na světle), (C) zhašecí komplex (protonovaná LHC anténa s zeaxantinem), (na světle), (D) LHC anténa s zeaxantinem (ve tmě) (podle Müller *et al.*, 2001, upraveno)

2.1.2.4 Role periferních antén v nefotochemickém zhášení

Přesná část PSII zodpovědná za NPQ byla dlouho neznámá. Prvními kandidáty byly proteiny LHCB1-6, které měly schopnost vázat zeaxantin a schopnost zhášení v *in vitro* podmínkách (Horton *et al.*, 1996). Pro studium rolí těchto proteinů byly připraveny „knockout“ mutantní linie s absencí jednotlivých *LHCB* genů korespondujících s absencí daných proteinů. U knockout mutantů *lhcb1* a *lhcb2* byla pozorována snížená kapacita pro NPQ, změněná struktura gran a obecně nižší vitalita (Andersson *et al.*, 2003). Zatímco mutanti *lhcb4* a *lhcb5* vykazovali zanedbatelné změny oproti divokému typu (Andersson *et al.*, 2001). U mutantu *lhcb6* byla popsána narušená schopnost pro NPQ a narušená schopnost tvořit superkomplex C₂S₂M₂ (Kovács *et al.*, 2006).

Důležitým faktorem při qE je přítomnost proteinu PsbS, zeaxantinu a luteinu. PsbS a zeaxantin působí jako alosterické efekторы při navázání na LHCB proteiny a můžou způsobit konformační změnu. Při přípravě mutantů neschopných produkce PsbS, zeaxantinu a luteinu bylo zjištěno, že ztráta luteinu mírně snižuje kapacitu NPQ, zatímco PsbS a zeaxantin jsou esenciální pro qE. Pro zjištění důležitosti minoritních antén v qE byl připraven mutant *NoM* s absencí genů *LHCB4.1*, *LHCB4.2* a *LHCB5*. Tento mutant nevykazoval sníženou kapacitu NPQ, ale byl u něj pozorován odlišný průběh kinetiky NPQ s pomalejší indukcí (Dall'Osto *et al.*, 2017).

Jelikož absence minoritních monomerních antén neovlivnila kapacitu pro NPQ byl připraven mutant *NoLHCII* bez trimerních LHCII antén. Tento mutant byl připraven odstraněním pouze genů *LHCB1* a *LHCB2* (*LHCB3* není schopen tvořit homotrimery na rozdíl od předchozích dvou genů). U mutantu *NoLHCII* bylo pozorováno snížení kapacity pro NPQ až o 90 %. Jako zdroj zbytkového zhášení byly navrženy interní antény CP43 a CP47 a především *LHCB4*, které by mohly interagovat s PsbS (Nicol *et al.*, 2019; De Bianchi *et al.*, 2011). Současná literatura prezentuje, že za dosažení 100% kapacity NPQ divokého typu zodpovídají pouze antény LHCII. Toto bylo podpořeno v experimentu, při kterém byl vytvořen mutant postrádající minoritní antény, PsbS a zároveň byla potlačena syntéza jader PSII. Tento mutant obsahoval majoritně antény LHCII a vykazoval stejnou celkovou kapacitu NPQ jako divoký typ (Johnson, 2020).

2.1.2.5 Role antén LHCB5 a LHCB6 v nefotochemickém zhášení

Protein LHCB5 (CP26) se většinou nachází v superkomplexech PSII rostlin nebo řas, zatímco protein LHCB6 (CP24) je typický pouze pro rostliny. Tyto proteiny mohou mít v různých organismech rozdílné funkce. U mechu *Physcomitrella patens* je LHCB5 zodpovědný za částečnou regulaci abiotického stresu. Mutanti *Physcomitrella patens lhcb5* vykazovali změněnou organizaci tylakoidních membrán, defektní fenotyp a sníženou schopnost NPQ (Peng et al., 2019). V případě řasy *Chlamydomonas reinhardtii* jsou LHCB5 a LHCB4 nezbytné pro NPQ. Tyto dva proteiny jsou totiž klíčové pro stavový přechod (qT), což je u řas klíčová komponenta NPQ. U mutanta *lhcb5* této řasy nebyl detekovaný kromě proteinu LHCB5 ani protein LHCB4, který pravděpodobně nemohl stabilně nasednout na jádro PSII (Cazzaniga et al., 2019).

Ve vyšších rostlinách může dojít k navázání zeaxantinu na alosterické místo L2 proteinu LHCB5. To vede ke konformační změně, což vede k NPQ podobně jako u LHCI. Toto zhášení není závislé na ΔpH . (Gao et al., 2020; Dall'Osto et al., 2005; Ballottari et al., 2010).

U vyšších rostlin jako je *A. thaliana* ovlivňují proteiny LHCB5 a LHCB6 především průběh indukce NPQ. V případě mutanta *lhcb5* byly pozorovány mírně nižší hodnoty NPQ a bylo pozorováno pomalejší navození finální úrovně NPQ (Andersson et al., 2001). V případě mutanta *lhcb6* se namísto $C_2S_2M_2$ častěji vyskytovaly superkomplexy PSII C_2S_2 . Většina těchto superkomplexů C_2S_2 byla u mutanta *lhcb6* uspořádána do takzvaných krystalových polí „crystalline arrays“. Tyto pole tvoří u *lhcb6* 60 % - 90 % plochy tylakoidních membrán. Kvůli špatné vazbě přídavných LHCI (M_2) k PSII vznikají „loosely bound“ LHCI, které jsou schopny přenášet excitační energii na krystalické pole a tím kompenzovat menší velikost PSII superkomplexů *lhcb6*. Krystalová pole mohou vznikat i u divokého typu, ale jsou tvořena $C_2S_2M_2$ a jejich výskyt je minimální. V případě *lhcb6* tato pole negativně ovlivňují transport plastochinonu z PSII na cytochrom b_6f komplex, čímž je narušen transport elektronů z PSII na PSI. Dále má tato organizace superkomplexů PSII za následek narušenou schopnost tvořit protonový gradient a tím pádem i pomalejší indukci qE (Kovács et al., 2006; De Bianchi et al., 2008; Ilíková et al., 2021).

Ve studii De Bianchi *et al.*, 2008 byly studovány mutantní linie *lhcb5* i *lhcb6* a dvojitý mutant *lhcb5lhcb6*. Při tomto experimentu byl pozorován výrazně menší fenotyp u mutantu *lhcb6* oproti divokému typu. Chloroplasty mutantu *lhcb6* netvořily škrobová zrna. Mutant *lhcb6* vykazoval snížené hodnoty NPQ. Tyto nízké hodnoty se vrátily na úroveň divokého typu v případě dvojitého mutantu *lhcb5lhcb6*. U tohoto dvojitého mutantu byla pozorována pomalejší indukce NPQ podobně jako u *NoM* mutantu (De Bianchi *et al.*, 2008), zatímco u mutantu *lhcb6* nebyla pozorována žádná pomalejší fáze NPQ. Tento jev byl interpretován tak, že při odstranění obou monomerních antén, trimerní antény nasedaly přímo na jádro PSII, ale v případě *lhcb6* bylo toto místo blokováno anténou LHCB5. Tyto výsledky a závěry byly následně vyvráceny ve studii Ilíková *et al.*, 2021. V tomto případě byl fenotyp *lhcb6* srovnatelný s divokým typem. Rozdíl v hodnotách NPQ mezi mutantem *lhcb6* a divokým typem nebyly významné, ale byla jasně pozorovatelná pomalejší indukce NPQ u *lhcb6*. Rozdíl byl dán s největší pravděpodobností rozdílnými podmínkami pěstování především vlhkostí, což znamená, že mutant *lhcb6* nebyl ve studii De Bianchi *et al.*, 2008 pozorován při nestresových podmínkách.

2.2 Aklimace rostlin na různé intenzity světla

Při dlouhodobé změně intenzity záření dochází ke změně složení světlosběrných pigmentů, k reorganizaci superkomplexu PSII nebo k změně morfologie plastidů, listů nebo celé rostliny. Pro studium těchto změn jsou rostliny aklimovány na předem definované intenzity světelného záření. Tyto intenzity se většinou nazývají jako „low light“ (LL) nízká intenzita světla, „normal light“ (NL) standardní intenzita světla, „high light“ (HL) vysoká intenzita světla. Hodnoty těchto intenzit jsou většinou $20 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pro LL, $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pro NL, $800\text{-}1100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pro HL (Schumann *et al.*, 2017; Kouřil *et al.*, 2013).

K změnám poměru pigmentů, jako například poměr chlorofylů *a/b*, dochází kvůli změně velikosti superkomplexů. Protože chlorofyl *b* obsahují pouze LHC proteiny, při ztrátě takového proteinu poměr chlorofylů *a/b* vzroste. U rostlin *Arabidopsis* pěstovaných na NL je celkový poměr LHCB/PSII=4,8 a poměr chl *a/b*= 3,0. U rostlin aklimovaných na HL je podíl LHCB proteinů nižší (LHCB/PSII=3,8), za současného poklesu obsahu LHCB6 a LHCB3 (až o 50 %), a poměr chl *a/b* je 3,4. U rostlin aklimovaných na LL, které mají naopak vyšší zastoupení větších superkomplexů PSII (LHCB/PSII=7,4), je

poměr chl $a/b = 2,7$ za současného nárůstu obsahu LHCB6 a LHCB3 (Kouřil *et al.*, 2013). Proteiny LHCB4.3 a PsbS jsou více zastoupeny u HL rostlin a méně zastoupeny u LL rostlin (Albanese *et al.*, 2016). Při vyšší intenzitě světla roste kromě poměru a/b také množství PSII, cytochromu b_6/f komplexu a ATP-syntázy vůči PSI. Složení PSI se při aklimaci různou ozářeností nemění (Štroch *et al.*, 2022).

Dalšími typickými znaky HL rostlin oproti LL rostlinám je větší tloušťka listů s více vrstvami buněk, větší množství chloroplastů na buňku se sníženou organizací tylakoidů do gran, vyšší obsah β -karotenu a xantofylů, vyšší poměr PSII/PSI, vyšší kapacita pro asimilaci CO_2 , rychlejší elektronový transport a vyšší kapacita pro NPQ. Při použití přirozeně fluktuujícího světla k aklimaci vzniká fenotyp rostlin podobný HL fenotypu, přičemž má menší růžici a tloušťku listů, a vyšší kapacitu pro NPQ (Schumann *et al.*, 2017).

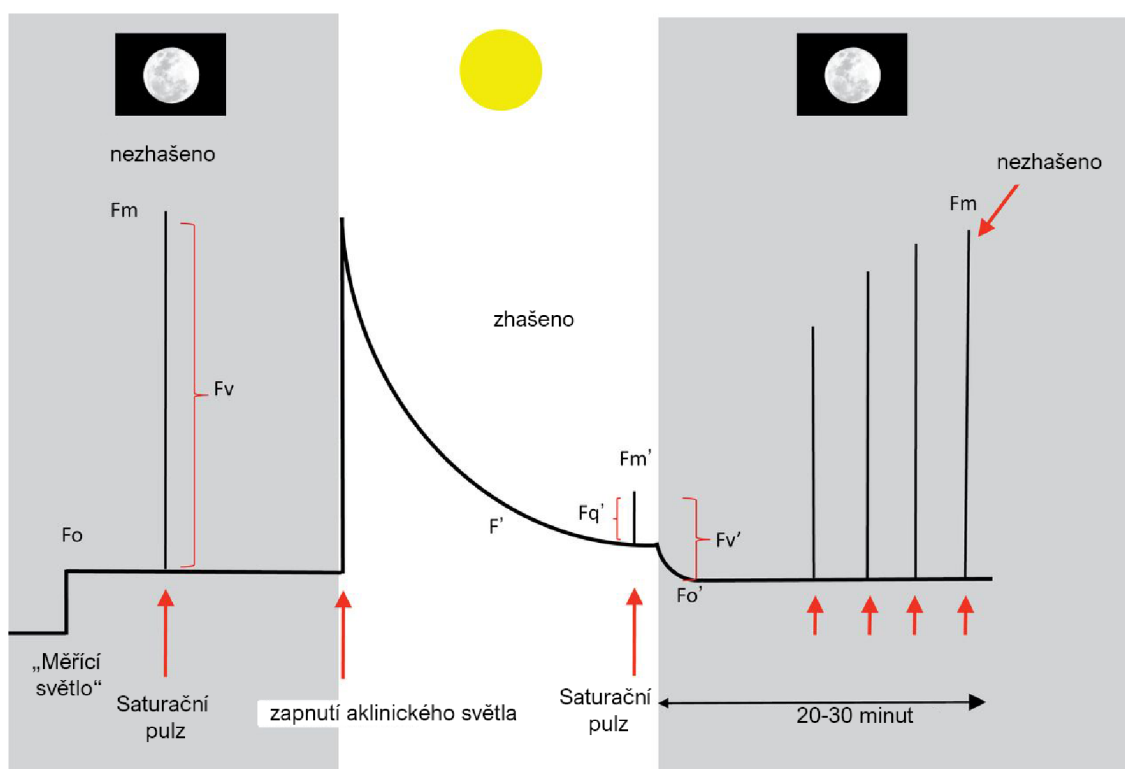
2.3 Metody měření indukce chlorofylové fluorescence

Metody využívající chlorofylovou fluorescenci jsou velmi oblíbené v oblasti rostlinné fyziologie, protože poskytují detailní informace o funkčnosti fotosystému PSII. Tyto metody jsou nenáročné, neinvazivní a levné. Světelná energie absorbovaná pigmenty může být využita ve fotochemii, může být vyzářena jako světelná emise (fluorescence) nebo může být disipována na teplo (NPQ). Tyto procesy jsou si navzájem kompetiční, tím pádem měřením intenzity fluorescence můžeme získat cenné informace o procesech fotochemie a nefotochemického zhášení. Tyto techniky musí probíhat v zatemněných prostorech, aby mohly být slabé emise chlorofylové fluorescence pozorovány (Murchie & Lawson, 2013; Fernandez-Jaramillo *et al.*, 2012).

2.3.1 Základní fotosyntetické parametry

Jednou z nejpoužívanějších technik měření indukce chlorofylové fluorescence je fluorescenční technika s pulzní amplitudovou modulací (PAM). Při měření indukce chlorofylové fluorescence jsou využity rostliny adaptované na tmu. V tomto stavu nedochází k žádnému transportu elektronů na tylakoidní membráně a všechna reakční centra PSII rostlin jsou takzvaně „otevřená“. Na tyto rostliny je nej dříve použito takzvané měřící světlo, které je dost slabé, aby nespustilo fotochemické reakce a dost silné, aby vyvolalo měřitelnou fluorescenci. Parametrem této minimální fluorescence je F_0 . Po změření F_0 je na rostlinu aplikován saturační pulz s vysokou intenzitou (v trvání 0,5 - 1,0 s). Energie tohoto pulzu je dostatečná, aby satureovala všechna reakční centra PSII,

takže jsou „uzavřené“. U zdravých rostlin při tomto pulsu nedochází k indukci NPQ, protože ho rostliny v tak krátkém čase nejsou schopné indukovat. V tomto stavu není absorbovaná energie využita ani pro NPQ, ani pro fotochemii, tudíž dochází k takzvané maximální fluorescenci (F_M). Rozdíl mezi F_0 a F_M je variabilní fluorescence (F_V). Po naměření těchto hodnot je zapnuto aktinické světlo, které je využitelné pro fotosyntézu. Po zapnutí tohoto světla nastává nárůst intenzity fluorescence, který je rychle potlačen v důsledku rostoucí konkurence s fotochemickými a nefotochemickými jevy. Dochází k ustálení hladiny fluorescence, což je označováno jako „steady-state“. Parametr označující hladinu fluorescence v tomto stavu je F' . Následuje další saturační pulz, při kterém je změřena hodnota F_M' . Po tomto saturačním pulzu je opětovně zapnuto „měřící světlo“ a hodnota naměřené fluorescence se nazývá F_0' . Následně je aktinické světlo vypnuto a periodicky se střídají saturační pulzy a měření „měřícím světlem“ (viz Obr. 8), (Murchie & Lawson, 2013; Ruban, 2016).



Obrázek 8. Schéma průběhu měření indukce chlorofylové fluorescence pomocí metody PAM, parametry na obrázku jsou vysvětleny v textu (viz kapitola: 2.3.1) (podle Murchie & Lawson, 2013, upraveno)

Z naměřených hodnot fluorescence je možné vypočítat definované parametry vypovídající o aktivitě PSII. Tyto parametry jsou získány buď z měření pomalé kinetiky indukčního jevu, které trvá desítky minut a využívá aktinické světlo, nebo rychlé kinetiky indukčního jevu (OJIP křivka, viz Obr. 9), což znamená měření intenzity fluorescence během prvního saturačního pulzu. Rychlá kinetika indukčního jevu může být měřena pomocí přístroje PEA („Plant Efficient Analyzer“). Tento přístroj poskytuje kromě parametrů F_0 a F_M i parametry F_J a F_I . F_J je fluorescence naměřená 2 ms po zapnutí saturačního pulsu obdobně je F_I fluorescence 30 ms po zapnutí saturačního světla. Z F_J a F_I můžou být spočítány relativně variabilní fluorescence V_J a V_I . Z takto naměřených parametrů můžou být vypočítán například maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII u zatemněných rostlin (F_V/F_M) nebo energetický tok vztažený na jedno reakční centrum (TR_0/RC). Parametr TR_0/RC koreluje s absorpčním průřezem PSII (Moosavi-Nezhad *et al.*, 2021). U nestresovaných listů je hodnota poměru F_V/F_M kolem 0,83 (Murchie & Lawson, 2013). Při stresu může být hodnota F_V/F_M snížena. *Arabidopsis* má vysokou schopnost přizpůsobit se různým světelným podmínkám, což vede pouze k mírnému snížení hodnoty F_V/F_M . V případě aklimace na LL byla tato hodnota snížena na 0,78. Tato nižší hodnota F_V/F_M u LL rostlin může být vysvětlena výskytem větších superkomplexů PSII vzniklým navázáním dalších LHCI antén. Tyto přídavné LHCI antény jsou ke zbytku komplexu slabě vázány, což vede k pomalejšímu transportu energie do RC a tím i k nižšímu F_V/F_M (Štroch *et al.*, 2022).

Definice parametrů (V_J , V_I , V , F_V/F_M , TR_0/RC) viz např. (Murchie & Lawson, 2013; Moosavi-Nezhad *et al.*, 2021):

$$V_J = (F_J - F_0) / (F_M - F_0)$$

$$V_I = (F_I - F_0) / (F_M - F_0)$$

$$V = (F - F_0) / (F_M - F_0)$$

$$F_V/F_M = (F_M - F_0) / F_M$$

$$TR_0/RC = (dV/dt)_0 / V_J$$

Měření pomalé kinetiky indukčního jevu je provedeno pomocí metody PAM, která je uvedena výše. Z měření získaných PAM metodou můžou být vypočítány parametry jako například efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII u osvětlených

rostlin (ϕPSII) (alternativně $Y(\text{II})$), fotochemické zhášení ($q\text{P}$) a nefotochemické zhášení (NPQ). $Y(\text{II})$ udává podíl absorbovaného světla, který se skutečně používá ve fotochemii PSII, a lze jej tedy použít k odhadu rychlosti transportu elektronů přes PSII. Fotochemické zhášení ($q\text{P}$) udává podíl otevřených reakčních center. Může být také použit k indikaci indukce fotoinhibice. Nefotochemické zhášení (NPQ) bývá taky označováno jako Stern-Volmerův typ nefotochemického zhášení fluorescence.

Definice parametrů ($Y(\text{II})$, $q\text{P}$, NPQ) viz např. (Murchie & Lawson, 2013; Ruban, 2016):

$$\phi\text{PSII} = Y(\text{II}) = (F_M' - F) / F_M'$$

$$q\text{P} = (F_M' - F) / (F_M' - F_0')$$

$$\text{NPQ} = (F_M - F_M') / F_M'$$

Metoda PAM je schopná stanovit i aktivitu PSI měřením kinetiky absorpce P700. Toto měření poskytuje možnost zjištění účinnosti lineárního toku elektronů mezi PSII a PSI, jelikož P700^+ se akumuluje při nedostatečném toku elektronů z PSII. Signál P700 (P) je zaznamenán těsně před saturačním pulzem, poté krátce po nástupu saturačního pulzu (P_M'), kdy je pozorována maximální oxidace P700. Po každém saturačním pulzu následuje 1 s tmy (stanovení P_0). Signály P a P_M' jsou vztaženy k P_0 . Z měření získaných hodnot absorpance P700 můžou být vypočítány parametry - efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSI u osvětlených rostlin (ϕPSI), alternativně $Y(\text{I})$, kvantový výtěžek nefotochemické disipace energie v reakčních centrech PSI, která jsou omezená kvůli nedostatku elektronů $Y(\text{ND})$ (omezení na donorové straně), kvantový výtěžek nefotochemické disipace energie reakčních center PSI, která jsou omezená kvůli nedostatku akceptorů elektronů $Y(\text{NA})$ (omezení na straně akceptoru) (Pfündel *et al.*, 2008).

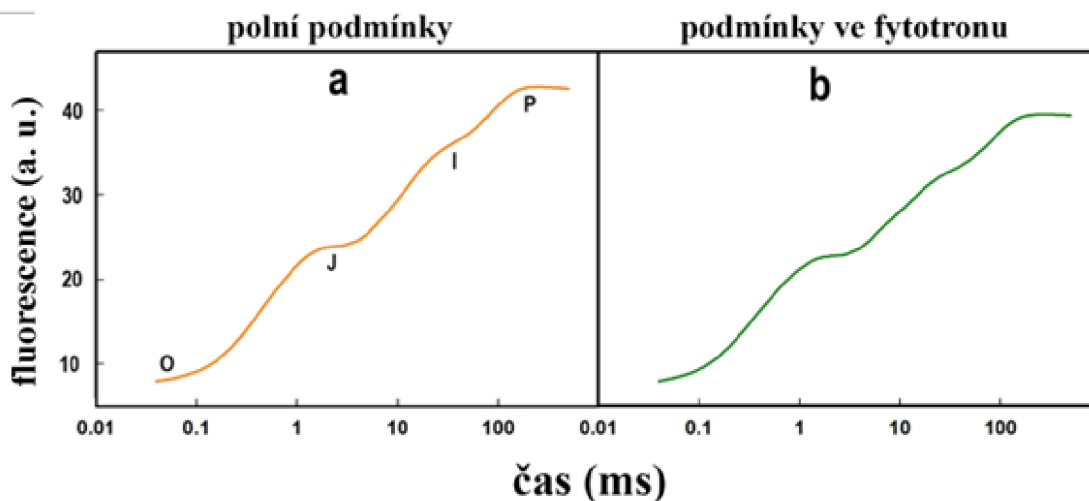
Definice parametrů ($Y(\text{I})$, $Y(\text{ND})$, $Y(\text{NA})$) viz např. (Pfündel *et al.*, 2008):

$$\phi\text{PSI} = Y(\text{I}) = (P_M' - P) / P_M$$

$$Y(\text{ND}) = (P - P_0) / P_M$$

$$Y(\text{NA}) = (P_M - P_M') / P_M$$

$$Y(\text{I}) + Y(\text{ND}) + Y(\text{NA}) = 1$$



Obrázek 9. Křivky indukce fluorescence Chl a (OJIP) u rýže za dvou různých podmínek růstu. (a) polní podmínky, (b) podmínky ve fytotronu, podle (podle Khan *et al.*, 2021, upraveno)

2.4 Motivace bakalářské práce

Nedávné výzkumy prokázaly, že monomerní LHCB komplexy nejsou esenciální pro nefotochemické zhášení (Nicol *et al.*, 2019), což zpochybňuje závěry některých dříve publikovaných studií, které prezentovaly hypotézu, že pro zhášení qE je nutný komplex LHCB6 (Kovács *et al.*, 2006). V navazující studii byl popsán mutant *lhcb6*, který vykazoval narušenou schopnost pro nefotochemické zhášení a menší fenotyp. Avšak v případě dvojitého mutantu *lhcb5lhcb6* byl pozorován částečný návrat k fenotypu a hodnotám NPQ divokého typu (De Bianchi *et al.*, 2008). V nedávné studii nebyl u mutantu *lhcb6* pozorován ani zřetelně horší fenotyp, ani výrazně snížené hodnoty NPQ oproti divokému typu (Ilíková *et al.*, 2021). Tato studie vyvrátila výrazné zhoršení životaschopnosti *lhcb6* pozorované v předchozí studii De Bianchi *et al.*, 2008 a naznačila, že toto zhoršení bylo dáno neideálními pěstebními podmínkami, které působily stres. Cíl této práce je zopakovat část experimentů ze De Bianchi *et al.*, 2008 za podmínek z Ilíková *et al.*, 2021, především měření a vyhodnocování indukce chlorofylové fluorescence u mutantních linií *lhcb5* a *lhcb6* a na dvojitém mutantu *lhcb5lhcb6*. Část těchto mutantů bude aklimována na různé světelné intenzity, což může odhalit schopnost mutantů zvládat stres z nepříznivých světelných podmínek.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Rostlinný materiál

- *Arabidopsis thaliana* – ekotyp Columbia (Col-0)

T-DNA inzerční mutanti rostlin *A. thaliana*:

- *lhcb6* – (SALK_077953)
- *lhcb5* – (SALK_014869)
- *lhcb5lhcb6* – dvojitý mutant vzniklý křížením inzerčních mutantů *A. thaliana*:
lhcb5 a *lhcb6*

3.1.2 Chemikálie

- destilovaná voda
- etanol 96% (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)
- aceton (Carl Roth GmbH + Co, Německo)
- MgCO₃ (PENTA s.r.o., Česká republika)
- kapalný dusík

3.1.3 Technický materiál

- Centrifuga 5420 (Eppendorff, Německo)
- DUAL-Pam-100 (Walz, Německo)
- PEA meter (Hansatech, Velká Británie)
- Fytotron (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)
- Mikrozkuhavky (Eppendorff, Německo)
- Sada automatických pipet (Nichipet, USA)
- Hlubokomrazicí box CryoCube F440n (Eppendorf, Německo)
- Analytické váhy (Scaltec Instruments GmbH, Německo)
- Chytrý telefon (Samsung Galaxy A52s 5G) s fotoaparátem (Samsung Electronics, Jižní Korea)
- Dvoupaprskový UV-VIS spektrofotometr UV 550 (Unicam, Velká Británie)
- Další pomůcky: pinzety, špachtličky, papírové ubrousky, tloučky, třecí misky, odměrné zkuhavky, odměrný válec, Popisovací PVC fólie A4, fixy, nůžky

3.1.4 Softwarové vybavení

- Microsoft Excel (MS Office, USA)
- ImageJ (online)
- Origin (OriginLab Corporation, USA)
- Biolyzer (Laboratory of bioenergetics, University of Geneva, Švýcarsko)

3.2 Metody

3.2.1 Rostlinný materiál a podmínky pěstování

V experimentální části této práce byly využity rostliny *Arabidopsis thaliana*. Pro tuto práci byly použity rostliny divokého typu („wild type“, WT; ekotyp Columbia, Col-0), mutantní linie s inzerací v genu pro světlosběrnou anténu LHC_{B5} (CP26) (*lhcb5*), mutantní linie s inzerací v genu pro světlosběrnou anténu LHC_{B6} (CP24) (*lhcb6*) a dvojitý mutant s inzerací v genech *LHC_{B5}* a *LHC_{B6}* (*lhcb5lhcb6*). Tento dvojitý mutant byl připravený zkřížením individuálních mutantů *A. thaliana* s inzerací v genu *LHC_{B5}* (*lhcb5*) a s inzerací v genu *LHC_{B6}* (*lhcb6*) v rámci jiného projektu (Ilík *et al.*, nepublikované výsledky).

Pro stratifikaci byla den před výsevem semena umístěna do mikrozkmavek s vodou při teplotě v 5–7 °C. Semena byla vysázena do květináčů na půdní substrát, táč s květináči byl přikryt potravinářskou fólií a přenesen do fytotronu. Pěstování ve fytotronu probíhalo při podmínkách: 21 °C, 65% vlhkost, den – 8 h, intenzita světla: 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; noc – 16 h tma. Po 4 týdnech od výsevu byla změněná intenzita světla. na 1) 800 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ („high light“, HL), 2) 20 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ („low light“, LL), 3) nebo byly rostliny ponechány na intenzitě 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ („normal light“, NL).

3.2.2 Měření fotosyntetických parametrů

3.2.2.1 Dual-PAM

Pro měření fotosyntetických parametrů fotosystémů (ϕPSII , q_p , NPQ, ϕPSI , Y(ND), Y(NA), definice parametrů viz kap. 2.3.1) byl využit přístroj Dual-PAM-100. Tento přístroj je schopen měřit aktivitu PSII měřením pomalého fluorescenčního indukčního jevu. Dále je tento přístroj schopen měřit i změny absorbance chlorofylů P700, ze kterých je určována aktivita PSI. Měřené rostliny byly 6 týdnů staré. Tyto rostliny byly odebrány z fytotronu v denní fázi fotoperiody a před měřením byly rostliny na 30 minut zatemněny.

Pro samotné měření byl z rostlin využit odstřižený list, který byl umístěn mezi hlavice přístroje a po dobu měření byl řápk listu namočen ve vodě. Pro měření byly využity tři druhy světla s různými intenzitami: modulační měřící světlo s intenzitou $24 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, aktinické světlo s intenzitou $800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a saturační pulzy s intenzitou $10000 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. V první minutě bylo zapnuté pouze měřící světlo a po 10 s a 30 s byly aplikované saturační pulzy trvající 300 ms. 60 s po začátku měření bylo zapnuto aktinické světlo a byl aplikován saturační pulz. Následně byly saturační pulzy aplikovány každých 60 s až do konce měření (do 1800 s). Aktinické světlo bylo zapnuto od 60 s do 900 s, od 900 s po 1800 s bylo aktinické světlo vypnuto. Fotosyntetické parametry fotosystémů byly měřeny i pro hodnoty intenzity aktinického světla $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a $1200 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.2.2.2 PEA meter („Plant Efficiency Analyzer“)

Pro měření parametrů jako minimální fluorescence (F_0), maximální fluorescence (F_M), fluorescence naměřená 2 ms po zapnutí saturačního pulsu (F_J), fluorescence naměřená 30 ms po zapnutí saturačního pulsu (F_I) a z nich odvozený maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (F_v/F_M) a energetický tok vztažený na jedno reakční centrum PSII (TR_0/RC) byl využit přístroj PEA meter (definice parametrů viz kap. 2.3.1). Některé z těchto parametrů byly vypočítány pomocí programu Biolyzer. Měření přístrojem PEA meter probíhalo opět na 6 týdnů starých rostlinách, který byly půl hodiny před začátkem měření zatemněny. Pro toto měření byl list rostliny přichycen klipem, na který byla přiložena hlavice přístroje. Pro měření bylo využito světlo o intenzitě $4000 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ po dobu 5 s.

3.2.3 Izolace pigmentů

Pro izolaci pigmentů byly z 6 týdnů starých rostlin odebrány listy. Tyto listy byly na rostlinách přítomny ještě před aklimací. Tyto listy byly zváženy a obkresleny na folii pro určení plochy. Folie byly naskenovány a plocha byla vyhodnocována v programu ImageJ. Listy byly vloženy do mikrozkušavek, které byly ponořeny do kapalného dusíku a následně byly uchovávány v $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Následně byly listy homogenizovány ve třecí misce s 80% acetonem a špetkou MgCO_3 . Touto procedurou došlo k narušení pletiva a uvolnění pigmentů do 80% acetonu. Tato suspenze byla centrifugována při 5000 g po dobu 10 minut. Supernatant byl odlit do odměrné zkumavky, odkud byl odečten jeho objem. Následně byla změřena absorbance roztoku pigmentů při vlnových délkách 470 nm

(absorpční maximum karotenoidů), 646,8 nm (absorpční maximum chlorofylu *b*), 663,2 nm (absorpční maximum chlorofylu *a*) a 750 nm (pozadí) pomocí dvoupráskového fotospektrometru. Jako „blank“ byla využita kyveta s 80% acetonem. Při izolaci pigmentů z rostlin pěstovaných na HL byla při centrifugaci zvýšena rychlost otáčení na 6000 g a vzorky bylo nutné ředit. Množství pigmentů bylo vypočítáno z naměřených absorbancí roztoků pigmentů pomocí Lichtenthalerových rovnic (Lichtenthaler, 1987).

3.2.4 Validace inzerčních mutantů

Validace linií *lhcb5* (SALK_014869) a *lhcb6* (SALK_077953) a dvojitého mutantu *lhcb5lhcb6* byla provedena Mgr. Terezou Vánskou pomocí imunologické analýzy metodou „Western blot“. Pro tuto validaci byl použit upravený protokol z (Ílíková *et al.*, 2021). Rostliny *A. thaliana* byly pěstovány ve fytotronu (Weiss Gallenkamp, Velká Británie) při 22 °C s fotoperiodou 8h světlo/16h tma (intenzita světla 120 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a 60% vlhkost. Pro validaci byly použity rostliny staré 6 týdnů. Následně byly z rostlin izolovány tylakoidní membrány pomocí protokolu popsaného v (Dau *et al.*, 1995). Před izolací byly rostliny adaptovány na tmu po dobu 30 minut, pak byly odřezány růžice rostlin. Všechny procedury byly prováděny pod slabým zeleným světlem na ledu nebo při 4 °C. Tylakoidní membrány (100 μg chlorofylu) byly smíchány s 1 ml extrakčního pufru (14 mM DL-dithiothreitol, 28 mM Na_2CO_3 , 175 mM sacharóza, 5 % (w/v) SDS a 10 mM EDTA- Na_2), inkubovány při 70 °C po dobu 30 minut a odstředovány po dobu 10 minut při 19 200 g. Supernatant obsahující izolované proteiny byl použit pro „Western blot“.

Izolované proteiny (odpovídající 1 μg chlorofylu) byly doplněny vzorkovým pufrem (Tricine Sample Buffer, BioRad, Hercules, USA; 3 \times zředěné) a dH_2O na celkový objem 20 μl . Po 10 minutách inkubace při 70 °C byly vzorky nanесeny na 10% gel (MiniPROTEAN TGX Precast Protein Gel, Bio Rad, Hercules, USA). Elektroforetické pufrы byly připraveny podle protokolu (Schägger, 2006). Elektroforéza byla prováděna při pokojové teplotě při napětí 100 V po dobu 49 minut a následně 75 V po dobu 8 minut.

Separované proteiny byly přeneseny na polyvinylidenfluoridovou membránu pomocí přenosové soupravy (Trans-Blot Turbo RTA Mini 0,2 mm PVDF Transfer Kit, Bio Rad) a detekovány pomocí specifických protilátek. Všechny protilátky použité v této studii byly zakoupeny od Agrisera (Vännäs, Švédsko). Přítomnost primárních protilátek

Anti-LHCB5 (AS01 009) a Anti-LHCB6 (AS01 010) byla detekována sekundární protilátkou s konjugovanou křenovou peroxidázou (HRP, „horse-radish peroxidase“) a chemiluminiscenční signál byl vyvolán pomocí substrátu (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Merck, Darmstadt, Německo) a vizualizován pomocí gelového skeneru (Amersham Imager 600RGB, GE HealthCare Life Sciences, Tokio, Japonsko).

3.2.5 Vyhodnocení fenotypu a hmotnosti čerstvé biomasy nadzemní části rostliny

Reprezentativní rostliny jednotlivých genotypů (WT, *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5lhcb6*) byly fotografovány chytrým telefonem. Měření čerstvých hmotností bylo provedeno Mgr. Terezou Vánskou. Z rostlin byla odstrižena nadzemní část, která byla vážena na analytických vahách.

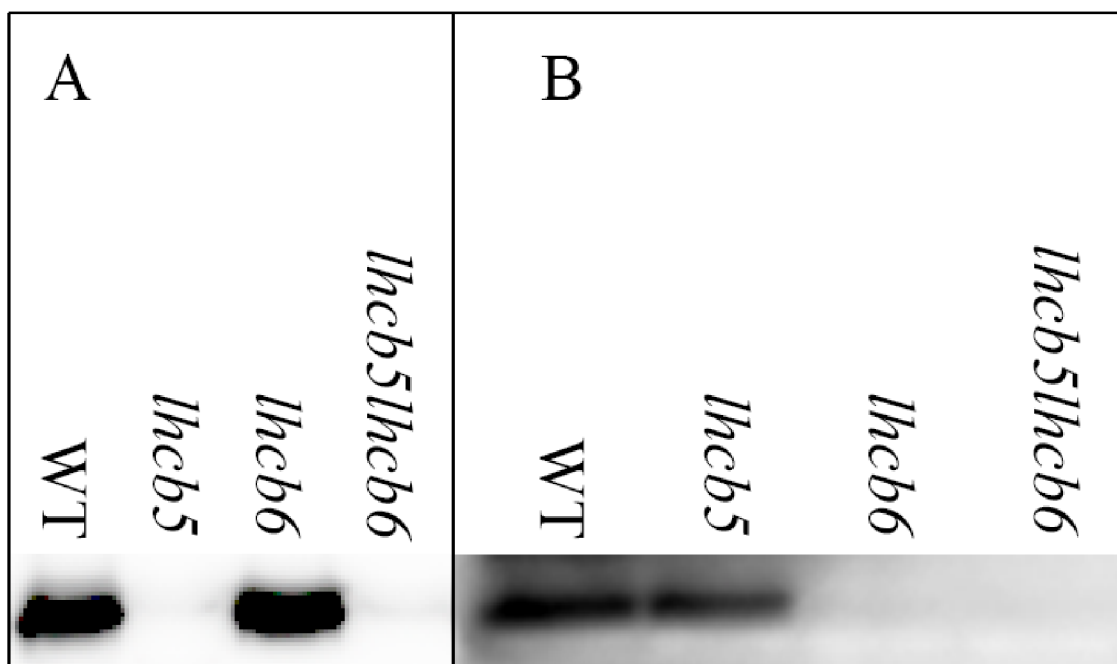
3.2.6 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení dat z vhodných měření bylo prováděno v programu Microsoft Excel. Z dat byly vypočteny průměry a výběrové směrodatné odchylky. Signifikantní rozdíl parametrů byl stanoven pomocí f-testu a příslušného t-testu pro hodnotu $p < 0,05$.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Validace inzerčních mutantů

Validace linií *lhcb5* (SALK_014869) a *lhcb6* (SALK_077953) a dvojitého mutantu *lhcb5lhcb6* byla provedena Mgr. Terezou Vánskou pomocí imunologické analýzy metodou „Western blot“. V případě mutantu *lhcb6* touto metodou nebyl detekován protein LHCB6, což dokládá absence proužku přítomného u WT (viz Obr. 10b). Avšak v předchozí studii bylo detekováno malé množství tohoto proteinu (> 0,1 % WT) pomocí hmotnostní spektrometrie, což je způsobeno vložením DNA kazety do promotorové části genu, což vede k „knock-down“ mutacím a ne kompletní „knock-out“ mutaci (Ilíková *et al.*, 2021). Obdobně v případě *lhcb5* nebyl detekován protein LHCB5. V tomto případě byla DNA kazeta vložena do kódovací sekvence a nepředpokládáme zbytkový výskyt funkčního proteinu LHCB5 (viz Obr. 10a). V případě dvojitého mutantu *lhcb5lhcb6* chybí oba proužky, takže podle očekávání chybí oba proteiny LHCB5 i LHCB6 (viz Obr. 10).



Obrázek 10. Validace přítomnosti proteinu LHCB5 (vlevo) a LHCB6 (vpravo) pomocí metody „Western blot“ v divokém typu (WT) a mutantech *lhcb5*, *lhcb6* a *lhcb5kolhcb6* rostlin *A. thaliana* pomocí protilátek (A) anti-LHCB5, (B) anti-LHCB6 (Mgr. Vánská; 13. 01. 2023)

4.2 Vyhodnocení fenotypu a hmotnosti čerstvé biomasy nadzemní části rostliny

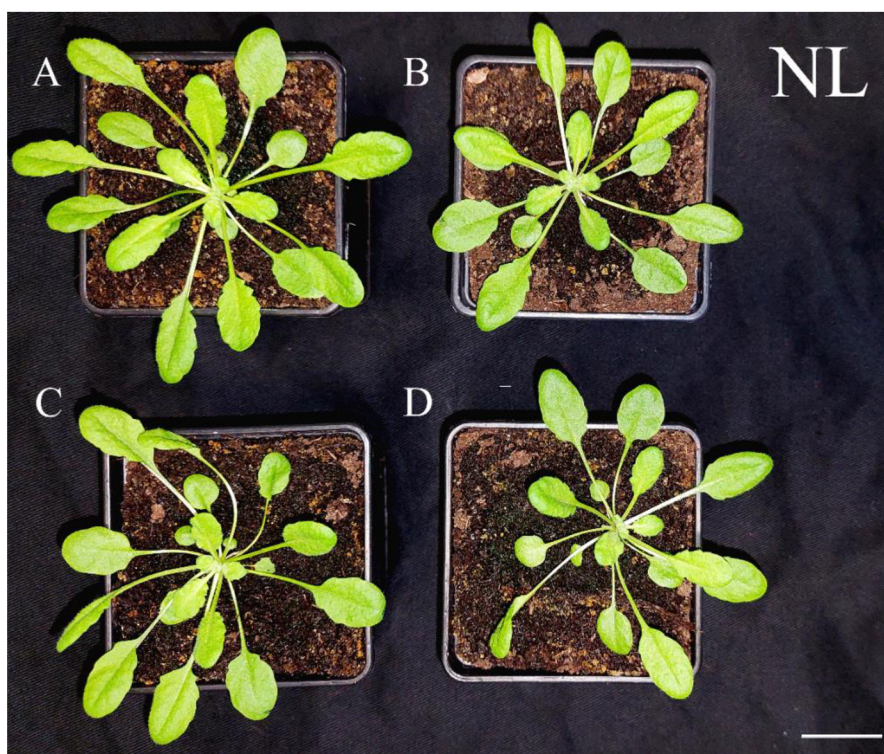
V rámci této práce byly pozorovány typické morfologické rozdíly mezi fenotypy rostlin aklimovaných na různé intenzity světla. Rostliny aklimované na nižší intenzitu světla (LL) měly výrazně menší růžice a tenčí listy oproti neaklimovaným rostlinám (NL) (viz Obr. 11 a Obr. 12). Zatímco rostliny aklimované na vyšší intenzitu světla (HL) měly oproti neaklimovaným rostlinám (NL) výrazně mohutnější listy s většími trichomy (viz Obr. 13 a Obr. 12), (Schumann *et al.*, 2017).

V rámci jednotlivých genotypů byla mezi fenotypy rostlin pozorována variabilita. V případě NL rostlin a LL rostlin nebyly mezi jednotlivými genotypy pozorovány výrazné vizuální rozdíly (viz Obr. 11 a Obr. 12). Tyto výsledky jsou v souladu s prací (Ilíková *et al.*, 2021), ve které je pozorovaný fenotyp mutantu *lhcb6* srovnatelný s divokým typem na rozdíl od prvotní studie (De Bianchi *et al.*, 2008), ve které byl pozorovaný fenotyp *lhcb6* signifikantně menší. V případě rostlin aklimovaných na HL byl mutant *lhcb6* vizuálně menší oproti divokému typu (viz Obr. 13C).

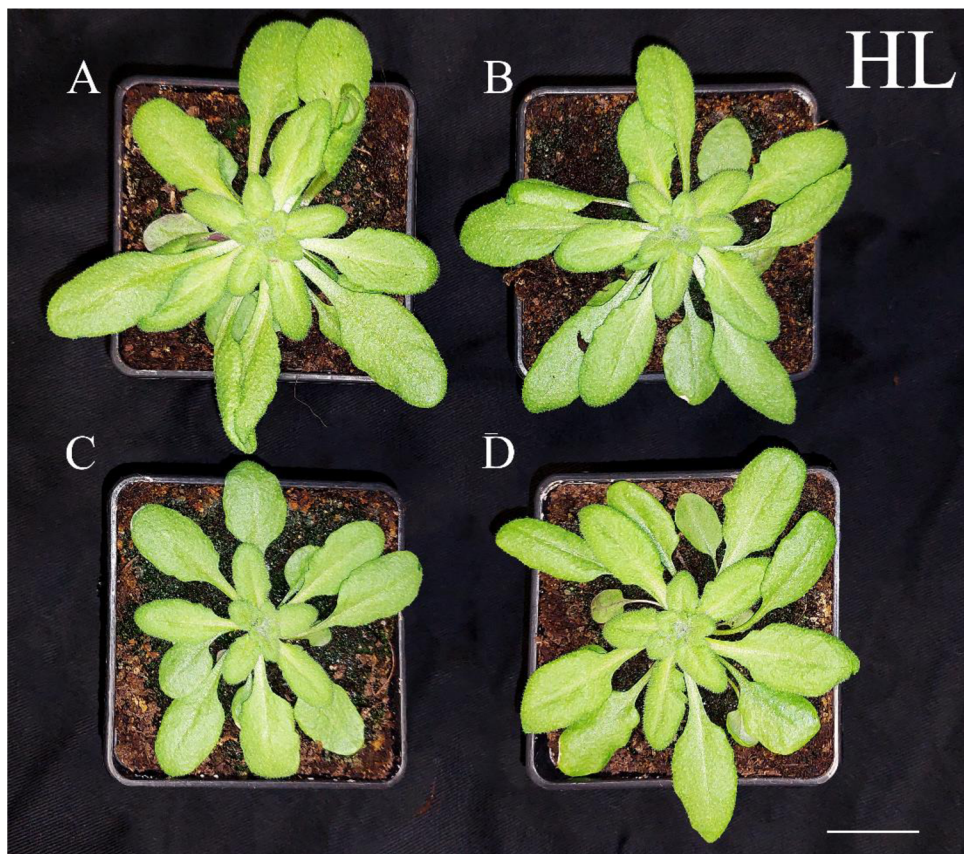
Obdobně nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl hmotností růžic mutantů oproti divokému typu u NL rostlin a LL rostlin (viz Obr. 14). V případě HL vykazovali signifikantní rozdíl všichni tři mutanti oproti divokému typu, přičemž mutanti *lhcb5* a *lhcb6* byli lehčí, zatímco dvojitý mutant *lhcb5lhcb6* byl těžší než divoký typ (viz Obr. 14). Tyto výsledky mohly být způsobeny vysokou heterogenitou rostlin, která se projevila, i přestože rostliny byly pěstovány při stejných podmínkách, což odráží i velké směrodatné odchylky. V případě fenotypu *lhcb6* mohl být jedním z faktorů narušený transport elektronů z PSII na PSI, což se může projevovat výrazněji při aklimaci na vyšší intenzitu světla a tím sníženou efektivitu fotosyntézy, což vedlo ke snížené produkci biomasy (Kovács *et al.*, 2006; Ilíková *et al.*, 2021).



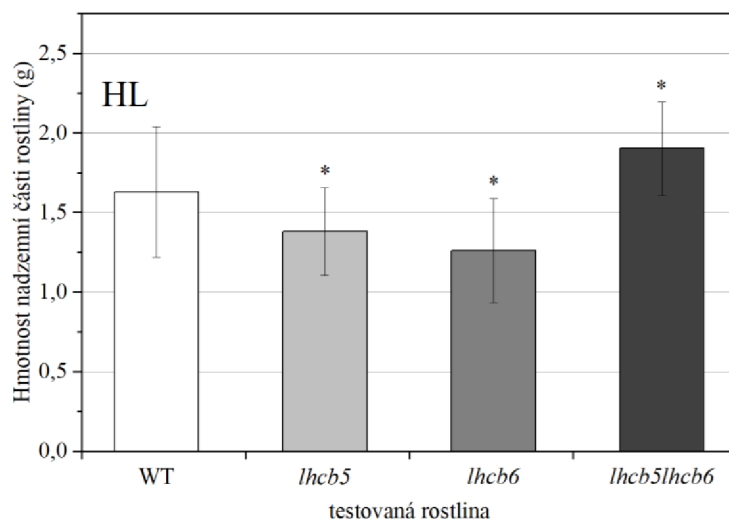
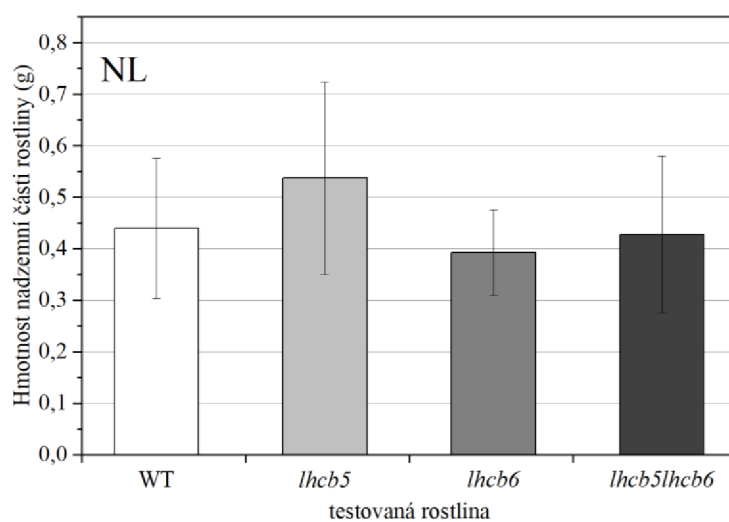
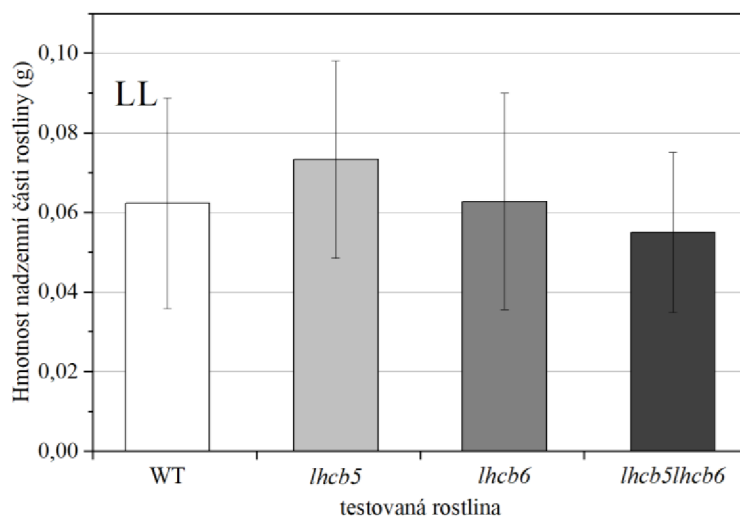
Obrázek 11. Fotodokumentace reprezentativních rostlin *A. thaliana* aklimovaných na LL ($20 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) s genotypy: (A) WT (divoký typ), (B) *lhcb5*, (C) *lhcb6*, (D) *lhcb5kolhcb6*. Snímky byly pořízené chytrým telefonem s fotoaparátém (měřítko- 2,5 cm).



Obrázek 12. Fotodokumentace reprezentativních rostlin *A. thaliana* aklimovaných na NL ($100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) s genotypy: (A) WT (divoký typ), (B) *lhcb5*, (C) *lhcb6*, (D) *lhcb5kolhcb6*. Snímky byly pořízené chytrým telefonem s fotoaparátém (měřítko- 2,5 cm).



Obrázek 13. Fotodokumentace reprezentativních rostlin *A. thaliana* aklimovaných na HL ($800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) s genotypy: (A) WT (divoký typ), (B) *lhc5*, (C) *lhc6*, (D) *lhc5kolhcb6*. Snímky byly pořízené chytrým telefonem s fotoaparátem (měřítko- 2,5 cm).



Obrázek 14. Hmotnosti nadzemních částí rostlin *A. thaliana* s genotypy: WT (divoký typ), *lhc5*, *lhc6*, *lhc5kolhcb6* aklimované na LL, NL a HL. Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, $n(LL)=23$, $n(NL)=20$, $n(HL)=18$. Skupiny dat se signifikantním rozdílem vůči WT podle t-testu ($p < 0,05$) jsou označeny hvězdičkou.

4.3 Pigmenty

Rozdíly složení pigmentů rostlin aklimovaných na různé intenzity světla souvisí se změnami velikosti absorpčního průřezu PSII, a tedy poměru PSII/LHCII a dále souvisí se změnami poměrů PSI/PSII. Předchozí studie indikují, že složení PSI by se nemělo výrazně měnit u rostlin aklimovaných na různou ozářenost (Štroch *et al.*, 2022). V případě rostlin aklimovaných na nižší intenzitu světla (LL) bylo pozorováno snížení poměru chlorofylů a/b a poměru chlorofylů vůči karotenoidům oproti neaklimovaným rostlinám (NL) (viz Tab 3). Chlorofyl *b* je specifický pro periferní antény PSII a především LHCII. Snížení poměru chlorofylu a/b je spojeno s větší velikostí superkomplexu PSII (Kouřil *et al.*, 2013). V souladu s tímto zjištěním v případě rostlin aklimovaných na vyšší intenzitu světla (HL) bylo pozorováno zvýšení poměru chlorofylů a/b oproti neaklimovaným rostlinám (NL) (viz Tab 3).

Složení pigmentů mutantů *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5lhcb6* se zásadně nelišilo od složení pigmentů divokého typu v případě neaklimovaných rostlin (NL) (viz Tab 1). V případě rostlin aklimovaných na nižší intenzitu světla (LL) byla pozorována snížená hladina množství sumy karotenoidů u mutantů *lhcb5* a *lhcb5lhcb6* vůči divokému typu (viz Tab 1). Rostliny aklimované na vyšší intenzitu světla (HL) vykazovaly zvýšenou hladinu množství chlorofylů *a*, chlorofylů *b* a sumy karotenoidů u všech pozorovaných mutantů vůči divokému typu, a to jak u koncentrace pigmentů vztažené na plochu listů (viz Tab 1), tak na hmotnost listů (viz Tab 2). Nárůst množství pigmentů v mutantech aklimovaných na HL naznačuje větší množství superkomplexů fotosystémů v těchto rostlinách, což může naznačovat odlišnou reorganizaci pletiv listů. Pro analýzu složení pletiv by bylo potřeba pozorování průřezem listu pomocí elektronové mikroskopie. Dále u HL rostlin byl pozorován zvýšený poměr chlorofylů a/b u všech mutantů vůči divokému typu (viz Tab 3). Tento zvýšený poměr může být dán vyšším poměrem PSII/LHCII a v menší míře vyšším poměrem PSI/PSII. Pro bližší analýzu poměrů PSII/LHCII a PSI/PSII by bylo nutné provést hmotnostní spektrometrii.

Tab. 1: Množství fotosyntetických pigmentů v závislosti na plochu (chl-chlorofyly, car-karotenoidy). Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr ± SD, n =5. (Skupiny dat se signifikantním rozdílem vůči divoké typu podle t-testu (p <0,05) jsou označeny hvězdičkou.)

vzorek	chl a ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	chl b ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	car ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
Divoký typ (NL)	5,82 ± 1,02	1,96 ± 0,45	1,43 ± 0,22
<i>lhcb5</i> (NL)	6,03 ± 0,72	2,13 ± 0,32	1,49 ± 0,18
<i>lhcb6</i> (NL)	5,84 ± 1,07	1,90 ± 0,34	1,46 ± 0,25
<i>lhcb5lhcb6</i> (NL)	5,81 ± 1,00	1,97 ± 0,33	1,38 ± 0,25
Divoký typ (HL)	5,13 ± 2,27	1,55 ± 0,71	1,28 ± 0,63
<i>lhcb5</i> (HL)	9,26 ± 1,65*	2,66 ± 0,54*	2,29 ± 0,35*
<i>lhcb6</i> (HL)	11,41 ± 3,30*	3,14 ± 0,81*	2,72 ± 0,82*
<i>lhcb5lhcb6</i> (HL)	9,19 ± 1,71*	2,54 ± 0,42*	2,13 ± 0,26*
Divoký typ (LL)	1,16 ± 0,57	0,50 ± 0,31	0,82 ± 0,31
<i>lhcb5</i> (LL)	0,65 ± 0,50	0,34 ± 0,28	0,41 ± 0,20*
<i>lhcb6</i> (LL)	1,22 ± 0,85	0,57 ± 0,44	0,48 ± 0,24
<i>lhcb5lhcb6</i> (LL)	0,64 ± 0,35	0,28 ± 0,16	0,34 ± 0,11*

Tab. 2: Množství fotosyntetických pigmentů v závislosti na hmotnost (chl-chlorofyly, car-karotenoidy). Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr ± SD, n =5. (Skupiny dat se signifikantním rozdílem vůči divoké typu podle t-testu (p <0,05) jsou označeny hvězdičkou.)

vzorek	chl a ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ FW)	chl b ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ FW)	car ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ FW)
Divoký typ (NL)	0,51 ± 0,09	0,17 ± 0,04	0,12 ± 0,02
<i>lhcb5</i> (NL)	0,51 ± 0,13	0,18 ± 0,05	0,13 ± 0,03
<i>lhcb6</i> (NL)	0,48 ± 0,09	0,16 ± 0,03	0,12 ± 0,02
<i>lhcb5lhcb6</i> (NL)	0,49 ± 0,10	0,17 ± 0,04	0,12 ± 0,02
Divoký typ (HL)	0,19 ± 0,08	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,02
<i>lhcb5</i> (HL)	0,36 ± 0,07*	0,10 ± 0,02*	0,09 ± 0,01*
<i>lhcb6</i> (HL)	0,43 ± 0,12*	0,12 ± 0,03*	0,10 ± 0,03*
<i>lhcb5lhcb6</i> (HL)	0,35 ± 0,06*	0,10 ± 0,02*	0,08 ± 0,01*
Divoký typ (LL)	0,09 ± 0,04	0,04 ± 0,02	0,07 ± 0,02
<i>lhcb5</i> (LL)	0,05 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,02*
<i>lhcb6</i> (LL)	0,10 ± 0,06	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,02
<i>lhcb5lhcb6</i> (LL)	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01*

Tab. 3: Poměry fotosyntetických pigmentů (chl-chlorofyly, car-karotenoidy). Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr ± SD, n =5. (Skupiny dat se signifikantním rozdílem vůči divoké typu podle t-testu ($p < 0,05$) jsou označeny hvězdičkou.)

vzorek	chl a/b	chl/car
Divoký typ (NL)	2,99 ± 0,15	5,43 ± 0,44
<i>lhcb5</i> (NL)	2,84 ± 0,08	5,51 ± 0,52
<i>lhcb6</i> (NL)	3,08 ± 0,15	5,28 ± 0,18
<i>lhcb5lhcb6</i> (NL)	2,94 ± 0,14	5,70 ± 0,66
Divoký typ (HL)	3,33 ± 0,10	5,33 ± 0,80
<i>lhcb5</i> (HL)	3,50 ± 0,13*	5,21 ± 0,44
<i>lhcb6</i> (HL)	3,60 ± 0,16*	5,39 ± 0,25
<i>lhcb5lhcb6</i> (HL)	3,62 ± 0,13*	5,48 ± 0,42
Divoký typ (LL)	2,51 ± 0,51	1,99 ± 0,38
<i>lhcb5</i> (LL)	2,02 ± 0,38	2,22 ± 0,89
<i>lhcb6</i> (LL)	2,32 ± 0,44	3,44 ± 0,83*
<i>lhcb5lhcb6</i> (LL)	2,34 ± 0,27	2,63 ± 0,70

4.4 Parametry indukce chlorofylové fluorescence

Pomocí přístroje PEA metr můžeme měřit rychlou kinetiku fluorescenčního indukčního jevu, ze kterého můžeme získat fotosynteticky významné parametry, jako jsou například F_V/F_M , F_O , F_M , TR_0/RC . Parametr TR_0/RC popisuje funkční anténu PSII. Hodnota TR_0/RC byla u rostlin aklimovaných na LL zvýšena oproti neaklimovaným rostlinám (NL) a u rostlin aklimovaných na HL byla tato hodnota snížena oproti NL rostlinám. To naznačuje větší funkční anténu PSII u LL rostlin a menší průměrnou velikost superkomplexu PSII u HL ve srovnání s NL, což odráží i poměr chlorofylů a/b (Kouřil *et al.*, 2013).

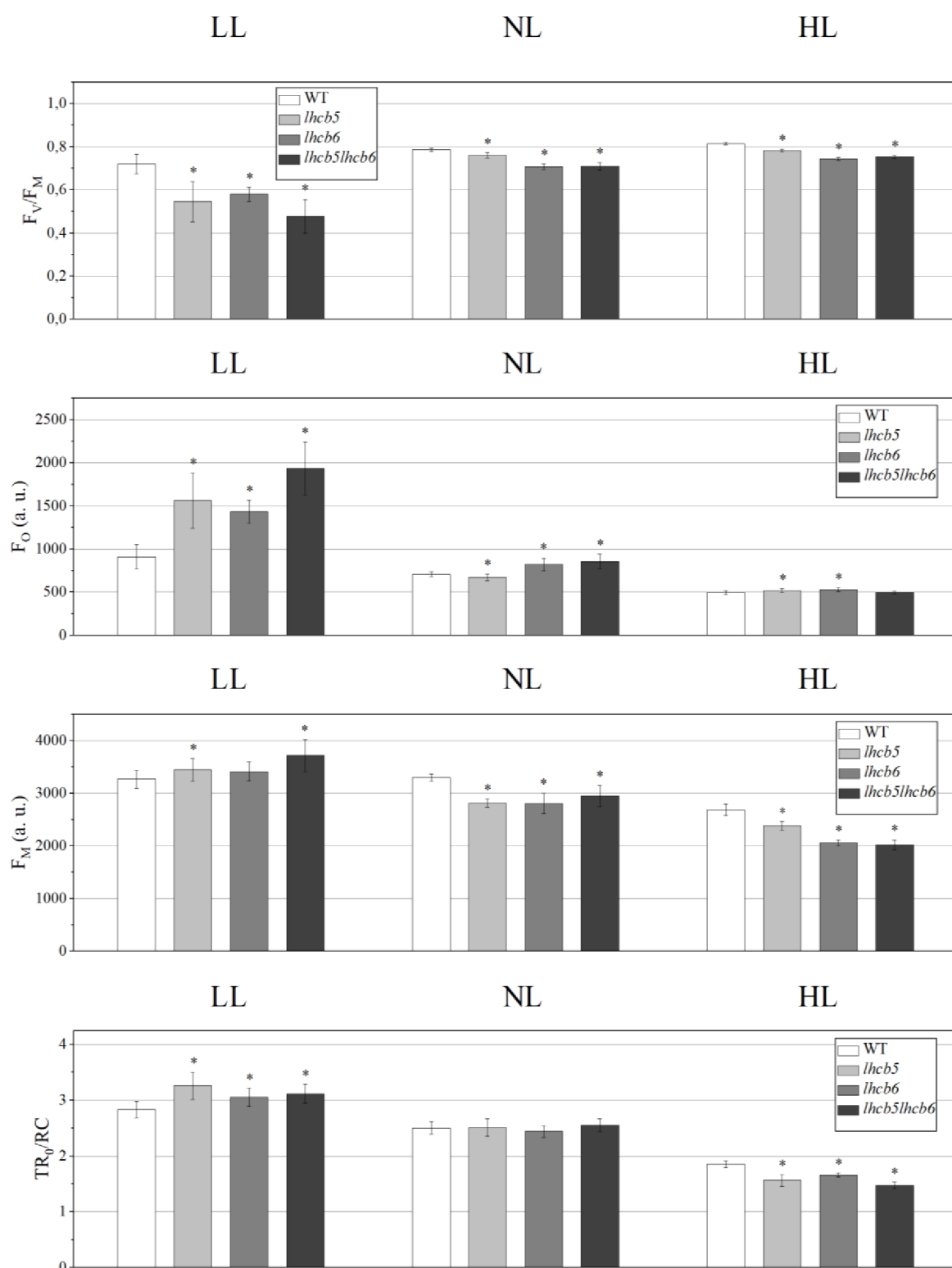
Poměr F_V/F_M (maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII) může být využit jako ukazatel stresu. F_V/F_M může u zdravých nestresovaných rostlin dosahovat hodnoty až 0,83 (Murchie & Lawson, 2013). Tato hodnota se snižuje při vystavení rostlin stresu. Hodnota F_V/F_M byla u rostlin aklimovaných na LL snížena výrazně oproti neaklimovaným rostlinám (NL), naproti tomu u rostlin aklimovaných na HL byla tato hodnota srovnatelná s neaklimovanými rostlinami (viz obr. 15). Tato nižší hodnota F_V/F_M u LL rostlin může být vysvětlena větším výskytem větších „loosely bound“ LHCII antén. Tyto přídatné LHCII antény jsou ke zbytku komplexu slabě vázány, což vede k pomalejšímu transferu energie do RC a tím i k nižšímu F_V/F_M způsobenému nárůstem F_O (viz níže) (Štroch *et al.*, 2022).

V případě neaklimovaných rostlin (NL) se TR_0/RC mutantů nelišilo od divokého typu (viz Obr. 15). Mutant *lhcb6* tvoří pouze menší formu superkomplexů PSII C_2S_2 (které jsou uspořádány v takzvaných krystalových polích „crystalline arrays“, viz kap. 2.1.2.5), přesto je u něj hodnota TR_0/RC srovnatelná WT. Kvůli špatné vazbě přídatných LHCII k PSII vznikají u *lhcb6* volné LHCII, které jsou ale schopny přenášet excitační energii na krystalové pole a tím kompenzovat menší velikost superkomplexu (Ilíková *et al.*, 2021). Mutanti *lhcb5* a *lhcb5lhcb6* netvoří tento typ krystalového pole z C_2S_2 (De Bianchi *et al.*, 2008). U těchto mutantů předpokládáme podobnou interakci s nevázanými LHCII. V případě aklimace na LL byly hodnoty TR_0/RC u mutantů vyšší než u WT, což znamená vyšší relativní zastoupení větších forem superkomplexů PSII oproti WT. Naopak při aklimaci na HL byly hodnoty TR_0/RC u mutantů vyšší než u WT, což znamená vyšší relativní zastoupení menších forem superkomplexů PSII (viz Obr. 15).

Hodnota F_V/F_M byla do určité míry nižší u všech mutantů oproti divokému typu, a to při všech testovaných aklimačních podmínkách. U neaklimovaných rostlin (NL) byl poměr F_V/F_M mírně snížený u *lhcb5* a více snížený u *lhcb6* a *lhcb5lhcb6* oproti WT (viz Obr. 15). Tento pokles u *lhcb6* byl pozorován i v přechozích studiích (Kovács *et al.*, 2006; Ilíková *et al.*, 2021). Pokles této hodnoty souvisí s nárůstem F_O a poklesem F_M . Minimální fluorescence (F_O) je mírně zvýšená u *lhcb6* a *lhcb5lhcb6* a mírně snížena u *lhcb5*. Nárůst F_O je způsoben volnými LHCII, které nejsou silně připojeny k PSII, takže většina excitační energie je přeměněna na fluorescenci a na teplo (viz Obr. 5). Maximální fluorescence (F_M) byla snížena u všech mutantů oproti WT. Příčina poklesu F_M je nejasná.

V případě LL rostlin byl poměr F_V/F_M u mutantů výrazně snížen (viz Obr. 15). Tato nižší hodnota F_V/F_M u mutantů aklimovaných na LL je pravděpodobně způsobena přítomností většího množství „loosely bound“ LHCII antén, které jsou zdrojem vyšší intenzity fluorescence, ale které zároveň zvyšují hodnoty TR_0/RC u těchto mutantů. V tomto případě je nárůst F_O doprovázen i nárůstem hodnot F_M u *lhcb5* a *lhcb5lhcb6*.

V případě mutantů aklimovaných na HL byl pozorován pokles F_V/F_M oproti WT (viz Obr. 15). Tento pokles byl méně výrazný než u NL. U HL rostlin byl pozorován pouze mírný nárůst F_O u *lhcb5* a *lhcb6*. Tento nárůst není tak výrazný pravděpodobně kvůli menšímu množství volných LHCII, jak plyne z vyšších hodnot chl a/b (viz Tab 3). U HL rostlin byl pozorován pokles F_M u všech mutantů, který byl výraznější než u NL. Tento jev pravděpodobně souvisí s nějakou formou NPQ s pomalou relaxací ve tmě (qI).



Obrázek 15. Parametry naměřené PEA metrem (F_o , F_m , F_v/F_m , TR_0/RC) *A. thaliana* s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5kolhcb6* aklimované na LL, NL a HL. Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, $n = 14$. Skupiny dat se signifikantním rozdílem vůči WT podle t-testu ($p < 0,05$) jsou označeny hvězdičkou.

4.5 Stanovení fotosyntetických parametrů fotosystému I a fotosystému II

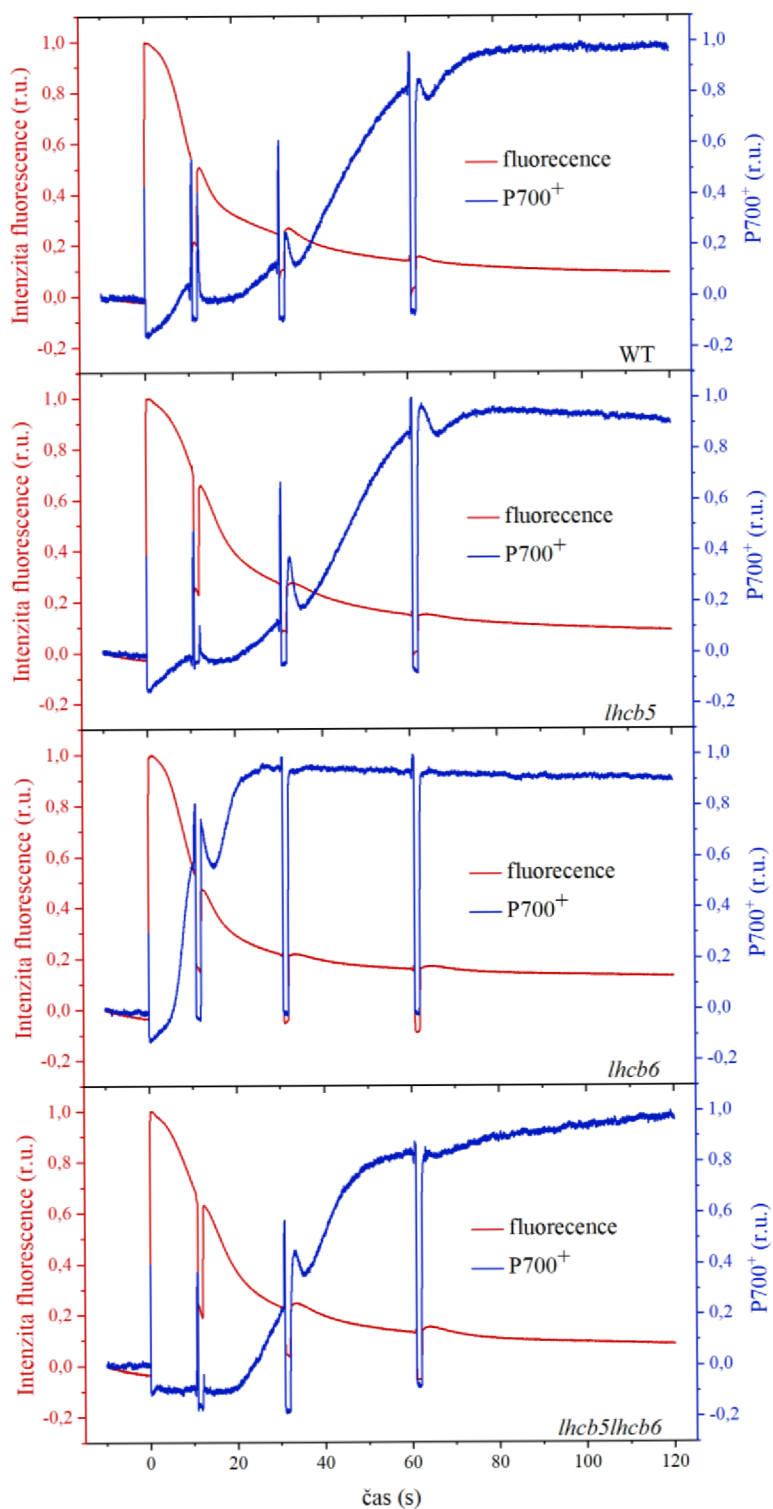
Reorganizace PSII může mít dopad na funkčnost lineárního toku elektronů z PSII na PSI. Pro studium této interakce bylo využito měření kinetiky indukčního jevu chlorofylové fluorescence a kinetiky absorpance P700. V tomto měření bylo využito aktinické světlo ($800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), které výrazně převyšovalo fotosyntetickou kapacitu neaklimovaných rostlin. Oxidovaná forma P700 (P700^+), která vzniká separací nábojů na PSI, je za fyziologických podmínek redukována elektronem z PSII zpět na P700. V případě nerovnováhy ve fungování obou fotosystémů, kdy aktivita fotosystémů I převyšuje aktivitu fotosystémů II, se oxidovaná forma P700^+ začne akumulovat, dokud nedosáhne takzvaného ustáleného stavu „steady state“. Rychlost tohoto ustavení „steady state“ v P700^+ tedy odráží bilanci mezi přítokem elektronů z PSII na PSI a transportem elektronů z PSI na Fd.

V případě divokého typu dosažení tohoto stavu trvalo zhruba 80 sekund od zapnutí aktinického světla. U mutanta *lhcb5* byla tato doba srovnatelná. Zatímco v případě *lhcb6* byla doba dosažení „steady state“ signifikantně kratší, zhruba 30 sekund od zapnutí aktinického světla. Tento jev je pravděpodobně způsoben semikrystalickou organizací superkomplexů PSII, která zabraňuje migraci PQ mezi PSII a cytb_6/f komplexem (Ilíková *et al.*, 2021). U dvojitého mutanta *lhcb5lhcb6* můžeme pozorovat částečný návrat k divokému typu s dobou dosažení „steady state“ po cca 50 sekundách od zapnutí aktinického světla (viz Obr. 16).

K podrobnější charakterizaci funkce PSII byly z hodnot chlorofylové fluorescence indukčního jevu, naměřených během 30 minut osvitů aktinickým světlem, vypočítány parametry Y(II) a NPQ. Y(II) je efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII. Tento parametr odpovídá lineárnímu toku elektronů z H_2O přes PSII na cytochrom b_6/f . NPQ je parametr nefotochemického zhášení.

Obdobně k charakterizaci funkce PSI byly z hodnot absorpance P700 naměřených během 30 minut osvitů aktinickým světlem vypočítány parametry Y(I), Y(ND) a Y(NA). Y(I) je efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSI. Tento parametr odpovídá toku elektronů přes PSI. Y(ND) je kvantový výtěžek nefotochemické disipace energie v reakčních centrech PSI, která jsou omezená kvůli nedostatku elektronů Y(ND). Jde o takzvanou limitaci na donorové straně. Y(NA) je kvantový výtěžek nefotochemické disipace energie v reakčních centrech PSI, která jsou omezená kvůli nedostatku

oxidovaného Fd. Parametry Y(I), Y(ND) a Y(NA) vyjadřují relativní váhu jednotlivých procesů. Součet těchto parametrů dává hodnotu 1.

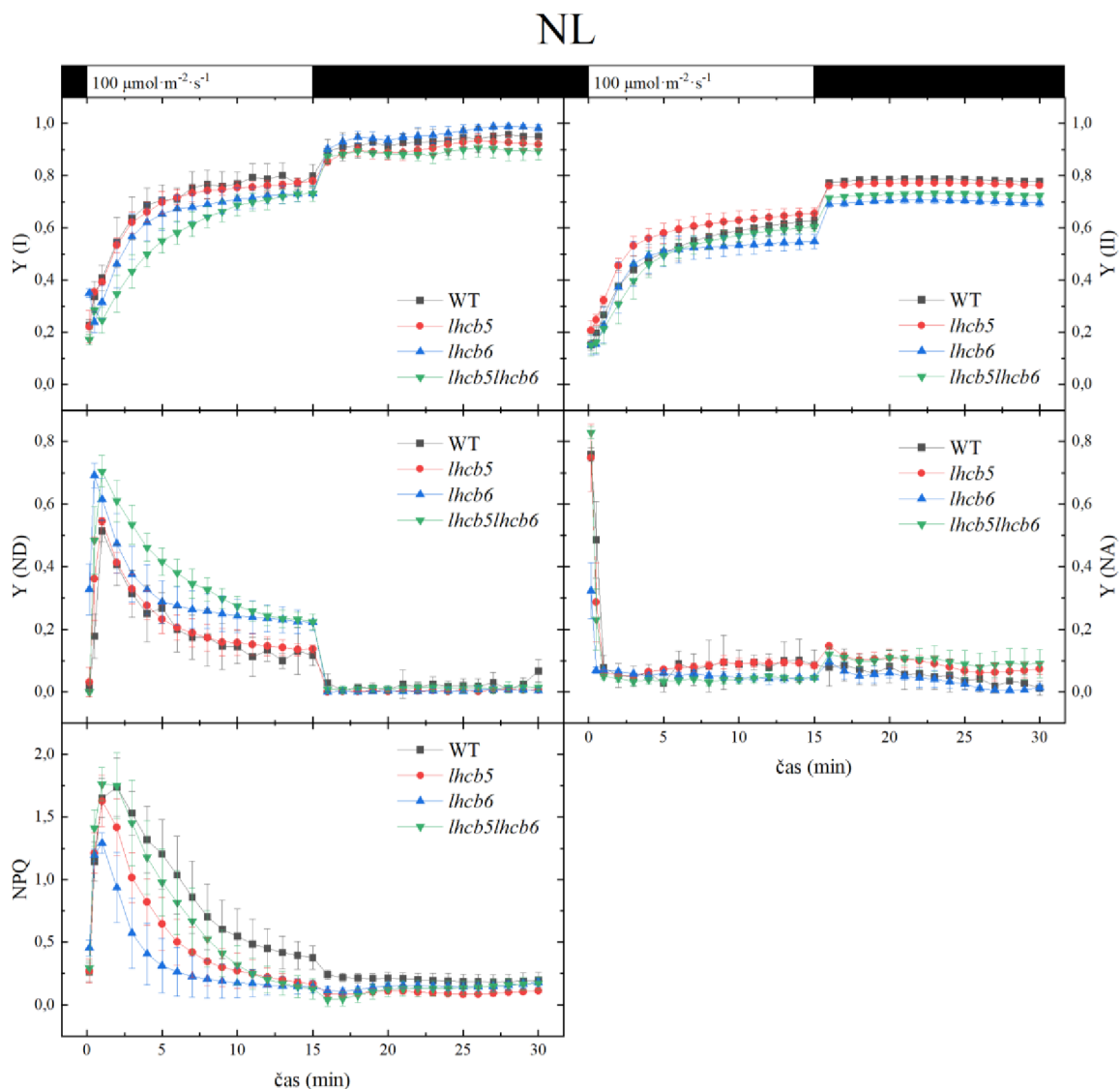


Obrázek 16. Reprezentativní křivky oxidace P700 a indukčního jevu chlorofylové fluorescence neaklimovaných rostlin s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5kolhcb6*. aktinické světlo ($800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

U neaklimovaných rostlin (NL) s intenzitou použitého aktinického světla ($100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) můžeme pozorovat fungování fotosystémů při fyziologických podmínkách (viz obr. 17). Během první minuty osvit, kdy ještě nefunguje Calvinův cyklus, je činností fotosystémů vytvořen transmembránový gradient, což vede k indukci NPQ. To vede k menší účinnosti PSII a akumulaci P700^+ , což odráží nástup Y(ND). Následně dochází k využití protonového gradientu ATP-syntázou a tím k pomalé relaxaci NPQ, což vede k zvýšení Y(II). Toto zvýšení Y(II) vede k zvýšení toku elektronů na PSI, což odráží snížené Y(ND) a zvýšené Y(I) (Štroch *et al.*, 2022). Mutant *lhcb5* v první minutě dosahuje podobných hodnot NPQ jako WT, ale následně vykazuje rychlejší relaxaci NPQ a tím i zvýšené Y(II). Ostatní měřené parametry se u *lhcb5* zásadně nelišily od WT. U mutantů *lhcb6* byl pozorován velmi rychlý nárůst NPQ, což je v souladu s literaturou (viz např. Ilíková *et al.* 2021), ale dosahuje nižších hodnot a projevuje se u něj velmi rychlá relaxace NPQ. I přes tyto nízké hodnoty NPQ má *lhcb6* nízké i hodnoty Y(II). Nejvyšší hodnota zhášení spojeného s limitací na donorové straně Y(ND) je u *lhcb6* dosažena už po 30 sekundách. Tato nejvyšší hodnota Y(ND) je u *lhcb6* výrazně vyšší než u WT. Hodnoty Y(ND) u *lhcb6* klesají zpočátku rychle, ale po 5 minutách přestávají klesat. Toto je způsobeno omezenou mobilitou plastochinonů v krystalických polích C_2S_2 (viz kap. 2.1.2.5). Překvapivě dvojitý mutant *lhcb5lhcb6* vykazuje zvýšené hodnoty Y(ND) podobně jako *lhcb6* s tvarem křivky podobajícím se WT, a to i přes hodnoty Y(II) podobné WT.

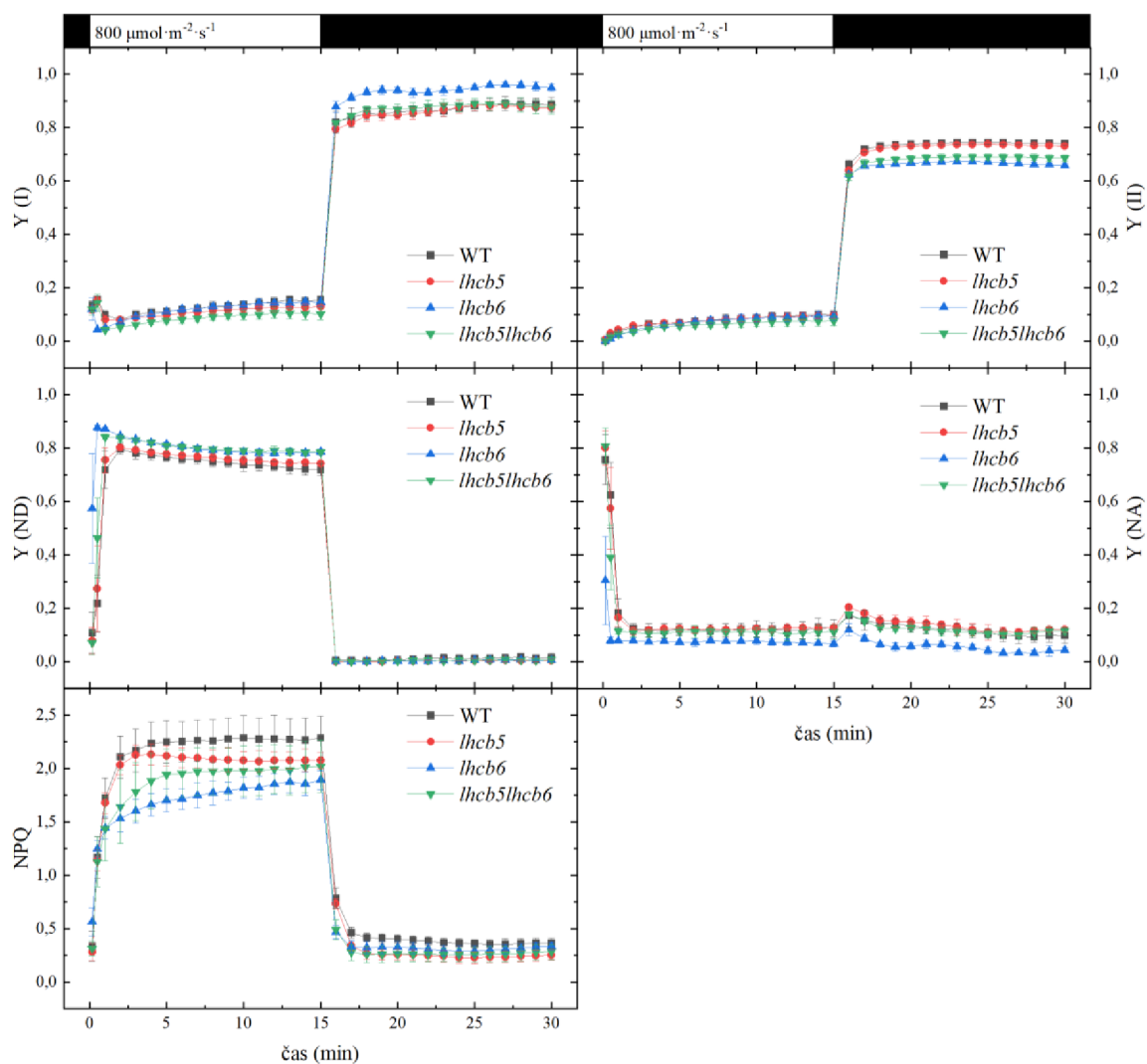
U neaklimovaných rostlin (NL) s intenzitou použitého aktinického světla ($800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) můžeme pozorovat fungování fotosystémů při stresových podmínkách (viz obr. 18). Na rozdíl od obr. 17 zde nedochází k relaxaci NPQ během působení aktinického světla. Mutant *lhcb5* v prvních dvou minutách dosahuje podobných hodnot NPQ jako WT, následně vykazuje mírně nižší hodnoty NPQ. Ostatní měřené parametry se u *lhcb5* zásadně nelišily od WT. U mutantu *lhcb6* můžeme pozorovat snížené hodnoty NPQ a jinou kinetiku oproti WT. Zatímco u divokého typu probíhá rychlý nárůst hodnot NPQ až na hodnotu cca 2 během 2 minut a následná pomalejší fáze, při které bylo dosaženo hodnoty 2,3, u mutantu *lhcb6* kopíruje kinetiku WT prvních 30 sekund a následuje pomalejší nárůst na cca hodnotu 1,7 během cca 5 minut a následuje pomalejší fáze, při které bylo dosaženo hodnoty cca 1,9. Tato kinetika NPQ *lhcb6* souhlasí s výsledky v Ilíková *et al.* (2021). Opět nejvyšší hodnota zhášení spojeného s limitací na donorové straně Y(ND) byla u *lhcb6* dosažena už po 30 sekundách a hodnoty

Y(ND) byly mírně zvýšené. Dvojitý mutant *lhcb5lhcb6* vykazuje mírně zvýšené hodnoty Y(ND) podobně jako *lhcb6*. Mutant *lhcb5lhcb6* vykazoval pomalejší indukci NPQ podobnou jako *lhcb6*, ale blíž k hodnotám WT. Při použití aktinického světla o intenzitě $1200 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (viz Obr. 19) byl především pozorován větší rozdíl mezi *lhcb6* a ostatními genotypy v parametru Y(ND) a Y(NA).



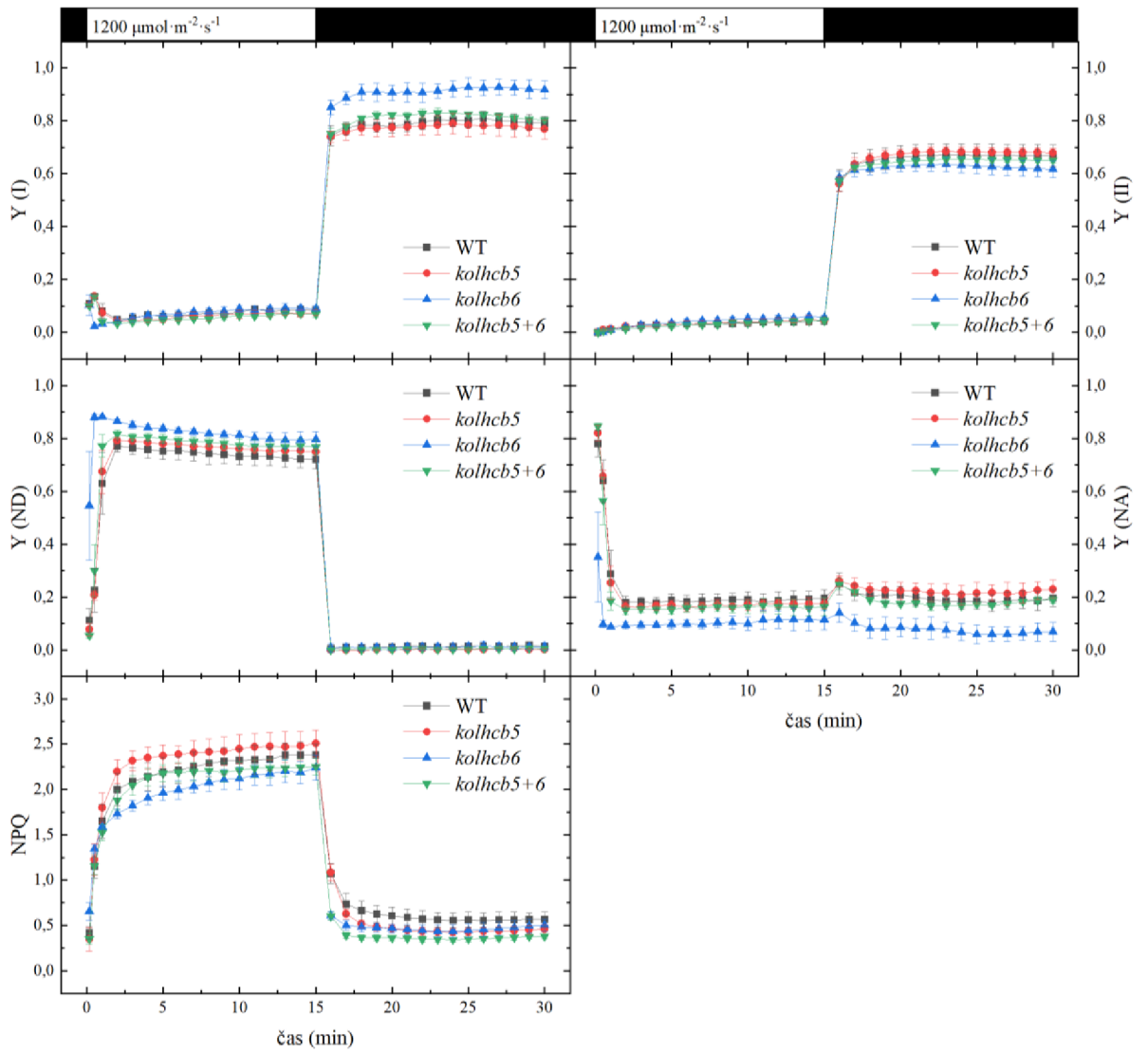
Obrázek 17. Kinetiky fotosyntetických parametrů (Y(I), Y(II), Y(ND), Y(NA), NPQ) neaklimovaných rostlin (NL) s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5kolhcb6*. měřené rostliny byly zatměněné 30 min před měřením, měření: 0-15 min použito aktinické světlo o intenzitě $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 15-30 min tma; Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, $n=4$.

NL



Obrázek 18. Kinetiky fotosyntetických parametrů (Y(I), Y(II), Y(ND), Y(NA), NPQ) neaklimovaných rostlin (NL) s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5lhcb6*. (viz legenda u Obr. 17) aktinické světlo ($800 \mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=4.

NL



Obrázek 19. Kinetiky fotosyntetických parametrů (Y(I), Y(II), Y(ND), Y(NA), NPQ) neaklimovaných rostlin (NL) s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5kolhcb6*. (viz legenda u Obr. 17) aktinické světlo ($1200 \mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, n= 4.

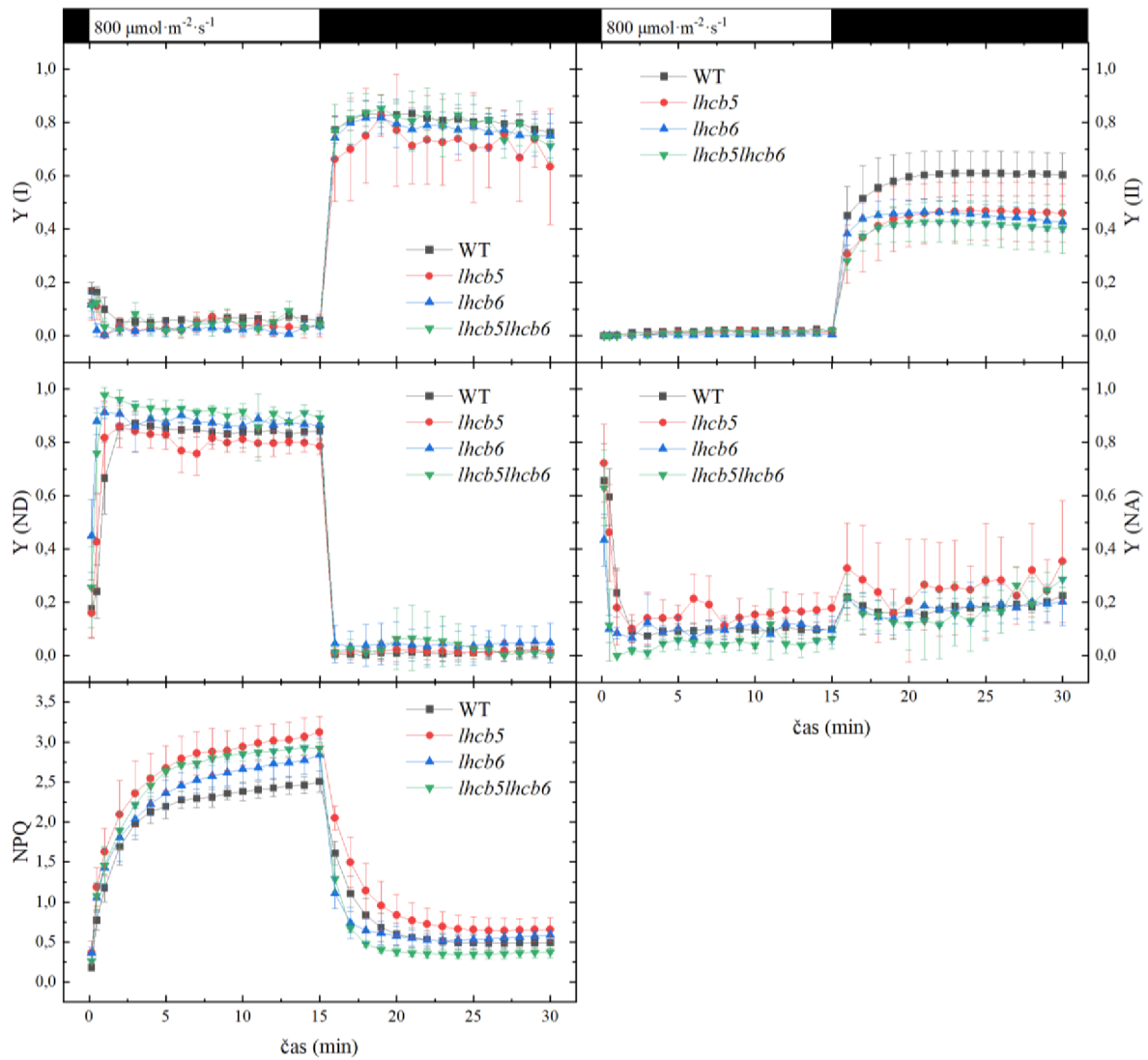
Fotosyntetické parametry fotosystémů rostlin aklimovaných na nižší intenzitu světla (LL) byly měřeny při intenzitě použitého aktinického světla $800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, pro srovnání s NL při aktinickém světle $800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (viz Obr. 20). Všichni pozorovaní mutanti vykazovali zvýšenou hladinu NPQ oproti WT. Tento nárůst NPQ je pravděpodobně způsobený větším množstvím „loosely bound“ LHCII související také s větší velikostí funkční antény PSII (viz Obr.15). Kinetiky NPQ se lišily u rostlin jednotlivých genotypů. V případě *lhcb5* byl pozorován rychlý nárůst, vysoké hodnoty a pomalá relaxace oproti divokému typu, což může být vysvětleno přítomností více volných LHCII, což dokládá i vysoká hodnota TR_0/RC (Obr.15). Zatímco mutanti *lhcb6* a *lhcb5lhcb6* měli během osvitu vyšší hodnoty NPQ než divoký typ, jejich relaxace byla rychlejší. Dále je patrná různá kinetika relaxace Y (II) a různé „steady state“ hodnoty Y (II), které odpovídají různým hodnotám F_v/F_m .

Fotosyntetické parametry fotosystémů rostlin aklimovaných na vyšší intenzitu světla (HL) byly měřeny při intenzitě použitého aktinického světla $800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, pro srovnání s NL při aktinickém světle $800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (viz Obr. 21). Výsledky měření kinetik NPQ jsou enigmatické. Tvar křivek připomíná tvar křivek neaklimovaných rostlin s tím rozdílem, že hodnoty NPQ mezi jednotlivými genotypy jsou markantní. Hodnota NPQ u *lhcb6* činí po 15 minutách 1,7 oproti WT, kde tato hodnota činí 2,9. Rozdíl hodnot NPQ mezi *lhcb6* a WT u HL činí 1,2 oproti 0,4 u NL. Dále můžeme pozorovat částečný návrat k hodnotám NPQ divokého typu v případě dvojitého mutantu *lhcb5lhcb6*. Jedním z faktorů způsobujících tento rozdíl může být menší funkční velikost superkomplexu PSII u mutantů. Tento jev může být v případě *lhcb6* způsoben nějakým druhem trvalého zhašení („locked in“, qI), čímž by dynamicky regulované NPQ mohlo být nižší, podobně jako například u smrku aklimovaného na vyšší ozáření (Štroch *et al.*, 2022). Tyto poklesy NPQ u mutantů zásadně neovlivnily Y(II), přičemž u *lhcb5lhcb6* byl tento parametr mírně snížený, u *lhcb6* stejný a u *lhcb5* dokonce lehce zvýšený oproti divokému typu. Hodnoty Y(NA) byly u všech genotypů srovnatelné. Hodnoty Y(ND) byly srovnatelné u *lhcb5*, mírně vyšší u *lhcb6* a vyšší u *lhcb5lhcb6* oproti divokému typu, což snížilo příslušné hodnoty Y(I).

Na obrázku 22 je srovnání kinetik NPQ jednotlivých aklimačních variant při aktinickém světle o intenzitě $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. U divokého typu byly pozorovány různé průběhy NPQ, které odrážejí různou připravenost jednotlivých aklimačních variant na tuto intenzitu záření. V případě LL rostlin tato intenzita převyšuje kapacitu

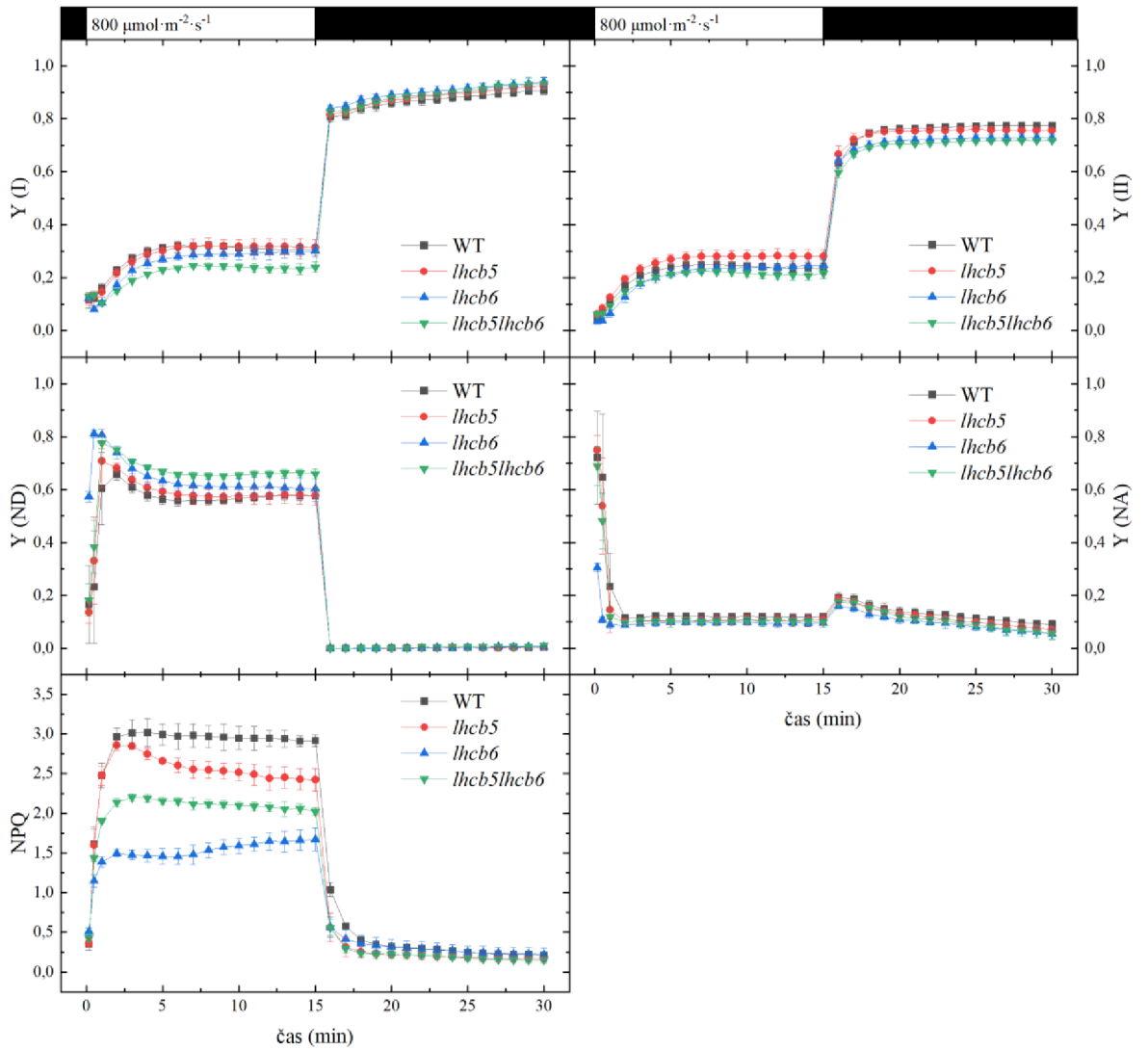
fotochemie, což vede k vysokým hodnotám NPQ. V případě NL rostlin je fotosyntetický aparát těchto rostlin na tuto intenzitu optimalizován, což vede k přechodně vysokým hodnotám NPQ, které ale následně klesají činností Calvinova cyklu. V případě HL rostlin je fotosyntetický aparát těchto rostlin optimalizován na výrazně vyšší intenzitu světla, což vede ke strmému poklesu hodnot NPQ po počátečním růstu a k nízkým hodnotám NPQ. Podobné kinetiky NPQ byly pozorovány u *lhcb5*. Naproti tomu kinetika NPQ u NL rostlin *lhcb6* byla podobná kinetice NPQ u rostlin *lhcb6* aklimovaných na HL, z toho vyplývá, že neaklimované rostliny mutantu *lhcb6* mají svůj fotosyntetický aparát optimalizovaný pro vyšší intenzitu světla („high-light ready“). Tento průběh kinetik NPQ aklimačních variant mutantu *lhcb6* je podobný jako průběh kinetik NPQ u aklimačních variant smrku (Štroch *et al.*, 2022). V případě dvojitého mutantu *lhcb5lhcb6* byly pozorovány hodnoty bližší hodnotám divokého typu.

LL

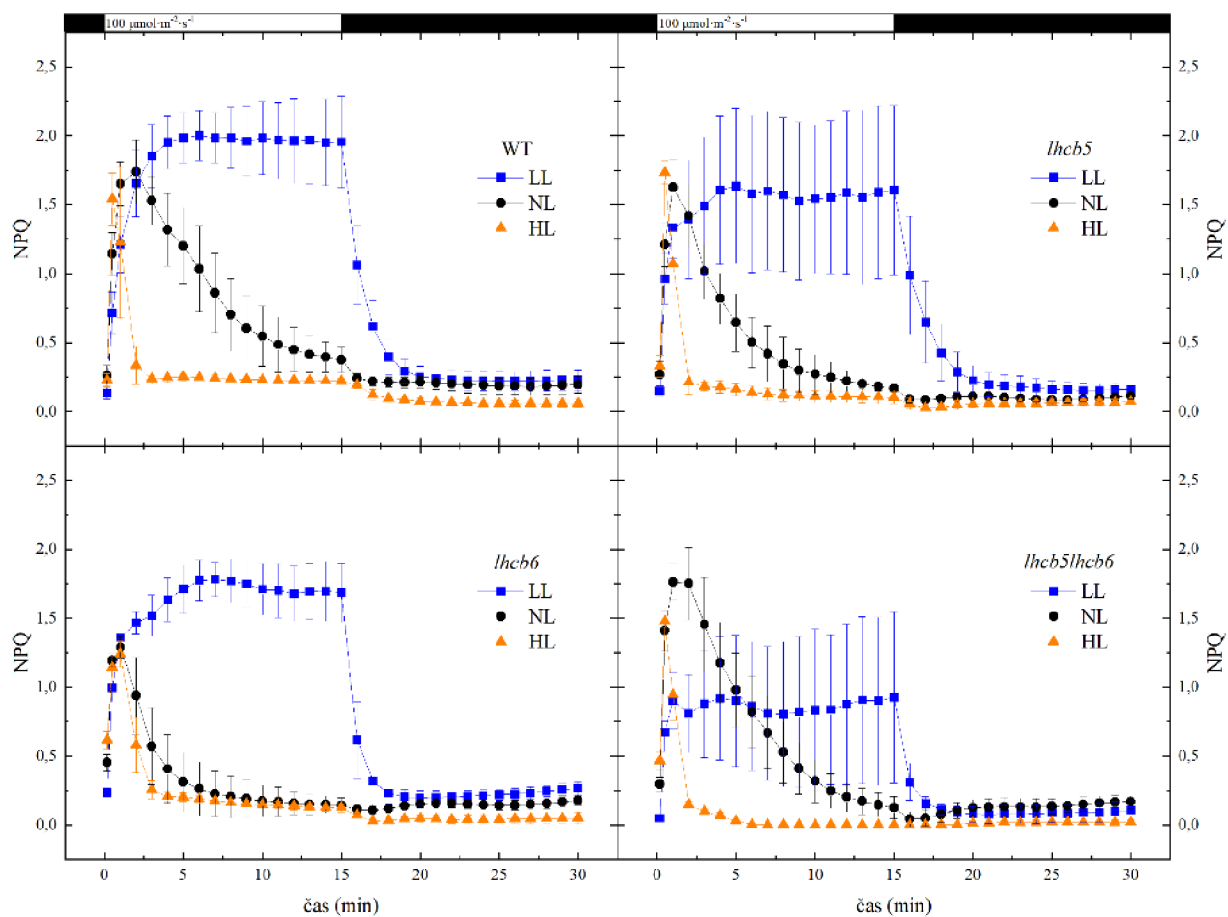


Obrázek 20. Kinetiky fotosyntetických parametrů (Y(I), Y(II), Y(ND), Y(NA), NPQ) rostlin aklimovaných na nízkou intenzitu světla (LL) s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5kolhcb6*. (viz legenda u Obr. 17) aktinické světlo ($800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, $n=4$.

HL



Obrázek 21. Kinetiky fotosyntetických parametrů (Y(I), Y(II), Y(ND), Y(NA), NPQ) rostlin aklimovaných na vysokou intenzitu světla (HL) s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5kolhcb6*. (viz legenda u Obr. 17) aktinické světlo ($800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, $n = 4$.



Obrázek 22. Kinetiky fotosyntetických NPQ rostlin aklimovaných na LL, NL, HL s genotypy: WT (divoký typ), *lhc5*, *lhc6*, *lhc5kolhcb6*. (viz legenda u Obr. 17) aktinické světlo ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, $n=4$.

5 ZÁVĚR

V této práci byly studovány vlastnosti fotosystémů rostlin *Arabidopsis thaliana* s absencí jedné nebo obou minoritních světlosběrných antén fotosystému II LHCB5 nebo LHCB6. Tyto rostliny byly aklimovány na různé světelné intenzity. Z listů rostlin byly izolovány fotosyntetické pigmenty, stanoven jejich obsah a byly změřeny fotosyntetické parametry fotosystémů s použitím přístrojů PEA metr a Dual-PAM 100. V případě neaklimovaných rostlin nebyly pozorovány výrazné rozdíly ve viditelném fenotypu, složení pigmentů, hmotnosti růžic, TR_0/RC ani ve „steady state“ hodnotě nefotochemického zhášení mezi divokým typem a pozorovanými mutanty, což souhlasí s předchozí studií (Ilíková *et al.*, 2021). Rostliny mutanta *lhcb6* vykazovaly narušený transport elektronů mezi fotosystémem II a I, což dokládá dřívější dosažení ustáleného stavu $P700^+$ a vyšší hodnoty $Y(ND)$, oproti divokému typu, což je v souladu s literaturou (De Bianchi *et al.*, 2008; Ilíková *et al.*, 2021). Tento jev je způsoben krystalovými poli superkomplexů II C_2S_2 , které brání transportu plastochinonu z PSII na cytochrom b_6f komplex (Ilíková *et al.*, 2021). Rostliny mutanta *lhcb5* neměly pozměněný elektronový transport ve srovnání s divokým typem. V případě mutanta *lhcb5lhcb6* byl pozorován částečný návrat kinetiky, dosažení ustáleného stavu $P700^+$ ke kinetice pozorované u divokého typu, avšak hodnoty $Y(ND)$ dosahovaly u mutanta *lhcb5lhcb6* podobných hodnot jako hodnoty u *lhcb6*. Mutant *lhcb5lhcb6* netvoří krystalová pole z C_2S_2 (De Bianchi *et al.*, 2008), což naznačuje, že se v mutantu *lhcb5lhcb6* nachází větší množství menších superkomplexů (bez LHCB5 a LHCB6), které pravděpodobně díky přítomnosti LHCB4 zabraňují tvorbě krystalových polí. Podobný „návrat“ u *lhcb5lhcb6* byl pozorován pro parametr NPQ. Zatímco *lhcb6* vykazoval bifázický průběh NPQ, u *lhcb5lhcb6* byl pozorován monofázický průběh jako u divokého typu.

Všichni pozorovaní mutanti vykazovali snížení parametru F_v/F_M ve všech aklimačních variantách. Všichni pozorovaní mutanti měli parametr TR_0/RC zvýšený při aklimaci na LL, stejný bez aklimace a snížený při aklimaci na HL. Tyto dva jevy jsou spojeny s větším výskytem menších superkomplexů PSII a větším výskytem „loosely bound“ LHCBII, které mohou na PSII superkomplexy přenášet excitační energii (Ilíková *et al.*, 2021). Při vyšší intenzitě excitace dochází k degradaci nebo zhášení excitací u těchto LHCBII (Štroch *et al.*, 2022). U divokého typu byly pozorovány různé průběhy NPQ u jednotlivých aklimačních variant, které odráží různou připravenost těchto

aklimačních variant na tuto intenzitu záření. Typicky aklimace rostlin na vyšší intenzitu světla zvyšuje kapacitu pro NPQ, což vede při limitující intenzitě světla ($800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) k vyšším hodnotám NPQ u HL rostlin oproti NL rostlinám. V případě mutanta *lhcb6* byly pozorovány podobné absolutní hodnoty parametru NPQ mezi aklimačními variantami NL a HL tohoto mutanta, a to při všech použitých intenzitách aktinického světla. Toto atypické chování NPQ nedoprovází pokles Y (II), což naznačuje, že je u tohoto mutanta přítomná nějaká forma dlouhodobého zhášení qI, tím pádem poměr dynamicky se měnící komponenty nefotochemického zhášení qE není tak vysoký. Tento fenomén je podobný funkci NPQ při aklimaci na vysokou intenzitu světla u smrku, u kterého také není přítomný LHCB6 (Štroch *et al.*, 2022). Toto dlouhodobé zhášení v kombinaci s narušeným elektronovým transportem může být zodpovědné za menší fenotyp a menší průměrnou váhu růžic mutantu *lhcb6*. Toto pozorování mutantů aklimovaných na vyšší intenzitu světla jsou podobné výsledkům publikovaných v (De Bianchi *et al.*, 2008). Překvapivým zjištěním byla výrazně zvýšená koncentrace fotosyntetických pigmentů u všech pozorovaných mutantů a vysoký poměr chlorofylů a/b u těchto mutantů. Tato vyšší koncentrace pigmentů může být kompenzačním mechanismem těchto mutantů, u kterých je zvýšený výskyt menších forem superkomplexů PSII.

6 LITERATURA

- Albanese, P., Manfredi, M., Meneghesso, A., Marengo, E., Saracco, G., Barber, J., Morosinotto, T., & Pagliano, C. (2016). Dynamic reorganization of photosystem II supercomplexes in response to variations in light intensities. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(10), 1651–1660. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.06.011>
- Anderson, J. M. (1986). Structure of Thylakoid Membranes. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 37, 93–136.
- Andersson, J., Walters, R. G., Horton, P., & Jansson, S. (2001). Antisense inhibition of the photosynthetic antenna proteins CP29 and CP26: Implications for the mechanism of protective energy dissipation. *Plant Cell*, 13(5), 1193–1204. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.5.1193>
- Andersson, J., Wentworth, M., Walters, R. G., Howard, C. A., Ruban, A. V., Horton, P., & Jansson, S. (2003). *Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II ± effects on photosynthesis, grana stacking and thylakoid membrane fluidity*. 350–361. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01811.x>
- Ballottari, M., Girardon, J., Betterle, N., Morosinotto, T., & Bassi, R. (2010). Identification of the chromophores involved in aggregation-dependent energy quenching of the monomeric photosystem II antenna protein Lhcb5. *Journal of Biological Chemistry*, 285(36), 28309–28321. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.124115>
- Caffarri, S., Kouřil, R., Kerešič, S., Boekema, E. J., & Croce, R. (2009). Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO Journal*, 28(19), 3052–3063. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.232>
- Cazzaniga, S., Kim, M., Bellamoli, F., Jeong, J., Lee, S., Perozeni, F., Pompa, A., Jin, E. S., & Ballottari, M. (2019). Photosystem II antenna complexes CP26 and CP29 are essential for nonphotochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell and Environment*, 43(2), 496–509. <https://doi.org/10.1111/pce.13680>
- Croce, R., & Van Amerongen, H. (2014). Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nature Chemical Biology*, 10(7), 492–501. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1555>
- 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. *Plant Cell*, 17(4), 1217–1232. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.030601>
- 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(April). <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.33>
- De Bianchi, S., Betterle, N., Kouřil, R., Cazzaniga, S., Boekema, E., Bassi, R., & Dall’Osto, L. (2011). Arabidopsis mutants deleted in the light-harvesting protein Lhcb4 have a disrupted photosystem II macrostructure and are defective in photoprotection. *Plant Cell*, 23(7), 2659–2679. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087320>
- 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. *Plant Cell*, 20(4), 1012–1028. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055749>

- Fernandez-Jaramillo, A. A., Duarte-Galvan, C., Contreras-Medina, L. M., Torres-Pacheco, I., Romero-Troncoso, R. de J., Guevara-Gonzalez, R. G., & Millan-Almaraz, J. R. (2012). Instrumentation in developing chlorophyll fluorescence biosensing: A review. *Sensors (Switzerland)*, *12*(9), 11853–11869. <https://doi.org/10.3390/s120911853>
- Gao, S., Zheng, Z., Wang, J., & Wang, G. (2020). Slow zeaxanthin accumulation and the enhancement of CP26 collectively contribute to an atypical non-photochemical quenching in macroalga *Ulva prolifera* under high light. *Journal of Phycology*, *56*(2), 393–403. <https://doi.org/10.1111/jpy.12958>
- Horton, P., Ruban, A. V., & Walters, R. G. (1996). *Regulation of Light Harvesting in Green Plants ' Indication by Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence*. December 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.655>
- Ilíková, I., Ilík, P., Opatíková, M., Arshad, R., Nosek, L., Karlický, V., Kucerová, Z., Roudnický, P., Pospíšil, P., Lazar, D., Bartoš, J., & Kouřil, R. (2021). Towards spruce-type photosystem II: Consequences of the loss of light-harvesting proteins LHCB3 and LHCB6 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *187*(4), 2691–2715. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab396>
- Jahns, P., Latowski, D., & Strzalka, K. (2009). Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1787*(1), 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.09.013>
- Johnson, M. P. (2016). Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, *60*(3), 255–273. <https://doi.org/10.1042/EBC20160016>
- Johnson, M. P. (2020). Just the essentials: Photoprotective energy dissipation pared-down. *Journal of Experimental Botany*, *71*(12), 3380–3382. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa164>
- Johnson, M. P., & Ruban, A. V. (2010). *Arabidopsis* plants lacking PsbS protein possess photoprotective energy dissipation. *Plant Journal*, *61*(2), 283–289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04051.x>
- Khan, N., Essemine, J., Hamdani, S., Qu, M., Lyu, M. J. A., Perveen, S., Stirbet, A., Govindjee, G., & Zhu, X. G. (2021). Natural variation in the fast phase of chlorophyll a fluorescence induction curve (OJIP) in a global rice minicore panel. *Photosynthesis Research*, *150*(1–3), 137–158. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00794-z>
- 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*(3), 808–814. <https://doi.org/10.1111/nph.13947>
- Kouřil, R., Oostergetel, G. T., & Boekema, E. J. (2011). Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1807*(3), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.007>
- 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 - Bioenergetics*, *1827*(3), 411–419. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.003>
- Kouřil, R., Zygadlo, A., Arteni, A. A., De Wit, C. D., Dekker, J. P., Jensen, P. E., Scheller, H. V., & Boekema, E. J. (2005). Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry*, *44*(33), 10935–10940. <https://doi.org/10.1021/bi051097a>

- Kovács, L., Damkjær, J., Kerešiče, S., Ilioaia, 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. *Plant Cell*, *18*(11), 3106–3120. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045641>
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B. B., & Niyogi, K. K. (2009). Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology*, *60*, 239–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103844>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, *148*(C), 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Liguori, N., Croce, R., Marrink, S. J., & Thallmair, S. (2020). Molecular dynamics simulations in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, *144*(2), 273–295. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00741-y>
- Meyerowitz, E. M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics*, *21*(1), 93–111. <https://doi.org/10.7868/s0015330316060105>
- 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*(2), 249–293. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00002>
- Moosavi-nezhad, M., Salehi, R., Aliniaiefard, S., Tsaniklidis, G., Woltering, E., Fanourakis, D., & Li, T. (2021). Blue light during healing and acclimatization of grafted watermelon seedlings improves vigor, leaf pigmentation and photosynthetic performance. *Plant Physiology and Biochemistry* *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms22158043>
- Müller, P., Li, X. P., & Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, *125*(4), 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>
- Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, *64*(13), 3983–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Murchie, E. H., & Ruban, A. V. (2020). Dynamic non-photochemical quenching in plants: from molecular mechanism to productivity. *Plant Journal*, *101*(4), 885–896. <https://doi.org/10.1111/tpj.14601>
- Nelson, N., & Junge, W. (2015). Structure and energy transfer in photosystems of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *84*, 659–683. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-092914-041942>
- Nicol, L., Nawrocki, W. J., & Croce, R. (2019). Disentangling the sites of non-photochemical quenching in vascular plants. *Nature Plants*, *5*(11), 1177–1183. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0526-5>
- Nosek, L., Semchonok, D., Boekema, E. J., Ilik, P., & Kouřil, R. (2017). Structural variability of plant photosystem II megacomplexes in thylakoid membranes. *Plant Journal*, *89*(1), 104–111. <https://doi.org/10.1111/tpj.13325>
- O'Malley, R. C., Barragan, C. C., & Ecker, J. R. (2015). HHMI Author Manuscript A User's Guide to the *Arabidopsis* T-DNA Insertional Mutant Collections. *Methods in Molecular Biology*, 323–342.

- Peng, X., Deng, X., Tang, X., Tan, T., Zhang, D., Liu, B., & Lin, H. (2019). Involvement of lhcb6 and lhcb5 in photosynthesis regulation in *Physcomitrella patens* response to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms20153665>
- Pfündel, E., Klughammer, C., & Schreiber, U. (2008). Monitoring the effects of reduced PS II antenna size on quantum yields of photosystems I and II using the Dual-PAM-100 measuring system. *PAM Application Notes*, 1, 21–24. <http://www.walz.com/>
- Ruban, A. V. (2016). Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiology*, 170(4), 1903–1916. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01935>
- Schumann, T., Paul, S., Melzer, M., Dörmann, P., & Jahns, P. (2017). Plant growth under natural light conditions provides highly flexible short-term acclimation properties toward high light stress. *Frontiers in Plant Science*, 8(May), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00681>
- Štroch, M., Karlický, V., Ilík, P., Ilíková, I., Opatíková, M., Nosek, L., Pospíšil, P., Svrčková, M., Rác, M., Roudnický, P., Zdráhal, Z., Špunda, V., & Kouřil, R. (2022). Spruce versus Arabidopsis: different strategies of photosynthetic acclimation to light intensity change. *Photosynthesis Research*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11120-022-00949-0>
- Tokutsu, R., Kato, N., Bui, K. H., Ishikawa, T., & Minagawa, J. (2012). Revisiting the supramolecular organization of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(37), 31574–31581. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331991>
- Van Amerongen, H., & Croce, R. (2013). Light harvesting in photosystem II. *Photosynthesis Research*, 116(2–3), 251–263. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9824-3>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

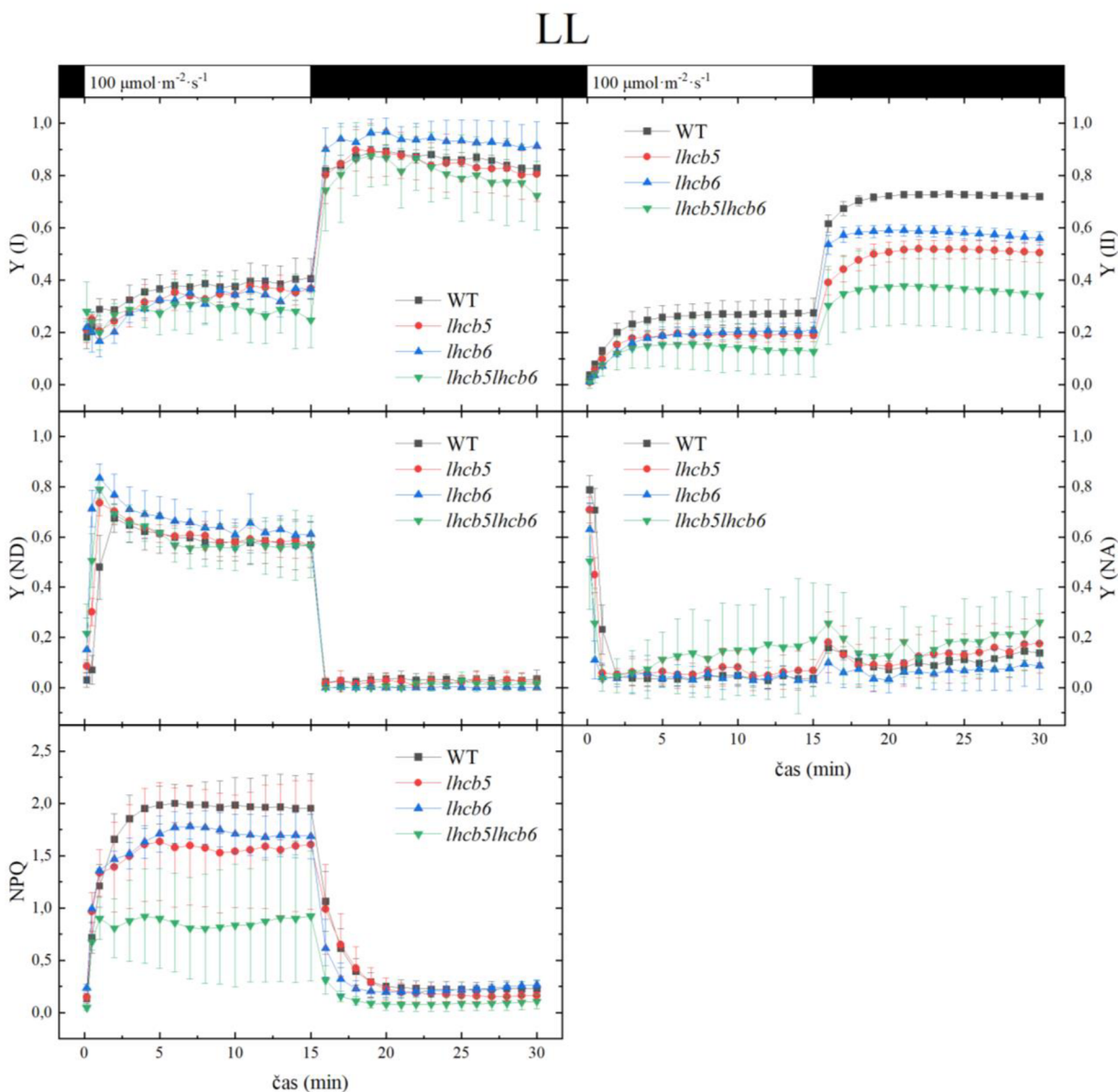
a. u.	„arbitrary units“
ATP	Adenosintrifosfát
Car	karotenoid
CP	chlorofyl vázající protein
Cyt b ₆ f	Cytochrom b ₆ f komplex
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
F	fluorescence
F'	fluorescence po dosažení ustáleného stavu fluorescence
F _d	ferredoxin
F _I	fluorescence naměřená 30 ms po zapnutí saturačního pulsu
F _J	fluorescence naměřená 2 ms po zapnutí saturačního pulsu
F _M	maximální fluorescence chlorofylu
F _M '	maximální fluorescence chlorofylu na světle
FNR	Fd-NADP ⁺ -oxidoreduktáza
F _O	minimální fluorescence chlorofylu
F _O '	minimální fluorescence chlorofylu na světle
F _V /F _M	maximální kvantový výtazek fotochemie fotosystému II
HL	vysoká intenzita osvětlení
HRP	křenová peroxidáza
Chl	chlorofyl
LHC	světlosběrný komplex
LHCII	světlosběrný komplex fotosystému II
LL	nízká intenzita osvětlení
NAPDH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NL	standardní intenzita osvětlení
NoM	mutant <i>Arabidopsis thaliana</i> bez minoritních světlosběrných antén
NPQ	nefotochemické zhášení

OEC	komplex vyvíjející kyslík
P	signál P700
P680	pár chlorofylů 680 na PSII
P700	pár chlorofylů 700 na PSI
PAM	pulzní amplitudová modulace
PC	plastocyanin
PEA	„Plant Efficient Analyzer“
P_M	maximální signál P700
P_M'	maximální signál P700 na světle
PQ	plastochinon
PQH_2	plastochinol
PsbS	podjednotka S fotosystému II
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
Q_A	plastochinon v místě A
Q_B	plastochinon v místě B
qE	zhášení závislé na energii
qI	fotoinhibiční zhášení
qP	fotochemické zhášení
qT	zhášení závislé na stavových přechodech spojených s přesunem světlosběrných antén z mezi PSII a PSI
RC	reakční centrum
ROS	reaktivní formy kyslíku
r. u.	„relative units“
SD	výběrová směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
T-DNA	transferová DNA
Ti-plazmid	tumor-indikující plazmid
TR_0/RC	energetický tok zachycený na jedno reakční centrum
VDE	violaxantin de-epoxidáza

V	relativně variabilní fluorescence
V _I	relativně variabilní fluorescence naměřená 30 ms po zapnutí saturačního pulsu
V _J	relativně variabilní fluorescence naměřená 2 ms po zapnutí saturačního pulsu
WT	divoký typ
ZE	zeaxantin epoxidáza

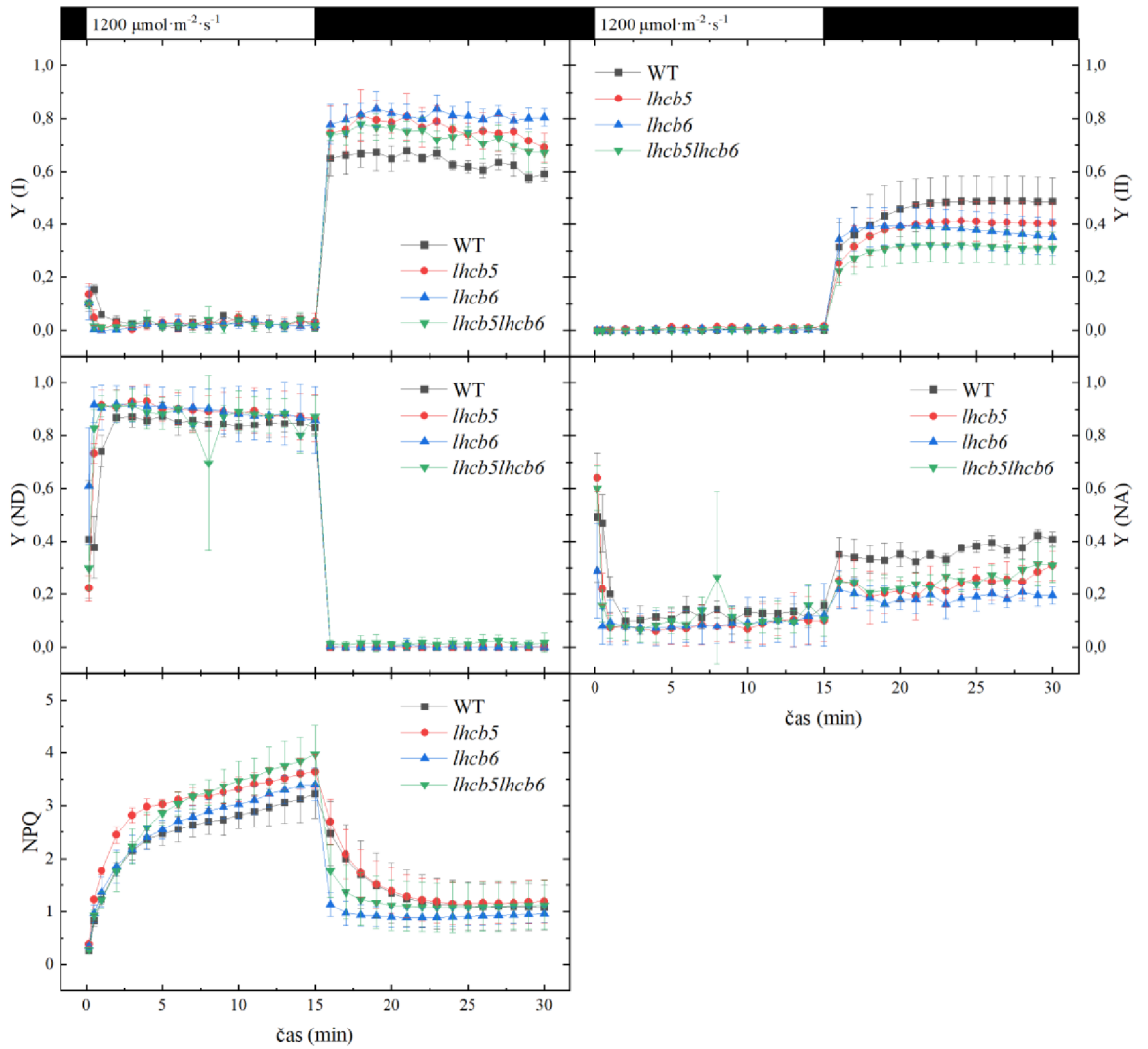
8 PŘÍLOHY

Pomocí přístroje Dual-PAM 100 byla provedena kompletní charakteristika vlastností fotosystému mutantů pozorovaných v této práci při třech intenzitách aktinického světla. Avšak kvůli podobnosti z některých měření nebo nejednoznačné interpretaci nebyly v hlavní části práce zahrnuty všechny grafy těchto měření.



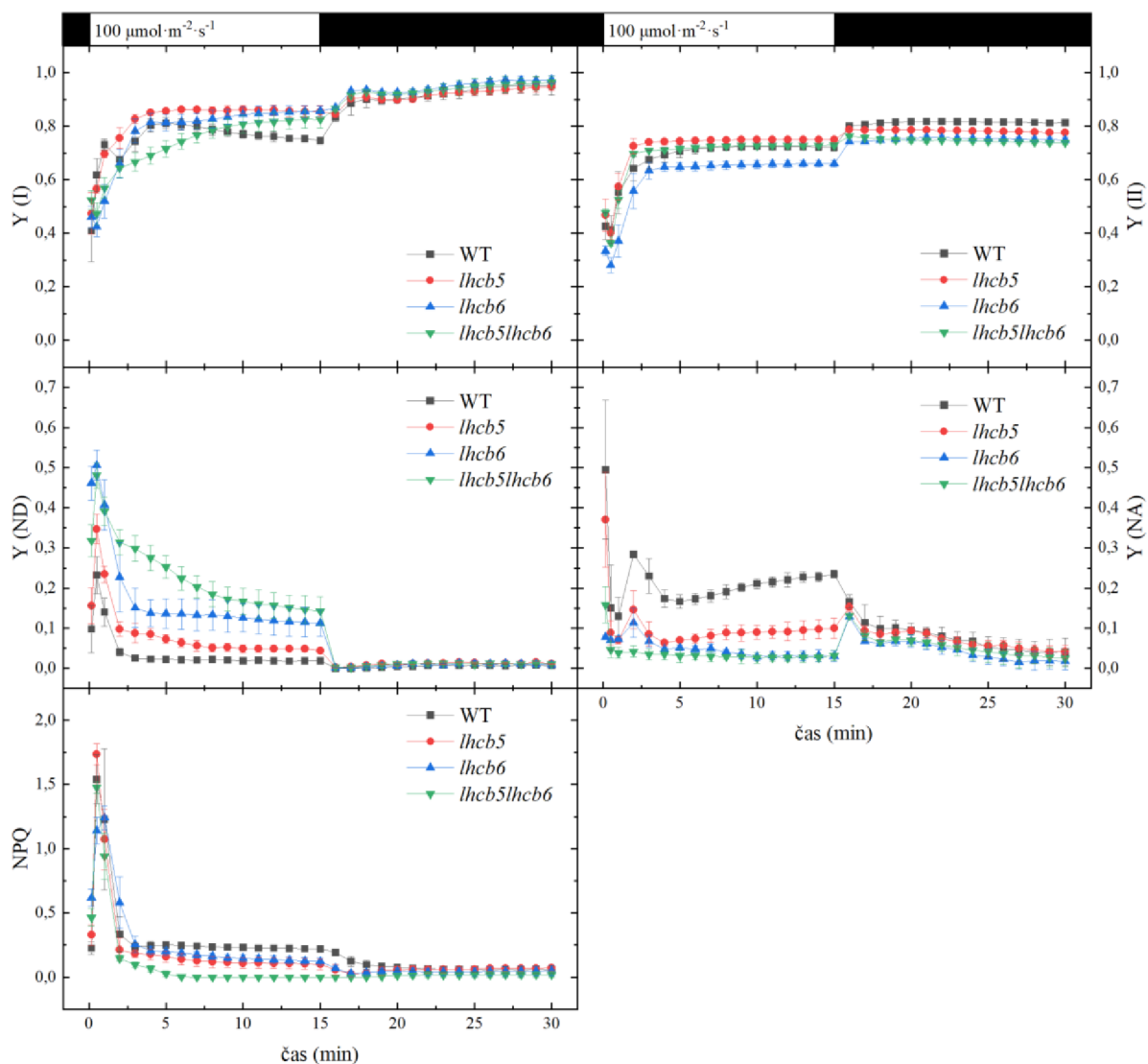
Příloha 1. Kinetiky fotosyntetických parametrů ($Y(I)$, $Y(II)$, $Y(ND)$, $Y(NA)$, NPQ) rostlin aklimovaných na nízkou intenzitu světla (LL) s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5kolhcb6*. (viz legenda u obr. 17) aktinické světlo ($100 \mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, $n=4$.

LL



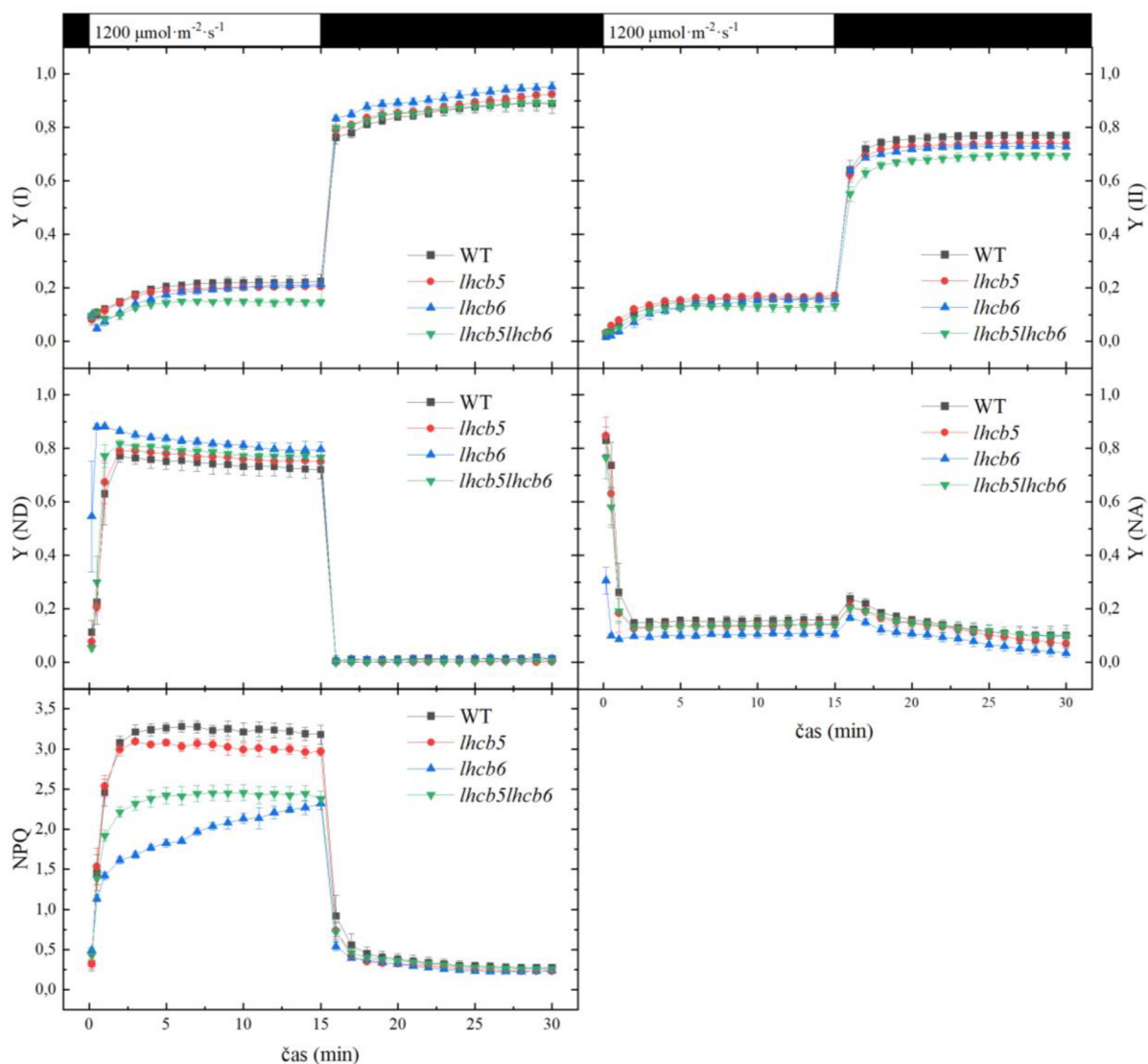
Příloha 2. Kinetiky fotosyntetických parametrů (Y(I), Y(II), Y(ND), Y(NA), NPQ) rostlin aklimovaných na nízkou intenzitu světla (LL) s genotypy: WT (divoký typ), *lhc5*, *lhc6*, *lhc5kolhcb6*. (viz legenda u obr. 17) aktinické světlo ($1200 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, $n = 4$.

HL

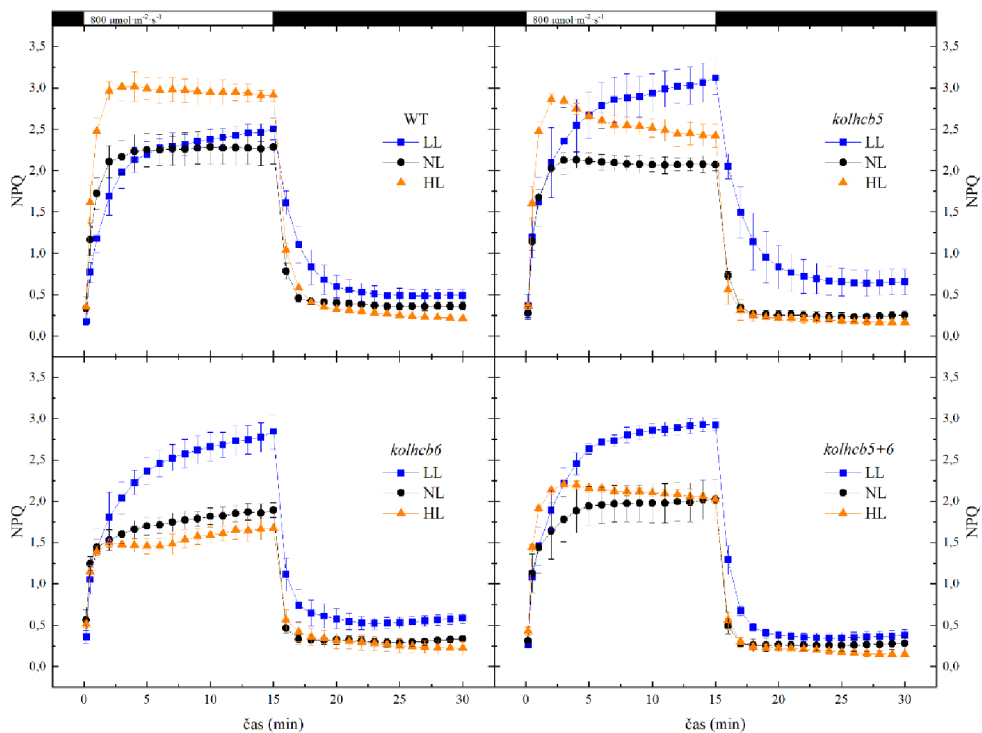


Příloha 3. Kinetiky fotosyntetických parametrů (Y(I), Y(II), Y(ND), Y(NA), NPQ) rostlin aklimovaných na nízkou intenzitu světla (HL) s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5kolhcb6*. (viz legenda u obr. 17) aktinické světlo ($100 \mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, $n=4$.

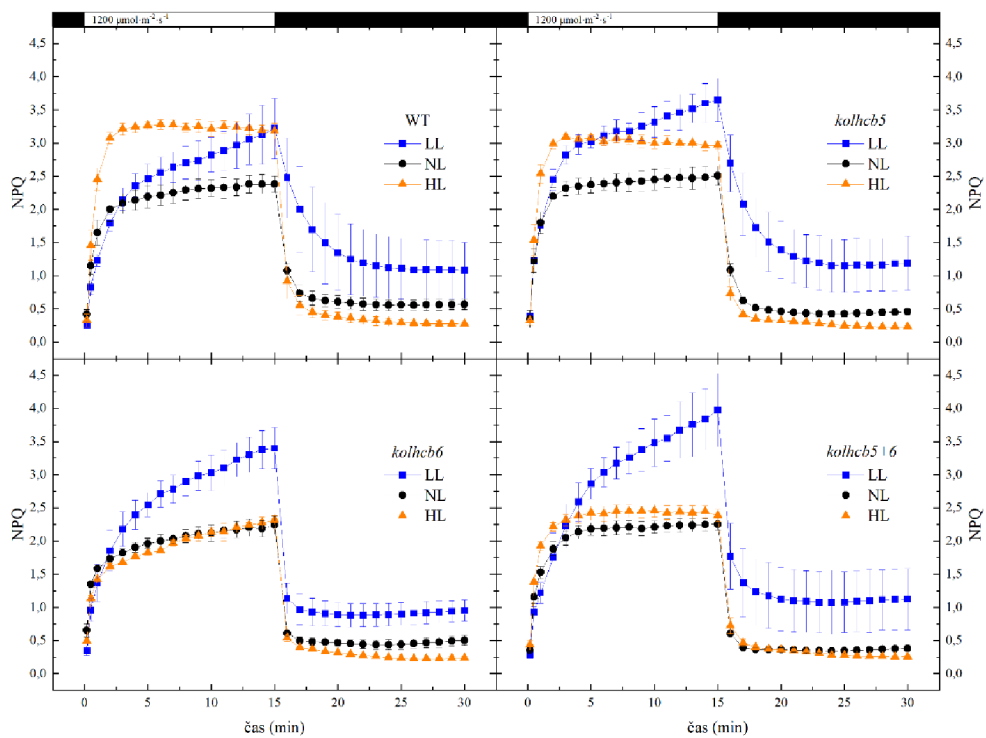
HL



Příloha 4. Kinetiky fotosyntetických parametrů (Y(I), Y(II), Y(ND), Y(NA), NPQ) rostlin aklimovaných na nízkou intenzitu světla (HL) s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5kolhcb6*. (viz legenda u obr. 17) aktinické světlo ($1200 \mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, n= 4.



Příloha 5. Kinetiky fotosyntetických NPQ rostlin aklimovaných na LL, NL, HL s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5kolhcb6*. (viz legenda u obr. 17) aktinické světlo ($800 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, $n = 4$.



Příloha 6. Kinetiky fotosyntetických NPQ rostlin aklimovaných na LL, NL, HL s genotypy: WT (divoký typ), *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb5kolhcb6*. (viz legenda u obr. 17) aktinické světlo ($1200 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, $n = 4$.