**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

# Diplomová práce

**2018** **Bc. Filip Charvát**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**
**Přírodovědecká fakulta**

# Efektivní velikost světlosběrných antén a její význam pro regulaci fotosyntézy.

Diplomová práce

**Bc. Filip Charvát**

Školitel: Mgr. Radek Kaňa, Ph.D.

České Budějovice 2018

Bibliografické údaje:

Charvát F., 2018: Efektivní velikost světlosběrných antén a její význam pro regulaci fotosyntézy. [The effective size of the light harvesting antenna and its influence on photosysnthesis regulation. Mgr. Thesis, in Czech] – 69 str., Centrum Algatech, Institut Mikrobiologie, Akademie Věd České Republiky, Jihočeská Univerzita, České Budějovice, Česká Republika

Anotace

Nefotochemické zhášení a stavové přechody jsou důležitými obrannými mechanizmy před nadměrným světelným stresem. V této práci jsem studoval změny v efektivní velikosti světlosběrných antén fotosystému II v závislosti na úrovni nefotochemického zhášení (stavových přechodů) pro různé úrovně světlem vyvolaného stresu.

Abstract

Non−photochemical quenching and state transitions are an important photoprotective mechanism against excessive irradiation. In this work I studied changes in the size of the effective cross−section of photosystem II antennae in regard to the level of non−photochemical quenching (state transitions) under different levels of light induced stress.

Granty

Práce byla finančně podpořena Českou vědeckou nadací GAČR 16−10088S, 17−02363Y a institučním projektem Algatech Plus (MSMT LO1416) a Algamic (CZ 1.05/2.1.00/19.0392) poskytnutého Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České Republiky.

**Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 17. 4. 2018 ……

Filip Charvát

**Poděkování**

Rád bych poděkoval mému školiteli Mgr. Radku Kaňovi, Ph.D. za jeho cenné připomínky a čas, který strávil s pomocí řešení vyskytlých se problémů.

Rád bych také poděkoval Erice Belgio, Ph.D. za cenné rady při měření s Dual PAM fluorometrem a za čas, který strávila se mnou nad konzultacemi výsledků.

Rád bych také poděkoval Anně Yeates, Ph.D. za vyhodnocení dat z HPLC.

Rád bych také podějoval Mgr. Barboře Šedivé za korekce v této práci.

Chtěl bych také poděkovat prof., RNDr. Ondřeji Prášilovi, Ph.D. za to, že mi umožnil pracovat v centru Algatech v průběhu mého studia.

Chtěl bych poděkovat všem pracovníkům z centra Algatech za přívětivý přístup a celkovou příjemnou atmosféru.

Také bych chtěl poděkovat mé rodině za trpělivost a celkovou podporu v době studia.

# Obsah

1 Úvod a cíle ..... 1

2 Fotosyntéza ..... 1

2.1 Chloroplast ..... 3

2.2 Reakční centra ..... 4

2.2.1 Fotosystém II ..... 5

2.2.2 Fotosystém I ..... 6

3 Fluorescence ..... 7

3.1 Minimální fluorescence chlorofylu *a* ..... 7

3.2 Maximální fluorescence chlorofylu *a* ..... 8

3.3 Maximální kvantový výtěžek fotosystému II ..... 8

3.4 Jedno−obrátkové záblesky ..... 8

3.5 Mnoho−obrátkové záblesky ..... 9

4 Stavové přechody ..... 9

5 Nefotochemické zhášení ..... 10

6 Měření fluorescence chlorofylu *a* a velikosti světlosběrných antén ..... 11

7 Materiály a metody ..... 13

7.1 Modelové organizmy ..... 13

7.1.1 Sinice ..... 13

7.1.2 Řasy ze skupiny SAR ..... 14

7.1.3 Zelené řasy ..... 15

7.1.4 Vyšší rostliny ..... 15

7.2 PAM fluorometrie ..... 16

7.3 FRR fluorometrie ..... 18

7.4 Stanovení koncentrace chlorofylů ve vzorku ..... 20

7.5 Stanovení úrovně epoxidace xantofylů ..... 21

8 Výsledky ..... 22
8.1 Testování role aktinického světla na měření metodou FRR fluorescence ..... 22
8.2 Měření stavových přechodů u sinic ..... 25
8.3 Kinetika rychlých změn $\sigma$ během protokolu pro vyvolání stavových přechodů ..... 29
8.4 Porovnání procesu NPQ a jeho korelace se $\sigma$ u různých fotosyntetických organizmů ..... 31
8.5 Porovnání $\sigma$ s úrovní NPQ u špenátu setého ..... 36
9 Diskuze ..... 46
10 Závěr ..... 52
11 Přehled použité literatury ..... 53
12 Přílohy ..... 61

## Použité zkratky

NPQ – Nefotochemické zhášení (anglicky:Non-photochemical quenching)

$\sigma$ – efektivní velikost světlosběrných antén fotosystému II

$p$ – konektivita reakčních center

$F_V/F_M$ − Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II

$F_M^{ST}$ – úroveň maximální fluorescence pro jedno−obrátkový záblesk

$F_M^{MT}$ – úroveň maximální fluorescence pro mnoho−obrátkový záblesk

$F_0$ – úroveň minimální fluorescence

$F_t$ − aktuální úroveň fluorescence chlorofylu *a* za dané ozářenosti aktinickám světlem

$F_M'^{ST}$ – úroveň maximální fluorescence pro jedno−obrátkový záblesk při aktinickém světle

$F_M'^{MT}$ – úroveň maximální fluorescence pro mnoho−obrátkový záblesk při aktinickém světle

$F_0'$ – úroveň minimální fluorescence při aktinickém světle

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

RuBisCO – ribulóza−1,5−bisfosfát karboxyláza / oxygenáza

ATP – adenozin trifosfát

PS II – fotosystém II

PS I – fotosystém I

P680 – reakční centrum fotosystému II

LED – světlo emitující dioda

PIN dioda – dioda s přirozeným polovodičem mezi P a N polovodičovými typy

PFA – před zábleskovà adaptace (anglicky: Pre-flash adaptation)

ST – jednoobrátkový saturující záblesk (anglicky: Single−turnover (ST) flash)

MT − mnoho−obrátkový saturující záblesk (anglicky: Multiple turnover (MT) flash)

DCMU – inhibitor 3−(3,4−dichlorophenyl)−1,1−dimethylurea

HPLC – (High−Performance Liquid Chromatography) je druh chromatografie

FRRF – (Fast Repetition Rate Fluorimetry) je způsob měření fluorescence chlorofylu *a*

FIRe – (Fluorescence Induction and Relaxation) je způsob měření fluorescence chlorofylu *a*

OCP – oranžový karotenový protein (anglicky: Orange Carrotenoid Protein)

PAM – (Pulse Amplitude Modulation) je způsob měření fluorescence chlorofylu *a*

AAL – oranžové aktinické světlo (anglicky: Amber Actinic Light)

BAL – modré aktinické světlo (anglicky: Blue Actinic Light)

$Q_A$ – vázaný plastochynon ve fotosystému II

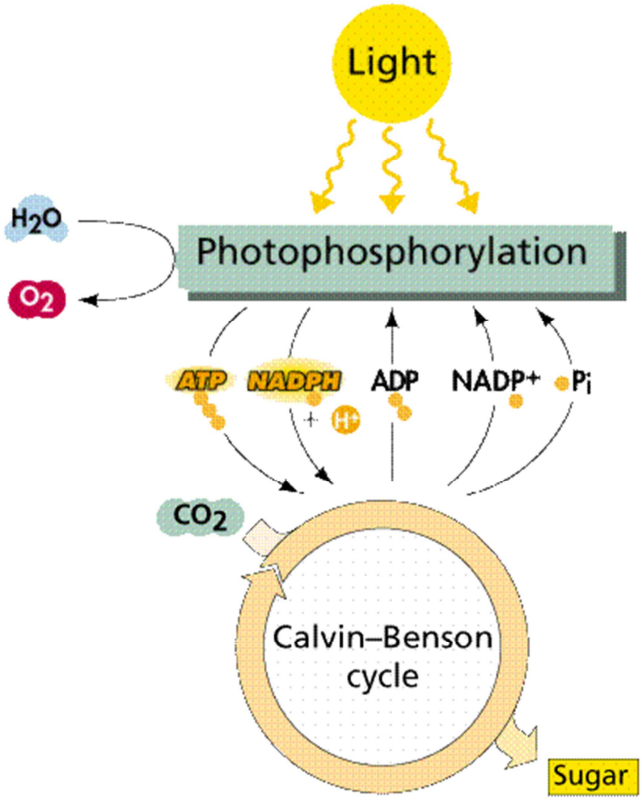
# 1 Úvod a cíle

Organizmy schopné fotosyntézy představují důležitý článek ekosystému planety a formují život, tak jak ho známe. Tyto organizmy jsou schopné využívat světelnou energii k životu (Nelson and Yocum 2006). Je důležité tomuto procesu kompletně porozumět, protože tuto informaci je možné využít ke zvýšení efektivity produkce potravy (Kromdijk, Glowacka et al. 2016) a energie (Saldrnoto, Kornienko et al. 2017), které jsou pro budoucnost naší populace nezbytné.

V této práci jsem prozkoumal možnost měření $\sigma$ v průběhu aktinického světla, což je nezbytné při studiu změn $\sigma$ při stavových přechodech a procesu NPQ. Upravil jsem protokol pro měření stavových přechodů a procesu NPQ, aby bylo možné provést měření velikosti $\sigma$. Otestoval jsem PFA, která byla mým řešením jak provést měření. Prozkoumal jsem proces stavových přechodů na sinici *Synechocystis* PCC 6803 a jejích mutantních kmenech s pozměněnou funkcí fykobilisomů. Prozkoumal jsem rychlé kinetiky $\sigma$ při změnách v aktinickém světle z důvodu neočekávaného a zajímavého průběhu. Proměřil jsem velikost $\sigma$ a $F_M^{ST}$ při procesu NPQ u různých organizmů a porovnal výsledky. Porovnal jsem velikost $\sigma$ měřenou metodou jedno−obrátkových záblesků FRRF (Kolber, Prasil et al. 1998) s úrovní NPQ měřenou metodou mnoho−obrátkových záblesků PAM (Schreiber, Klughammer et al. 2012) ve vzorcích izolovaných chloroplastů špenátu předem vystavených různým délkám světelného stresu. Pro toto měření jsem poupravil metodu izolace intaktních chloroplastů pro malý objem listů. Také jsem se pokusil zjistit úroveň epoxidace xantofylů pomocí analýzy pigmentů HPLC.

# 2 Fotosyntéza

Fotosyntéza je proces, který mění světelnou energii na energii uloženou v chemických vazbách (Nelson and Yocum 2006). Průběh fotosyntézy je rozdělen do dvou fází, světelnou fázi a temnostní fázi (Emerson and Arnold 1932) viz obrázek 1.




**Obrázek 1:** Zjednodušené schéma oxygenní fotosyntézy. Přenos energie mezi světelnou (zobrazeno jako „Photophosporylation“) a temnostní fází (zobrazeno jako „Calvin−Benson cycle“) je zprostředkován pomocí molekul NADPH a ATP. Tyto fáze jsou částečně prostorově oddělené. Světelné reakce probíhají v tylakoidní membráně a temnostní reakce ve stromatu. Obrázek přejat z (Purves 1994).

Světelná fáze je souhrn chemických reakcí, které ke svému chodu potřebují mimo jiné energii fotonů o specifické vlnové délce, kterou jsou fotosyntetické pigmenty schopné absorbovat. Výstupem světelné fáze jsou sloučeniny s vysokým redukčním potenciálem (NADPH) a vytvoření protonového gradientu přes membránu, který slouží k tvorbě dalších produktů fotosyntézy, především ATP. Tyto reakce probíhají na tylakoidní membráně (Nelson and Yocum 2006).

Chemické reakce temnostní fáze fotosyntézy nejsou přímo závislé na přítomnosti energie ve formě světelného záření. Tyto reakce využívají energeticky bohaté sloučeniny vytvořené ve světelné fázi, jež nejsou vhodné k uložení, k vytvoření jiných chemických sloučenin více vhodných k dlouhodobějšímu skladování ve formě cukrů (Bassham, Benson et al. 1950). Fotosyntéza se dá shrnout pomocí rovnice (1) formulované (van Niel, Ruben et al. 1942).

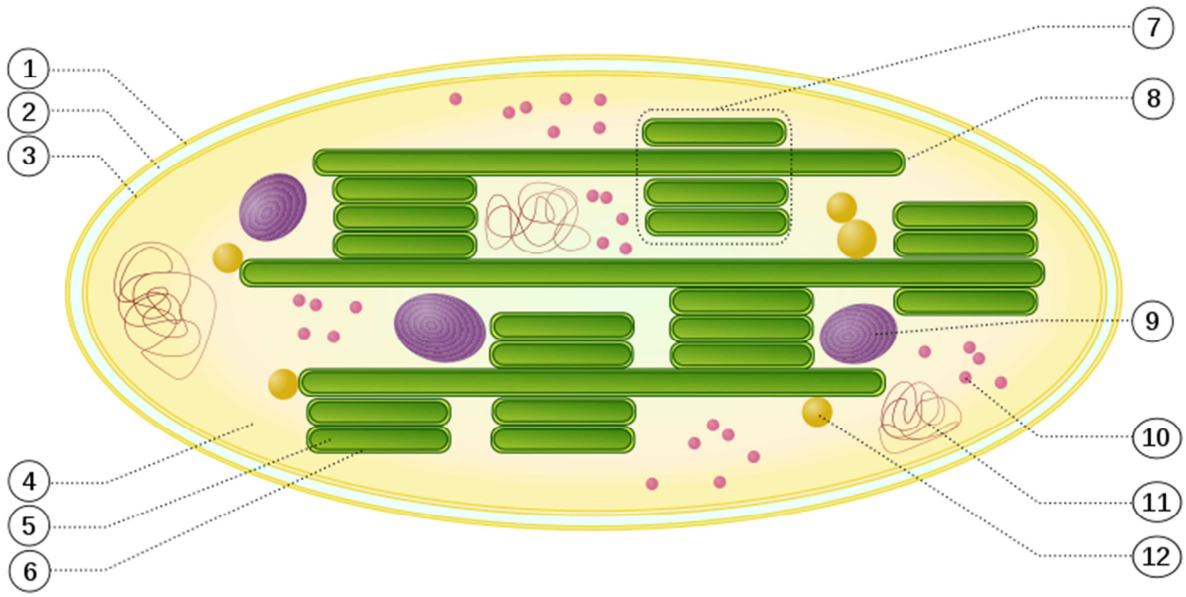
$$CO_2 + 2H_2A \xrightarrow{\text{fotony}} (-CH_2O-) + H_20 + 2A \qquad (1)$$

V rovnici (1) $-CH_2O-$ je zastoupení karbohydrátové jednotky v cukrech a $H_2A$ je zastoupení oxidovatelné látky. Z této rovnice je také patrné, že u dále zmíněné kyslíkaté fotosyntézy kyslík nepochází z oxidu uhličitého, ale z vody (Ruben, Randall et al. 1941).

Světelná fáze fotosyntézy se liší pro různé organizmy, dělí se na vyvíjející kyslík a bezkyslíkatou. U fotosyntetických organizmů vyvíjejících kyslík se jako zdroj elektronů využívá proces oxidace vody (Ruben, Randall et al. 1941), kde vzniká molekula kyslíku, látka, která je pro fotosyntézu nepotřebná, a proto se jí organizmus zbaví, a to vyloučením do okolního prostředí. Organizmy s bezkyslíkatou fotosyntézou využívají jako zdroj elektronu sirné sloučeniny, molekuly vodíku, nebo jiné organické sloučeniny (Bryant and Frigaard 2006).

## 2.1 Chloroplast

Fotosyntéza v eukaryotních organizmech probíhá v chloroplastech. Chloroplast je organela s dvojitou vnější membránou obsahující strukturu tylakoidních membrán ve formě gran propojených lamelami (Procházka, Macháčková et al. 1998). Grana jsou naskládané disky formované z tylakoidní membrány. Jednotlivá grana jsou propojená lamelami, což jsou stromální tylakoidy (Austin and Staehelin 2011). Tylakoidní membrány obsahují proteinové komplexy, ve kterých probíhá světelná fáze fotosyntézy (Nelson and Yocum 2006). Zbylý prostor je vyplněný stromatem, ve které probíhají temnostní fáze fotosyntézy (Procházka, Macháčková et al. 1998). Schéma chloroplastu je zobrazené v obrázku 2.

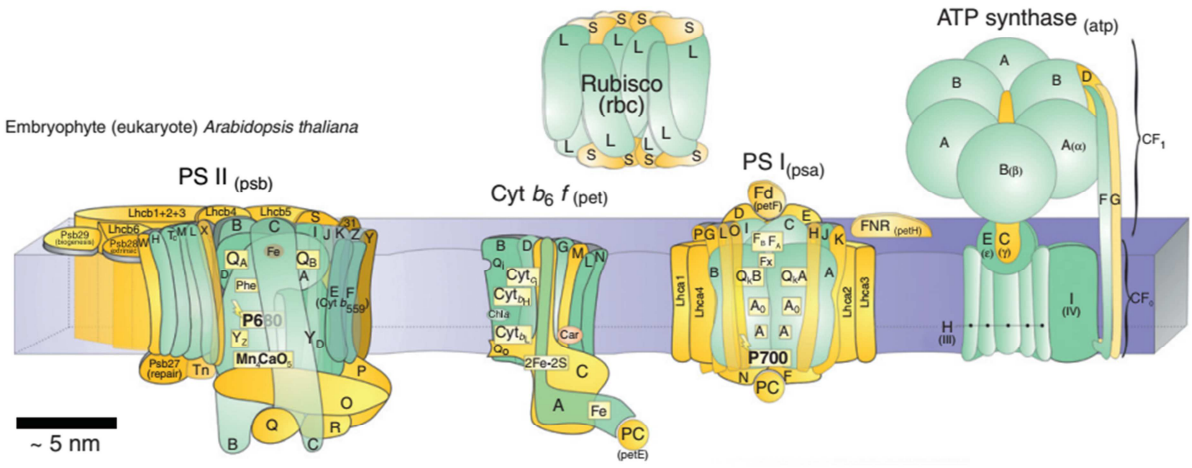



**Obrázek 2:** Schéma chloroplastu. Zobrazeny jsou: 1 vnější membrána, 2 mezimembránový prostor, 3 vnitřní membrána, 4 stroma, 5 lumen, 6 membrána tylakoidu, 7 granum, 8 lamela, 9 škrob, 10 ribozom, 11 DNA plastidu, 12 tukové kapénky. Obrázek přejat z (SuperManu 2017).

Chloroplast dále obsahuje ve stromatu chloroplastovou DNA, jež mimo jiné kóduje proteiny pro chromoplastové ribozomy, podjednotky fotosystémů, podjednotku enzymu RuBisCO a transferové RNA. Dále ve stromatu probíhá Calvin−Bensonův cyklus, ve kterém je asimilován oxid uhličitý (Procházka, Macháčková et al. 1998).

## 2.2 Reakční centra

Reakční centra jsou proteinové komplexy umístěné v tylakoidních membránách, ve kterých probíhá nábojová separace pomocí energie získané z absorbovaného fotonu.




**Obrázek 3:** Zobrazení hlavních proteinových komplexů v tylakoidní membráně. Fotosystém II (PS II), jenž stojí na začátku elektronového řetězce, cytochrom b6f komplex (Cyt b6f komplex),

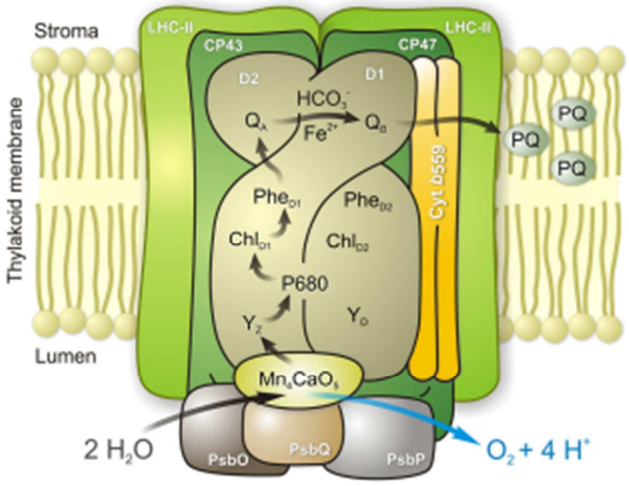
který zvyšuje množství přenesených protonů přes membránu a předává elektron z plastochinolu na plastocyanin, ten dále na fotosystém I (PS I), poslední fotosystém v elektronovém řetězci na tylakoidní membráně. ATP syntáza představuje membránový enzym, který přeměňuje proton-motivní sílu na ATP. Zobrazené RuBisCo není membránový protein a patří do Calvin−Bensonova cyklu v temnostní fázi fotosyntézy. Obrázek přejat z (Allen, de Paula et al. 2011).

V obrázku 3 jsou zobrazené hlavní proteinové komplexy tylakoidní membrány včetně reakčních center fotosystému II (PS II) a fotosystému I (PS I). Reakční centrum PS II je první v pořadí elektronového transportu. Označení je způsobeno z historických důvodů postupného objevení, kde prvně došlo k objevení reakčního centra PS I (Fromme and Mathis 2004).

### 2.2.1 Fotosystém II

Fotosystém II je proteinový komplex, ve kterém probíhají světelně závislé reakce oxygenní fotosyntézy. Vyskytuje se u sinic, prochlorofyt, řas, ruduch, různobrvek, chaluh a všech vyšších rostlin. Fotosystém II bez komplexu vyvíjecího kyslík se také vyskytuje u nesirných purpurových bakterií, které většinou využívají vodík jako zdroj elektronů (Deisenhofer and Michel 1989).

Fotosystém II umožnuje průběh dvou chemických reakcí, oxidaci vody a následné redukci plastochinonu. Energie jednoho absorbovaného fotonu slouží k provedení jedné nábojové separace, kdy dojde k přenesení elektronu z excitovaného reakčního centra (P680*) přes doplňkový chlorofyl ($Chl_{D1}$) (Prokhorenko and Holzwarth 2000) na primární akceptor feofytin (Shelaev, Gostev et al. 2008). Tento stav je velice nestabilní, a proto elektron je následně předán přes vázaný plastochinon $Q_A$ na dočasně vázaný plastochinon $Q_B$. Jednou redukovaný plastochinon $Q_B$ musí být redukovaný ještě jednou, aby se mohl odvázat z plastochinon vázajícího místa na D1 proteinu fotosystému II a difundovat do tylakoidní membrány (Procházka, Macháčková et al. 1998).




**Obrázek 4:** Schematický model světlem indukovaného elektronového transportu ve fotosystému II. V obrázku jsou zobrazené: Manganový komplex ($Mn_4CaO_5$), tyrozinový zbytek ($Y_Z$), reakční centrum (P680), doplňkový chlorofyl ($Chl_{D1}$), feofytin ($Pheo_{D1}$), vázaný plastochinon ($Q_A$), dočasně vázaný plastochinon ($Q_B$) a plastochinol (PQ). Obrázek přejat z (Shevela, Eaton-Rye et al. 2012; Mamedov, Govindjee et al. 2015).

Oxidované reakční centrum ($P680^+$) je redukované elektronem z tyrosinového zbytku ($Y_Z$), který následně elektron získá zpět z manganového komplexu oxidujícího vodu. Oxidace vody probíhá v komplexu obsahujícím manganový komplex umístěný na lumenální straně D1 a D2 proteinu.

### 2.2.2 Fotosystém I

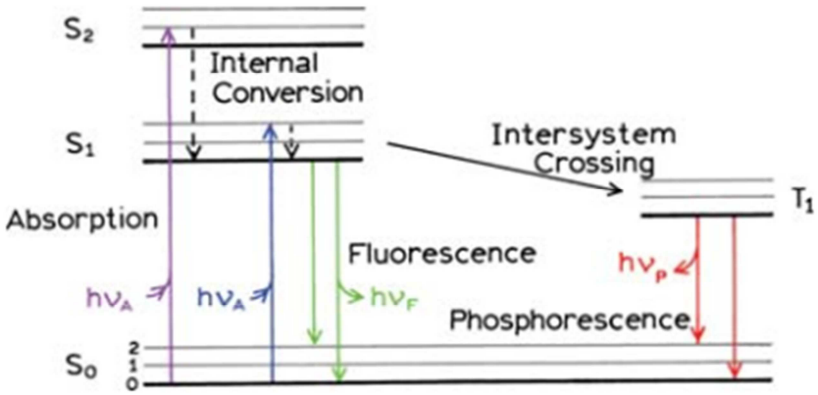
Fotosystém I je proteinový komplex, ve kterém probíhají na světle závislé rekce fotosyntézy. Vyskytuje se u řas, sinic, vyšších rostlin a některých bakterií (Procházka, Macháčková et al. 1998).

Reakční centrum fotosystému I, P700, je tvořeno dvojicí chlorofylů. V reakčním centru dochází pomocí energie jednoho absorbovaného elektronu k nábojové separaci. Excitované reakční centrum (P700*) předá elektron na primární akceptor chlorofyl *a* ($A_0$) a stane se oxidovaným. Elektron je dále předáván přes fylochinon ($A_1$), tři železo−sirné komplexy ($F_X$, $F_A$, $F_B$) na ferredoxin (Fd), jenž není vázán na fotosystém I a může difundovat do stromatu. Ferredoxin je dále využit jako donor elektronu pro redukci $NADP^+$ na NADPH pomocí ferredoxin $NADP^+$ reduktázy (Procházka, Macháčková et al. 1998).

Oxidované reakční centrum ($P700^+$) je redukované měďnatým proteinem plastocyaninem. K redukci reakčního centra také může být u sinic využit cytochrom $c_6$ (Redinbo, Yeates et al. 1994).

# 3 Fluorescence

Fluorescence je proces specifické deexcitace excitovaných molekul vyzářením fotonu při přechodu ze stavu $S_1$ do stavu $S_0$. Vyzářený foton má nižší energii než foton, který byl pohlcen a molekulu excitoval (viz obrázek 5) (Lakowicz 2006).




**Obrázek 5:** Jablonského diagram. Absorpcí záření o dostatečně vysoké energii dojde k excitaci molekuly ze základního stavu do stavu excitovaného. Z tohoto stavu dojde k relaxaci do nejnižší vibrační hladiny energetické hladiny $S_1$ přeměnou energie na teplo. Z této hladiny dojde k přechodu na jednu z vibračních hladin základního stavu vyzářením kvanta energie ve formě fotonu. U excitované molekuly na energetické hladině $S_1$ může také dojít ke změně spinu do tripletního stavu $T_1$. Přechod zpátky do singletního stavu je zakázaný, proto dojde k opožděnému vyzáření kvanta – fosforescenci a tím navrácení se zpět do singletního základního stavu. Obrázek přejat z (Lakowicz 2006).

Ve fotosyntéze se excitační energie z pohlceného fotonu využívá k nábojové separaci, která poté slouží jako zdroj pro příslušné biochemické reakce a Calvin−Bensonův cyklus (viz kapitola 2). Rychlost využívání excitační energie závisí na rychlosti příslušných biochemických reakcí. Pokud je tento sled saturovaný, z důvodu limitované doby života excitonu, dojde k deexcitaci molekuly pomocí fluorescence.

## 3.1 Minimální fluorescence chlorofylu *a*

Minimální fluorescence chlorofylu *a* $F_0$, je úroveň emise fluorescence chlorofylu *a* při excitaci dostatečně slabým zářením, aby nedošlo k uzavření reakčních center PS II. Reakční centrum se považuje za otevřené, pokud je možné přenést elektron z reakčního centra PS II, primárního donoru, na feofytin, primární akceptor (viz 2.2.1).

Potom minimální fluorescence odpovídá rovnovážnému stavu ve tvoření excitovaných stavů ve světlosběrných komplexech, anténách před tím, než dojde k nábojové separaci (Butler 1978; Owens 1996).

Aktuální úroveň fluorescence chlorofylu *a* za dané ozářenosti - $F_t$, je úroveň emise fluorescence chlorofylu *a* při stavu, kdy je uzavřený zlomek reakčních center. Měření $F_0$ volně přechází do měření $F_t$ při aplikaci aktinického světla. (Rohacek 2002).

## 3.2 Maximální fluorescence chlorofylu *a*

Maximální fluorescence $F_M$, je úroveň emise fluorescence ve stavu, kdy všechny chinony A ve fotosystému II jsou redukované (Forbush and Kok 1968). Při jedno−obrátkové excitaci dojde k emisi fluorescence chlorofylu *a*, jejíž intenzita se označuje jako $F_M^{ST}$, která většinou dosahuje nižší intenzity než intenzita fluorescence chlorofylu *a* při mnoho−obrátkové excitaci, označované jako $F_M^{MT}$ (Schreiber 1986).

## 3.3 Maximální kvantový výtěžek fotosystému II

Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ($F_v/F_M$) je parametr, který se dá získat po změření úrovní minimální ($F_0$) a maximální ($F_M$) fluorescence chlorofylu *a* při použití mnoho−obrátkové (MT) metody excitace.

$$\frac{F_v}{F_M} = \frac{F_M^{MT} - F_0}{F_M^{MT}} \qquad 2)$$

Rovnice (2) zobrazuje vyjádření hodnoty maximálního kvantového výtěžku (Kitajima and Butler 1975) kde $F_v$ značí variabilní fluorescenci. Hodnota $F_v/F_M$ odráží stav rostliny a průměrná hodnota pro $C_3$ rostliny dosahuje 0,83 (Bjorkman and Demmig 1987).

## 3.4 Jedno−obrátkové záblesky

Za jedno−obrátkový záblesk (anglicky: Single−turnover (ST) flash) je považován způsob excitace reakčních center krátkým saturujícím pulzem světla (maximálně 100 μs). Cílem je provést jednu nábojovou separaci a tím uzavřít všechna reakční centra v řádech desítek mikrosekund. Úroveň fluorescence odpovídá míře uzavření PSII reakčních center, a to při $F_0^{ST}$ všechna reakční centra jsou otevřená a při $F_M^{ST}$ všechna reakční centra jsou zavřená.

Pomocí této metody je možné získat čtyři parametry popisující průběh indukce fluorescence a to úrovně minimální a maximální fluorescence pro ST záblesk ($F_0^{ST}$ a $F_M^{ST}$),

velikost reakčních center ($\sigma$) a konektivitu reakčních center fotosystému II ($p$) (Kolber, Falkowski et al. 1992).

### 3.5 Mnoho−obrátkové záblesky

Mnoho−obrátkový saturující záblesk (anglicky: Multiple turnover (MT) flash) je způsob excitace reakčních center excitačním světlem za cílem kompletní saturace elektronového transportu světelné fáze fotosyntézy. Délka mnoho−obrátkového záblesku je v řádech stovek milisekund tj. o 4 řády pomalejší než jedno−obrátkový záblesk (Neubauer 1987).

Úroveň fluorescence odpovídá propustnosti elektronového řetězce. Při $F_0^{MT}$ jsou všechna reakční centra fotosystému II otevřená a při $F_M^{MT}$ všechna reakční centra uzavřená a využívána k pohonu elektronového řetězce.

Pomocí této metody je možné určit účinnost elektronového řetězce a tím nepřímo měřit úrovně fotoinhibice (Aro, Virgin et al. 1993).

## 4 Stavové přechody

Stavové přechody jsou druhem regulačního a fotoprotektivního mechanismu, kdy dochází k reorganizaci světlosběrných antén mezi fotosystémy II a I, a tím ke vzájemné změně $\sigma$ (Melis, Mullineaux et al. 1989). Rozeznáváme dva stavy: stav 1, kdy světlosběrné antény přenášejí excitaci více do fotosystému II, a stav 2, kdy světlosběrné antény přenášejí excitaci více do fotosystému I. U sinic se stavu 1 dá docílit jejich vystavením aktinickému světlu (okolo 50 μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) modré barvy a stavu 2 adaptací na tmu, nebo vystavením světlu (okolo 50 μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) oranžové barvy (Kirilovsky, Kana et al. 2013).

Pro studium stavových přechodů v sinicích je výhodné využít mutantních kmenů s pozměněnou funkcí fykobilisomů. Proces předávání excitační energie z fykobilisomu na reakční centra se liší mezi oběma fotosystémy. Pro přenos excitační energie na fotosystém I je využit protein ApcD, který je podjednotkou jádra fykobilisomů nacházející se na okraji strany přiléhající k tylakoidní membráně. Mutantní kmen, který nesyntetizuje protein ApcD, má tento protein v jádře fykobilisomů nahrazený proteinem αAPC. Tento mutantní kmen není schopen předávat excitační energii z fykobilisomů na fotosystém I, proto u něj nedochází ke stavovým přechodům, a je u něj možný pouze

stav 1 (Jallet, Gwizdala et al. 2012). Pro přenos excitační energie na fotosystém II je využit protein ApcF, který je podjednotkou jádra fykobilisomů nacházející se v jeho centru na straně přiléhající k tylakoidní membráně. Mutantní kmen, který nesyntetizuje protein ApcF, jej má nahrazený proteinem βAPC. Tento mutantní kmen není schopen předávat excitační energii z fykobilisomů na fotosystém II, a proto u něj nedochází ke stavovým přechodům, a je u něj možný pouze stav 2 (Jallet, Gwizdala et al. 2012).

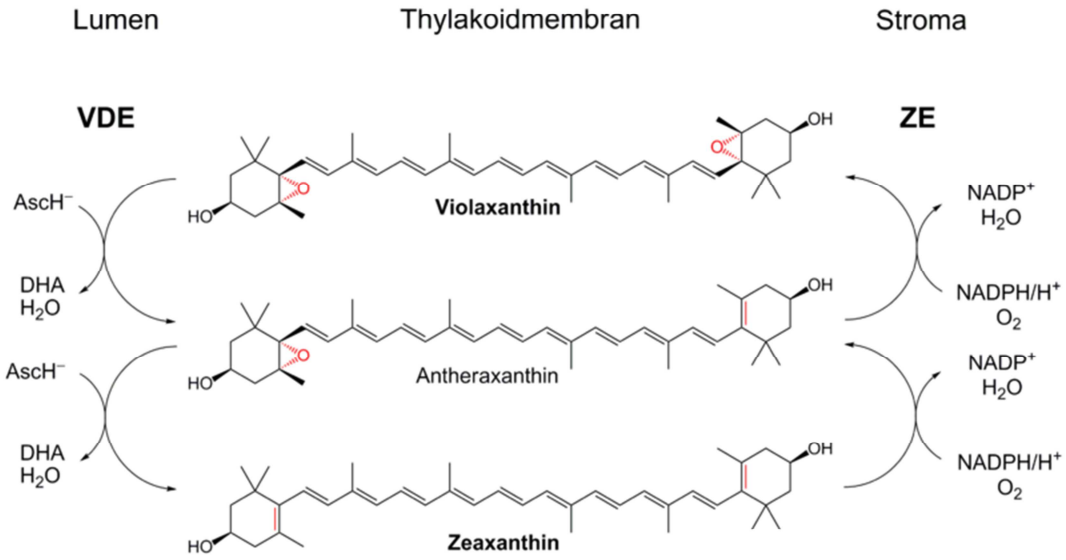
# 5 Nefotochemické zhášení

Nefotochemické zhášení (NPQ) je foto−protektivní mechanizmus uplatňující se při situacích, kdy je organizmus vystaven vysokým úrovním světelného stresu. NPQ pomáhá zbavit se přebytečné energie, která by jinak dorazila k reakčním centrům a mohla by je poškodit (Ruban and Horton 1994).

$$NPQ = \frac{F_M - F'_M}{F'_M} \qquad 3)$$

Úroveň NPQ můžeme kvantifikovat pomocí porovnání $F_M{}^{MT}$ ve stavu adaptovaného na tmu ($F_M$) se vzorkem ve stavu v závislosti na typu experimentu ($F'_M$). Rovnice (3) je jeden ze způsobů číselného vyjádření úrovně NPQ (Krause and Weis 1991).

U vyšších rostlin NPQ souvisí s acidifikací lumenu, a sní spojenoým Xantofilovým cyklem. (Demmig, Winter et al. 1987). Xantofylový cyklus je enzymatická reakce, při které dochází pomocí violaxantin deepoxidázy k deepoxidaci violaxantinu na anteraxantin a poté, po další deepoxidaci, na zeaxantin (viz obrázek 6). Tento mechanizmus se uplatňuje v reakci vyšších rostlin a některých řas na světelný stres a pomáhá disipovat přebytečnou energii, aby nedošlo k fotoinhibici (Demmig-Adams 1990).




**Obrázek 6:** Schéma xantofylového cyklu. Violaxantin deepoxidáza (VDE) je enzym, který odebírá epoxidové vazby za přeměny kyseliny askorbové ($AscH^-$) na dehydrogen askorbát (DHA) a vodu (zobrazeno nalevo). Zeaxantin eopxidáza (ZE) je enzym vytváří epoxidové vazby za použití kyslíku a NADPH (zobrazeno napravo). Obrázek přejat z (Yikrazuul 2009).

Součástí xantofylového cyklu je také reverzní proces, který přidává epoxidové vazby do deepoxidovaných xantofylů, a to pomocí enzymu zeaxantinu epoxidázy.

U sinic je mechanismus NPQ nezávislý na acidifikaci lumenu, a probíhá zde tzv. OCP (z anglické zkratky: Orange Caroteniod Protein) indukovanému zhášení fluorescence (Kirilovsky 2007). Mechanizmus OCP indukovaného NPQ je založen na blokaci přenosu excitační energie z fykobilisomu do reakčních center pomocí modrým světlem indukovaného vratného procesu změny OCP z jeho oranžové formy na jeho formu červenou (Wilson, Punginelli et al. 2008). Ta se poté připojí na fykobilisom a změní se na finální formu, která působí jako aktivní činitel v procesu NPQ (Gorbunov, Kuzminov et al. 2011). Pro studium mechanizmu OCP indukovaného NPQ v sinicích je výhodné využít mutantní kmen, který není schopen syntézy OCP (Wilson, Ajlani et al. 2006).

# 6 Měření fluorescence chlorofylu *a* a velikosti světlosběrných antén

Proces nefotochemického zhášení (NPQ) se liší u různých druhů. Vyšší rostliny a zelené řasy aktivují NPQ pomocí akumulace rozdílu pH přes membránu (Horton, Ruban et al. 1996). Sinice aktivují NPQ pomocí konverze oranžové formy OCP na formu červenou pomocí modrozeleného záření (Kirilovsky 2007; Wilson, Punginelli et al. 2008).

Je stále otevřenou otázkou, zda při procesu NPQ a při stavových přechodech dochází k efektivní změně velikosti antén PSII.

Práce (Belgio, Kapitonova et al. 2014) popisuje průběh $F_M^{MT}$ měřené PAM metodou pro izolované chloroplasty špenátu s navýšenou úrovní deopoxidovaných xantofylů. V práci také měřily $\sigma$ Malkinovou metodou (Malkin, Armond et al. 1981) před a po vyvolání NPQ vystavením aktinickému světlu. Průběh změn $F_M^{MT}$ zaznamenal pokles v průběhu procesu NPQ s následnám nárůstem ve fázi relaxace. Hodnota $\sigma$ zaznamenala 50 % nárůst po stimulaci procesu NPQ s návratem na iniciální hodnotu v relaxaci. V této práci také popsali proces stavových přechodů kde hodnoty $F_M^{MT}$ a $\sigma$ zaznamenaly pokles při přechodu ze stavu 1 na stav 2.

Práce (Gorbunov, Kuzminov et al. 2011) popisuje průběh $\sigma$ a $F_M^{ST}$ měřeného metodou FIRe využívající jedno−obrátkových záblesků. Obě sinice *Synechocystis sp.* PCC 6803 a *Synechococcus sp.* vykazují nárůst obou hodnot při stavovém přechodu ze stavu 2 na stav 1, pokles při vyvolání NPQ s následným opakovaným nárůstem v průběhu relaxace. Tato práce ukazuje $\sigma$ pro *Synechocystis* v rozmezí od 620 $Å^2$ pro stav 1 do 400 $Å^2$ pro zhasnutý stav.

Práce (Koblizek, Kaftan et al. 2001) popisuje průběh $\sigma$, $F_M^{ST}$ měřeného metodou FRRF využívající jedno−obrátkových záblesků a $F_M^{MT}$ pro různé organizmy. V této práci studovali hodnoty parametrů před a po vystavení silnému bílému aktinickému světlu u druhů *Phaeodactylum tricornutum* a *Scenedesmus quadricauda*. *Phaeodactylum tricornutum* vykazuje pokles hodnot $F_M$ při procesu NPQ s následným nárůstem ve fázi relaxace. Průběh hodnot $F_M^{ST}$ a $F_M^{MT}$ se zásadně neliší s rozdílem v nižší hodnotě $F_M^{ST}$ a to o 11 %. Hodnoty $\sigma$ se vyskytují v rozmezí od 128 $Å^2$ před vystavením aktinickému světlu do 55 $Å^2$ měřeném hned po zhasnutí aktinického světla. *Scenedesmus quadricauda* vykazuje pokles hodnot $F_M$ při procesu NPQ s následným nárůstem ve fázi relaxace. Průběh hodnot $F_M^{ST}$ a $F_M^{MT}$ se na začátku liší o 24 %, ale v průběhu aktinického světla jsou hodnoty totožné, a při relaxaci mají tendenci se vrátit to iniciálních hodnot. Hodnoty $\sigma$ se vyskytují v rozmezí od 125 $Å^2$ před vystavením aktinickému světlu do 110 $Å^2$ měřeném hned po zhasnutí aktinického světla. V práci (Koblizek, Kaftan et al. 2001) také proměřili hodnoty $\sigma$ pro další druhy a to *Chlamydomonas Reinhardtii* s hodnotou 123 $Å^2$, *Chlorella sorokiniana* s hodnotou 176 $Å^2$, *Nannochloropsis sp.* s hodnotou 128 $Å^2$, *Porphyridium purpurum* s hodnotou 65 $Å^2$, *Synechocystis sp.* PCC 6803 s hodnotou 286 Å

a *Synechococcus sp.* PCC 7942 s hodnotou 345 Å$^2$. V souhrnu, pokles velikosti antén během stimulace NPQ byl zaznamenán u orgamizmů *Phaeodactylum tricornutum* a *Scenedesmus quadricauda.*

Korelace mezi nefotochemickým zhášením a velikostí antén byla také studována u izolovaných center PSII (Krupnik, Kotabova et al. 2013). Tato práce popisuje průběh hodnot $F_M^{MT}$ a také velikost $\sigma$ pro ruduchu *Cyanidioschyzon merolae*. Průběh hodnot $F_M^{MT}$ stimulovaných modrým aktinickým světlem sleduje pokles hodnot se stabilizací a mírným nárůstem po 1 minutě expozice. Rychlost tohoto nárůstu se poté ještě zvýší ve fázi relaxace. V práci uvádějí velikost $\sigma$ v nativním stavu, a to 53 Å$^2$, a v izolovaných thylakoidních membránách 38 Å$^2$. Ukázalo se, že zde pokles velikosti antén nekoreluje se zhášením maximální fluorescence.

# 7 Materiály a metody

## 7.1 Modelové organizmy

### 7.1.1 Sinice

Jako hlavní modelový organizmus pro sinice byl vybrán *Synechocystis sp.* PCC 6803 (WT−KIR), a to kmen získaný z laboratoře Dr. Kirilovsky. Jedná se o modelový organizmus, pro který existuje mnoho mutantních kmenů s popsaným vlivem na fenotyp. V této práci byly použity tři mutantní kmeny, a to *Synechocystis sp.* PCC 6803 ΔApcD, *Synechocystis sp.* PCC 6803 ΔApcF a *Synechocystis sp.* PCC 6803 ΔOCP, všechny vytvořené z kmene WT−KIR.

*Synechocystis sp.* PCC 6803, divoký kmen Kirilovsky (WT−KIR), *Synechocystis sp.* PCC 6803 ΔApcD, *Synechocystis sp.* PCC 6803 ΔApcF a *Synechocystis sp.* PCC 6803 ΔOCP byly dlouhodobě udržovány na 2% agarové plotně připravené z média BG−11 s TES pufrem s finální koncentrací 10 mM. Tekutá kultura pro vlastní měření byla připravena inokulací danou kulturou z agarové plotny s cca 130 ml BG−11 média ve sterilní 250 ml Erlenmayerově baňce s buničinovou zátkou. Tekutá kultura poté rostla na kontinuálním bílém světle, produkovaném zářivkou, o intenzitě 40 μmol kvant · m$^{-2}$ · s$^{-1}$, za stálého míchání pomocí orbitální třepačky při 28 °C. Měření byla provedena na kultuře v exponenciální fázi růstu, což odpovídá 2−3 dním kultivace v tekutém médiu.

*Prochlorococcus Marinus* je sinice bez fykobilizomů o velikost 0,6 − 0,8 μm vyskytující se ve vysokých počtech v eufotické vrstvě oceánu (Chisholm, Frankel et al. 1992). V této práci byly použity dva divoké kmeny a to *Prochlorococcus Marinus* MIT−9313 a *Prochlorococcus Marinus* PCC−9511. *Prochlorococcus Marinus* MIT−9313 má poměr chlorofylu *b* k chlorofylu *a* vysoký, což zvyšuje efektivitu využití nízkých intenzit světla, ale zamezuje růst na intenzitách vysokých (Moore and Chisholm 1999). *Prochlorococcus Marinus* MIT−9511 má poměr chlorofylu *b* k chlorofylu *a* nízký (Rippka, Coursin et al. 2000). Kultury *Prochlorococcus Marinus* MIT−9313 a *Prochlorococcus Marinus* PCC−9511 byly udržované v tekutém stavu v mediu PCR S11 na kontinuálním bílém světle, produkovaném zářivkou, o intenzitě 50 μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, bez míchání při 18 °C.

### 7.1.2 Řasy ze skupiny SAR

SAR je označení superskupiny eukaryotických organizmů zahrnující *Stramenopila, Alveolata* a *Rhizaria* (Burki, Shalchian-Tabrizi et al. 2007). *Chromera Velia* je jednobuněčný autotrofní organizmus patřící do nadkmenu Alveolata. Jedná se o nejbližšího fotosyntetizujícího příbuzného výtrusovců (*Apicomplexa*) se zastoupením zimničky (*Plasmodium*), která způsobuje nemoc malárie. Jedná se také o možného symbionta korálů (Obornik, Modry et al. 2012). *Chromera Velia* byla kultivována v tekutém stavu v médiu F/2 na kontinuálním zářivkovém bílém světle o intenzitě 50 μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, za stálého probublávání vzduchem při 28 °C.

*Nannochloropsis Oceanica* je jednobuněčný autotrofní organizmus patřící do třídy Eustigmatofyt. Jedná se o 2−5 μm imobilní oválný organizmus s jedním zeleno−žlutým chloroplastem (Suda, Atsumi et al. 2002). *Nannochloropsis Oceanica* byl kultivován v tekutém stavu v médiu ASV/2 na kontinuálním zářivkovém bílém světle o intenzitě 50 μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, za stálého míchání na orbitální třepačce při 18 °C.

Buňky *Monodopsis Subterranea* jsou vejčitého charakteru o velikosti 3−9 μm s jediným chloroplastem. Patří do třídy *Eustigmatophyte (John, Whitton et al. 2002)*. Světlosběrné komplexy postrádají červené antény (Arsalane, Rousseau et al. 1992). *Monodopsis Subterranea* byl kultivován v tekutém stavu v mediu BG−11 na kontinuálním zářivkovém bílém světle o intenzitě 50 μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, za stálého míchání pomocí orbitální třepačky při 18 °C.

Řasa *Eustigmatos sp.* patří do třídy *Eustigmatophyceae*. *Eustigmatos sp.* byl kultivován v tekutém stavu v mediu BG−11 na kontinuálním zářivkovém bílém světle o intenzitě 50 μmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$, za stálého míchání pomocí orbitální třepačky při 18 °C.

### 7.1.3 Zelené řasy

*Chlamydomonas Reinhardtii* je jednobuněčná zelená řasa s dvěma bičíky o velikosti přibližně 10 μm. V buňce je jeden chloroplast a stigma (Harris, Stern et al. 2009). *Chlamydomonas Reinhardtii* byla kultivována v tekutém stavu v mediu BG−11 na kontinuálním zářivkovém bílém světle o intenzitě 50 μmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ za stálého míchání pomocí orbitální třepačky při 18 °C.

### 7.1.4 Vyšší rostliny

Špenát setý (*Spinacia oleracea*) je vyšší rostlina z čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*). Je to jednoletá rostlina s jednoduchými oválnými nebo trojúhelníkovými listy viz obrázek 7.

**Obrázek 7:** Rostlina špenátu setého (*Spinacia oleracea*). Obrázek přejat z (Selvas 2010).

Špenát je běžná zelenina určená ke konzumaci a z tohoto důvodu je jednoduše dostupná. Mladé listy špenátu jsou jemné, neobsahující tuhé tkáňové struktury a stabilita protoplastu je dostatečně dlouhá pro další práci (Nishimura, Graham et al. 1976), proto se

hodí k izolaci intaktních chloroplastů. Díky tomuto je ve vědě špenát používán jako modelový organizmus a jsou dostupné různé standardizované metody a data k porovnání.

Chloroplasty byly získány izolací z listů špenátu setého koupeného téhož dne v místním obchodě. Na nepoškozeném listu byla měřena kinetika změny NPQ pomocí fluorometru Dual PAM. Výběr listů použitých pro izolaci chloroplastů se zakládal na posouzení hodnoty $F_v/F_M$, a to pokud byla větší než 0,7 a pokud u listů probíhala fáze vzestupu $F_M^{MT}$ ze zhášeného stavu.

Izolace intaktních chloroplastů byla provedena na základě postupu popsaného v (Crouchman, Ruban et al. 2006), upraveného pro malý objem listů. Pro izolaci bylo použito cca 5 g listů, od kterých byly odstraněny stonky. Listy byly rozmixovány s ledovým (malá část byla ve stavu ledové tříště) homogenizačním pufrem pomocí mixovacího nástavce na laboratorním stojanovém míchacím aparátu Glas−Col 099D GT331 s nastavenou maximální rychlostí. Zhomogenizovaný vzorek byl přefiltrován přes několik vrstev gázy proložených vrstvou vaty do kádinky usazené v ledové tříšti. Filtrát jsem odstředil při 4 °C a 4000 g po dobu jedné minuty. Pelet byl resuspendován v 1 ml resuspendačního pufru pomocí jemného štětce.

Vzorek chloroplastů vystavených světelnému stresu byl připraven z listů špenátu setého, které byly před izolací vystaveny teplému bílému světlu pomocí panelu s polem LED o intenzitě 350 μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ po dobu 30 min nebo 60 min. Vystavení listů světelnému stresu bylo provedeno v zakryté nádobě, ve které listy ležely na roštu, pod kterým byla voda, do které listy měly ponořené konce diagonálně seříznutých stonků. Do nádoby byl přiveden zdroj molekulárního dusíku pro vytvoření bezkyslíkaté atmosféry. LED panel byl aktivně chlazen cirkulací vody skrz chladič k němu připevněný. Dále molekulární dusík vstupující do aparatury měl pokojovou teplotu, a proto teplota v nádobě byla po celou dobu světelného ošetření listů stabilní, s hodnotou okolo 23 °C.

## 7.2 PAM fluorometrie

PAM (Anglicky: Pulse Amplitude Modulation) je systém měření variabilní fluorescence chlorofylu *a* pomocí aplikace série měřících záblesků k vyvolání fluorescenčního signálu chlorofylu *a*. Měřící záblesky dosahují slabé intenzity v řádu jednotek μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ a trvání v řádu μs. Tímto způsobem měřicí záblesky

nevyvolají akumulaci uzavřených reakčních center, a proto výsledný fluorescenční signál chlorofylu *a* odpovídá úrovni $F_0$ (Schreiber, Klughammer et al. 2012).

Modulace vychází ze synchronizace detektoru s měřicími záblesky. Dále signál vstupující do detektoru prochází přes nízkofrekvenční filtr, který propustí vlnové délky delší než 700 nm. Tímto je zaručeno, že výsledný naměřený signál odpovídá pouze fluorescenci chlorofylu *a* (Hill, Schreiber et al. 2004). Dále je nutno zmínit, že detekovaný signál pochází z velké části z reakčních center fotosystému II, s malou neměnnou částí, která pochází z fotosystému I (Govindjee 2004).

V průběhu kontinuálního měření pomocí měřicích záblesků je jedním z nejčastějších postupů aplikace záblesku světla o intenzitě v řádu tisíců μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ a trvání v řádu stovek ms. Tímto se vyvolá stav, kdy všechna reakční centra fotosystému II se uzavřou a vzorek dojde k emisi fluorescence chlorofylu *a* ($F_M{}^{MT}$). Aplikace aktinického světla, které vzorek většinou v kontinuálním režimu vystaví požadované úrovni a vlnové délce světelného záření, často doprovází měření $F_M{}^{MT}$. Tímto se dají simulovat různé světelné podmínky, které se mohou vyskytovat ve volné přírodě, a tímto studovat, jak se vzorek při nich chová.

Dual PAM 100 fluorometr je měřicí přístroj určený k měření mimo jiné fotochemické aktivity fotosystému II. Přístroj se dá široce konfigurovat pomocí protokolů, aby vyhovoval specifickým požadavkům měření. Přístroj je dále plně počítačem ovládaný a umožňuje poloautomatický chod díky možnosti vytvoření skriptů pro ovládání přístroje (Heinz.Walz.GmbH 2006). K měření pomocí Dual PAM fluorometru bylo užito měřicí hlavy DUAL−DB, která umožňuje aplikaci měřicích záblesků ve vlnové délce 460 nm, a pomocné DUAL−E hlavy. Pro měření listu špenátu byl využit listový držák DUAL−B a upevňovací stojan ST−101. Měření extrahovaných chloroplastů proběhlo v plastové kyvetě, umístěné do optické jednotky ED−101US/MD upevněné na stojan ST−101. K míchání sloužila magnetická míchací jednotka umístěná pod optickou jednotkou.

Proces měření byl zautomatizován vytvořením skriptu, jenž po zahájení měření přebral kontrolu nad ovládáním aplikace požadovaných světelných podmínek s konstantním časováním.

Vzorek chloroplastů byl naředěn na $15 - 30\ \mu g \cdot ml^{-1}$ koncentrace chlorofylů. Před samotným měřením bylo zajištěno, že přístroj má správně nastavenou 0, úroveň

intenzity měřícího záblesku má konstantní hodnotu a saturační pulz je nastaven na intenzitu 1000 $\mu mol\ kvant \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ a délku trvání 600 μs. Kinetika fluorescence chlorofylu *a* byla změřena za stálého míchání a teploty 25 °C v kyvetovém nástavci Dual PAM fluorometru.

Na začátku protokolu byly aplikovány 3 saturační záblesky s periodou 40 s pro změření hodnoty $F_M^{MT}$. Modré (460 nm) aktinické světlo o intenzitě 600 $\mu mol\ kvant \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ a délce trvání 510 s bylo aplikováno 120 s po třetím saturačním záblesku. 10 s po začátku aplikace aktinického světla jsem aplikoval průběžně 9 saturačních záblesků s periodou 30 s. Tímto byla získána kinetika $F_M'$ na světle pro výpočet parametru NPQ. 10 s po skončení aktinického světla bylo aplikováno 5 saturačních záblesku s periodou 60 s pro získání kinetiky relaxace. Exportovaná naměřená data byla zpracována pomocí programu MS Excel.

## 7.3 FRR fluorometrie

FRRF (Anglicky: Fast Repetition Rate Fluorimetry) je způsob měření fluorescence chlorofylu *a*, založený na aplikaci série krátkých sub−saturačních mikrosekundových záblesků, které velmi rychle, v řádu desítek mikrosekund, uzavřou všechna reakční centra fotosystému II, a je získána hodnota $F_M^{ST}$ oproti stovkám milisekund nutných pro získání hodnoty $F_M^{MT}$.

Tímto způsobem je možné získat fluorescenční indukční kinetiku chlorofylu *a* při jedno−obrátkové excitaci. Tato kinetika je popsána matematickým modelem, který umožnuje získat parametry efektivní velikosti antén PSII ($\sigma$) a jejich konektivity (p). Diskrétní forma modelu je popsána v rovnici (4) a (5) (Kolber, Prasil et al. 1998). Matematický model nemá analytické řešení, ale numerickým fitováním se dají získat čtyři již zmíněné parametry popisující průběh kinetiky, a to $F_0^{ST}$, $F_M^{ST}$, $p$ a $\sigma$.

$$Cn_i = Cn_{(i-1)} + \frac{\sigma \cdot I \cdot \left(1 - Cn_{(i-1)}\right)}{1 - Cn_{(i-1)} \cdot p} \qquad 4)$$

Matematický model popisující kinetiku je rozdělený do dvou částí. První část uvedená v rovnici (4) počítá procento uzavřených center ($Cn_i$) pomocí efektivní velikosti antén PS II ($\sigma$), množství fotonů využitých pro excitaci od předešlého bodu ($I$), konektivity reakčních center ($p$) a množství uzavřených center z předešlého bodu. První hodnota je

rovná 0, což vychází z předpokladu, že všechna reakční centra PS II jsou na počátku otevřená.

$$Ffit_i = F_0^{ST} + \frac{(F_M^{ST} - F_0^{ST}) \cdot Cn_i \cdot (1-p)}{1 - Cn_i \cdot p} \qquad 5)$$

Druhá část již popisující průběh fluorescenčního signálu (viz rovnice (5)) využívá hodnoty minimální ($F_0{}^{ST}$) a maximální ($F_M{}^{ST}$) fluorescence chlorofylu *a*, konektivity reakčních center (*p*) a procenta uzavřených reakčních center ($Cn_i$) pro získání hodnoty fluorescence chlorofylu *a* v určitém časovém bodu.

Měření bylo provedeno na fluorometru FL 3500−F vyrobeném firmou PSI (Brno, Česká republika). Tento fluorometr je schopný měřit s mikrosekundovým rozlišením. K měření fluorescence chlorofylu *a* dochází v měřicí hlavě, ve které je možné aplikovat excitační záblesky, aktinické světlo pomocí LED, a samotné měření je provedeno pomocí PIN diodového detektoru s integrovaným 500 kHz, 16 bitovým AD převodníkem. Dále kyveta se vzorkem byla aktivně temperována pomocí temperovací hlavy a příslušné kontrolní jednotky. Pod měřicí hlavou bylo magnetické míchadlo, které vzorek míchalo v čase, kdy nedocházelo k samotnému měření. Fluorometr byl ovládán pomocí počítače a programu *FluorWin* 3.7.1 od firmy PSI.

Při měření se vzorky chloroplastů byla suspenze naředěna na 1,5 – 3 $\mu g \cdot ml^{-1}$ koncentrace chlorofylů *a* a *b*. Za stálé teploty 25 °C byla změřena kinetika fluorescence chlorofylu *a* pomocí FRR fluorometru od firmy PSI.

V průběhu měření jednotlivých 60 μs dlouhých jedno−obrátkových záblesků (modré barvy, 455 nm) byla intenzita fluorescence měřena každé 2 μs, a tím bylo získáno 31 měřených bodů pro vytvoření indukční křivky.

Jedno−obrátkové pulzy byly použity během specifického protokolu pro vyvolání procesu NPQ. Byl také použit nový protokol, kdy před jedno−obrátkovými záblesky aplikovanými v průběhu aktinického světla byla přidána pauza s délkou trvání 200 ms, ve které došlo k vypnutí aktinického světla. Tento postup byl přidán do protokolu pro zaručení, že všechna reakční centra fotosystému II budou otevřená, což je základní předpoklad matematického modelu popisující průběh indukční křivky.

V průběhu protokolu pro vyvolání NPQ bylo aplikováno 10 jedno−obrátkových záblesků s intervalem 1 s. Poté došlo k aplikaci modrého (455 nm) aktinického světla o intenzitě 600 μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ a délce trvání 260 s. V průběhu aktinického světla proběhlo 16 jedno−obrátkových záblesků s intervalem 16 s, s prvním zábleskem 1 s po začátku aktinického světla. Tímto byla získána kinetika změn vyvolaných aplikací aktinického světla. 5 s po skončení aktinického světla došlo k aplikaci 16 jedno−obrátkových záblesků s intervalem 16 s pro získání kinetiky relaxace.

Protokol pro vyvolání stavových přechodu, obsahoval 10 jedno−obrátkových záblesků s intervalem 1 s. Poté následoval sled fází s modrým oranžovým a znovu modrým aktinickým světlem. V modré fázi došlo k aplikaci modrého (455 nm) aktinického světla o intenzitě 75 μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ a délce trvání 128 s. V průběhu aktinického světla proběhlo 8 jedno−obrátkových záblesků s intervalem 16 s, s prvním zábleskem 8 s po začátku aktinického světla. V oranžové fázi došlo k aplikaci oranžového (617 nm) aktinického světla o intenzitě 75 μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ a délce trvání 256 s. V průběhu aktinického světla proběhlo 15 jedno−obrátkových záblesků s intervalem 16 s, s prvním zábleskem 8 s po začátku aktinického světla. Po vypnutí aktinického světla došlo k aplikaci 14 záblesků s intervalem 2 s v průběhu 30 s. Tímto byla získána kinetika změn při stimulaci aktinickým světlem pro vyvolání stavových přechodů.

Naměřená data byla poté zpracována a jednotlivé indukční křivky nafitovány pomocí doplňku „řešitel“ v programu *MS Excel* podle matematického modelu. Tento proces byl zautomatizován pomocí makra napsaného v programovacím jazyku *Visual Basic for Applications*.

## 7.4 Stanovení koncentrace chlorofylů ve vzorku

Stanovení koncentrace chlorofylů ve vzorku byla provedena spektrofotometricky pomocí měření absorbance na přístroji Biochrom WPA Spectrawave S800 Diode array spektrofotometru při vlnových délkách 645 nm, 664 nm a 750 nm, a poté pomocí výpočtu byly získány koncentrace chlorofylů *a* a *b*.

Ze vzorku extrahovaných chloroplastů bylo odebráno 50 μl a přidáno do připravené falkony se 3 ml metanolu. Falkony byly odstředěny při 4 °C a 7000 g po dobu 7 minut. Purifikovaný supernatant byl změřen oproti metanolu při vlnových délkách 445 nm, 665 nm a 730 nm. Za použití kalibračních konstant uvedených v (Porra, Thompson et al. 1989) pro metanol byly dopočítány koncentrace chlorofylů *a* a *b*.

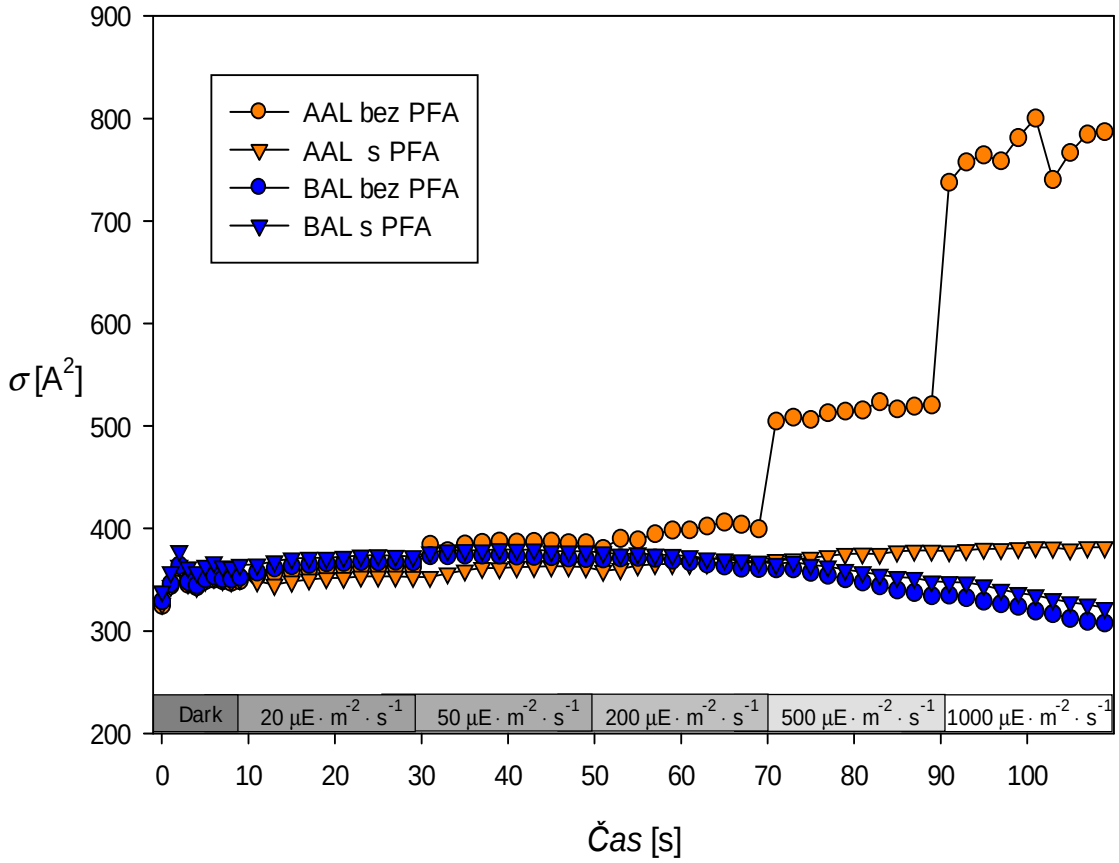
## 7.5 Stanovení úrovně epoxidace xantofylů

Úroveň epoxidace xantofylů byla detekována pomocí HPLC (High−Performance Liquid Chromatography) na přístroji Agilent 1260 Infinity II LC. Vzorky pro HPLC byly připraveny stejnou metodou jako v metodě pro stanovení koncentrace chlorofylů (viz kapitola 7.4). Vzorky se dále zfiltrovaly a naředily na koncentraci chlorofylů *a* a *b* o hodnotě $1 – 2\ \mu g \cdot ml^{-1}$. Separace pigmentů ve vzorku probíhala za pomocí adsorbční kolony Nova−Pak C18 Column, 60Å, 4 µm, 3.9 mm X 75 mm WAT011670 za postupného vymývání pomocí pufrů A (metanol, acetonitril, 0,25 M pyridine v poměru 35 : 15 : 60) a B (metanol, acetonitril, aceton v poměru 20 : 60 : 20). Rozděleným frakcím se kontinuálně měřilo absorpční spektrum pomocí Agilent 1260 Infinity II Variable Wavelength Detector (G7114A), vybaveným 10 mm standardní průtokovou komůrkou (G1314−60186) pro identifikaci a kvantifikaci.

# 8 Výsledky

## 8.1 Testování role aktinického světla na měření metodou FRR fluorescence

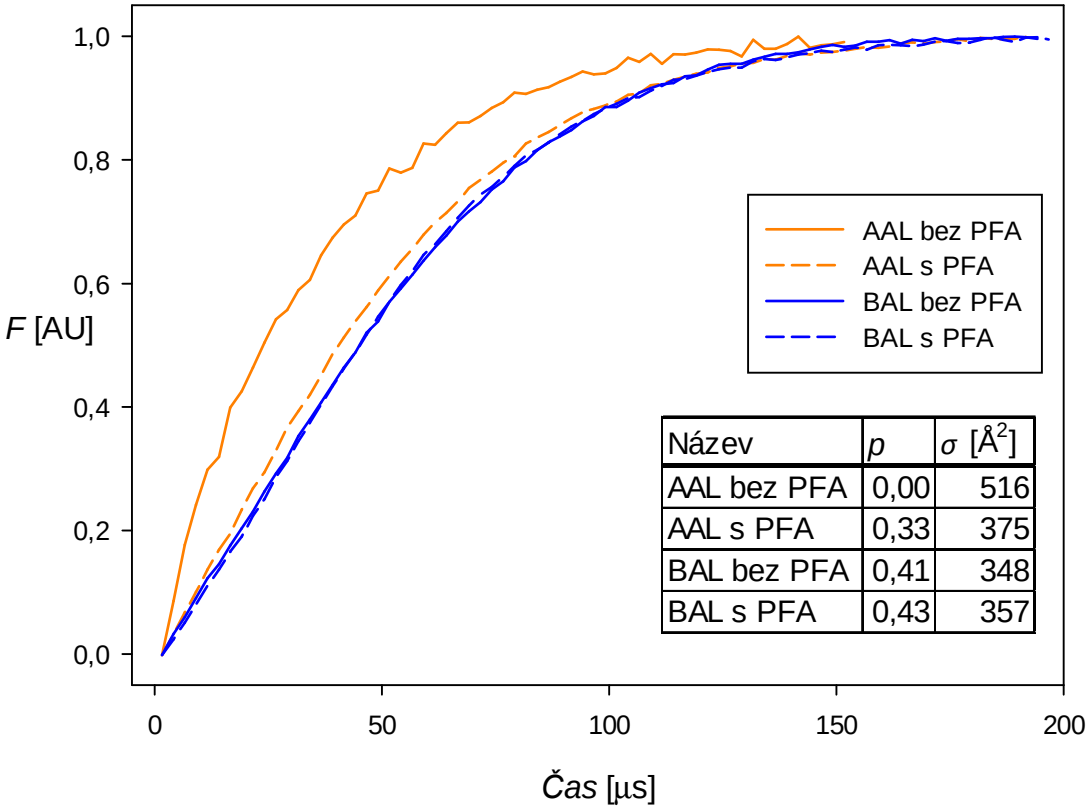
Otestoval jsem efekt přidání krátké pauzy v aplikaci aktinického světla před samotným měřením indukční fluorescence excitované pomocí jedno−obrátkového záblesku u sinice *Synechocystis* PCC 6803. Tuto pauzu jsem nazval před zábleskova adaptace PFA (Anglicky: Pre Flash Adaptation). Provedl jsem porovnání měření s a bez PFA, které je zobrazeno v obrázku 8.




**Obrázek 8:** Efekt PFA na efektivní velikost fykobilisomových antén. Pro vyvolání jedno−obrátkové excitace jsem použil oranžové záblesky o vlnové délce 617 nm. Vzorek jsem vystavil proměnlivému aktinickému světlu o intenzitách od 0 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ (Dark) až po 1000 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$; oranžové, 617 nm (AAL) nebo modré, 455 nm (BAL) barvy. PFA délka byla 500 ms.

Rozdíly mezi hodnotami $\sigma$ pro oba protokoly jsou zobrazené v obrázku 8. Zásadní rozdíly jsem pozoroval při měření pro oranžové aktinické světlo. Měření bez PFA na oranžovém aktinickém světla vykazuje rychlé a nespojité změny ve velikosti $\sigma$

při změně intenzity světla. Tato změna není pozorována u protokolu s PFA. Porovnání indukčních křivek z měření zobrazeného v obrázku 8 je zobrazeno v obrázku 9.

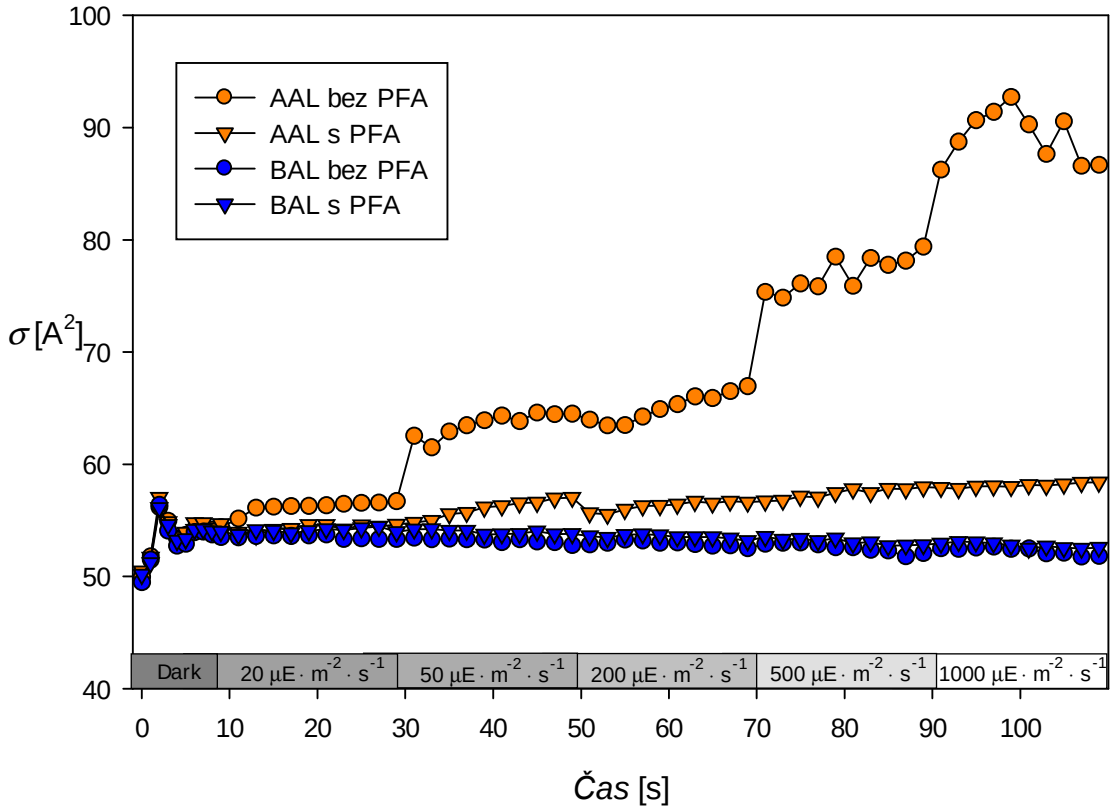



| Název | *p* | *σ* [Å$^2$] |
|---|---|---|
| AAL bez PFA | 0,00 | 516 |
| AAL s PFA | 0,33 | 375 |
| BAL bez PFA | 0,41 | 348 |
| BAL s PFA | 0,43 | 357 |

**Obrázek 9:** Efekt PFA na indukční křivky odpovídající 45. bodu (81 s, intenzita aktinického světla 500 µmol kvant · m$^{-2}$ · s$^{-1}$, oranžové záblesky o vlnové délce 617 nm) v obrázku 8. Intenzita oranžového, 617 nm (AAL) nebo modrého, 455 nm (BAL) aktinického světla dosáhla 500 µmol kvant · m$^{-2}$ · s$^{-1}$. PFA délka byla 500 ms. Ve vložené tabulce jsou k porovnání hodnoty konektivity (*p*) a velikosti antén (*σ*). Hodnoty fluorescence jsem normalizoval mezi minimální a maximální hodnotu.

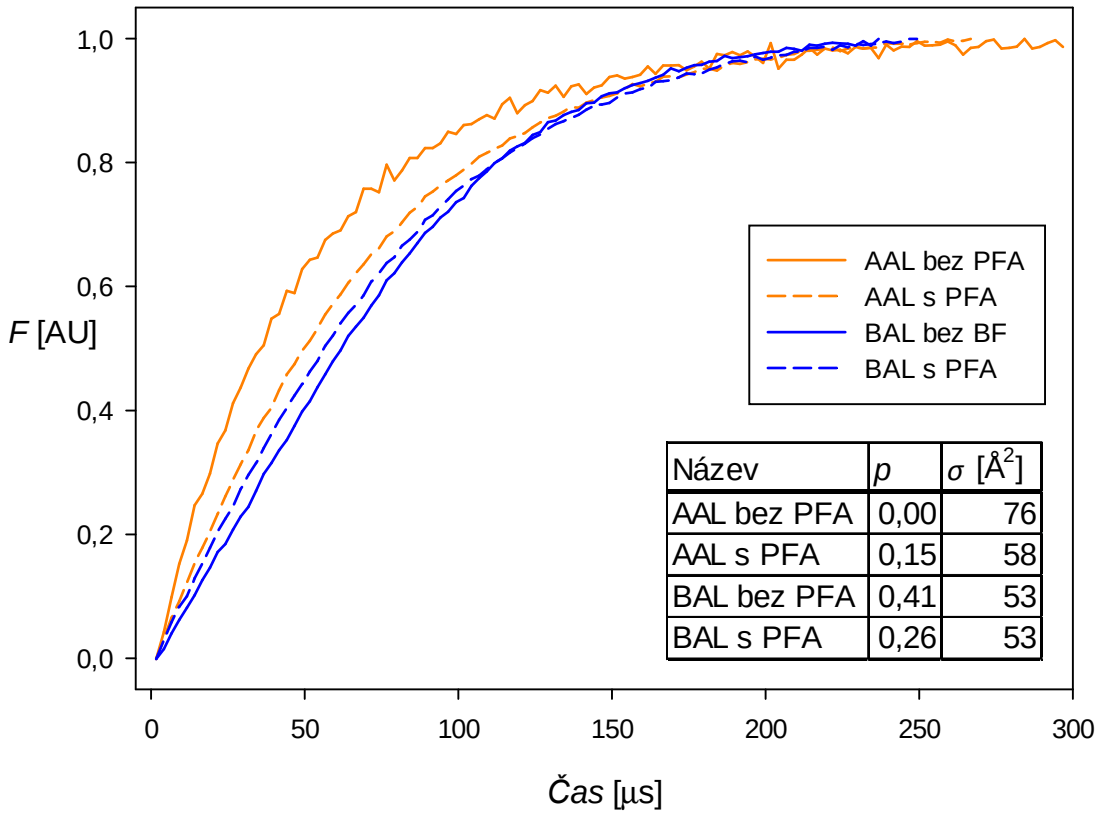
Průběh indukce fluorescence během ST na oranžovém (617 nm) aktinickém světle bez aplikace PFA je zobrazen v obrázku 9. Tento má odlišný průběh od indukční křivky měřené s aplikací PFA, charakterizované rychlejším nárůstem intenzity fluorescence, která se odráží ve větší velikosti antén a nulové konektivitě. Průběh indukce měřené na modrém (455 nm) aktinickém světle s a bez aplikace PFA jsou téměř totožné.

Měření jsem také provedl pomocí modrých (455 nm) jedno−obrátkových záblesků, které měří velikost antén obsahujících převážně chlorofyl *a*, fotosystému II. Měření je zobrazeno v obrázku 10.




**Obrázek 10:** Efekt PFA na efektivní velikost chlorofylových antén. Pro vyvolání jedno−obrátkové excitace jsem použil modré záblesky o vlnové délce 455 nm. Vzorek jsem vystavil proměnlivému aktinickému světlu o intenzitách od 0 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ (Dark) až po 1000 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$; oranžové barvě (AAL) nebo barvě modré (BAL). PFA délka byla 500 ms.

Obrázek 10, podobně jako obrázek 8, zobrazuje skok ve velikosti antén při změně intenzity aktinického světla u protokolu bez PFA, a to pouze pro oranžové aktinické světlo. Porovnání indukčních křivek je zobrazeno v obrázku 11. Průběhy indukce měření na modrém (455 nm) aktinickém světle s a bez aplikace PFA jsou totožné.




**Obrázek 11:** Efekt PFA na indukční křivky odpovídající 45. bodu (81 s, intenzita aktinického světla 500 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$, modré záblesky o vlnové délce 455 nm) v obrázku 10. Intenzita oranžového (AAL) nebo modrého (BAL) aktinického světla dosáhla 500 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$. PFA délka byla 500 ms. Ve vložené tabulce jsou k porovnání hodnoty konektivity ($p$) a velikosti antén ($\sigma$). Hodnoty fluorescence jsem normalizoval mezi minimální a maximální hodnotu.

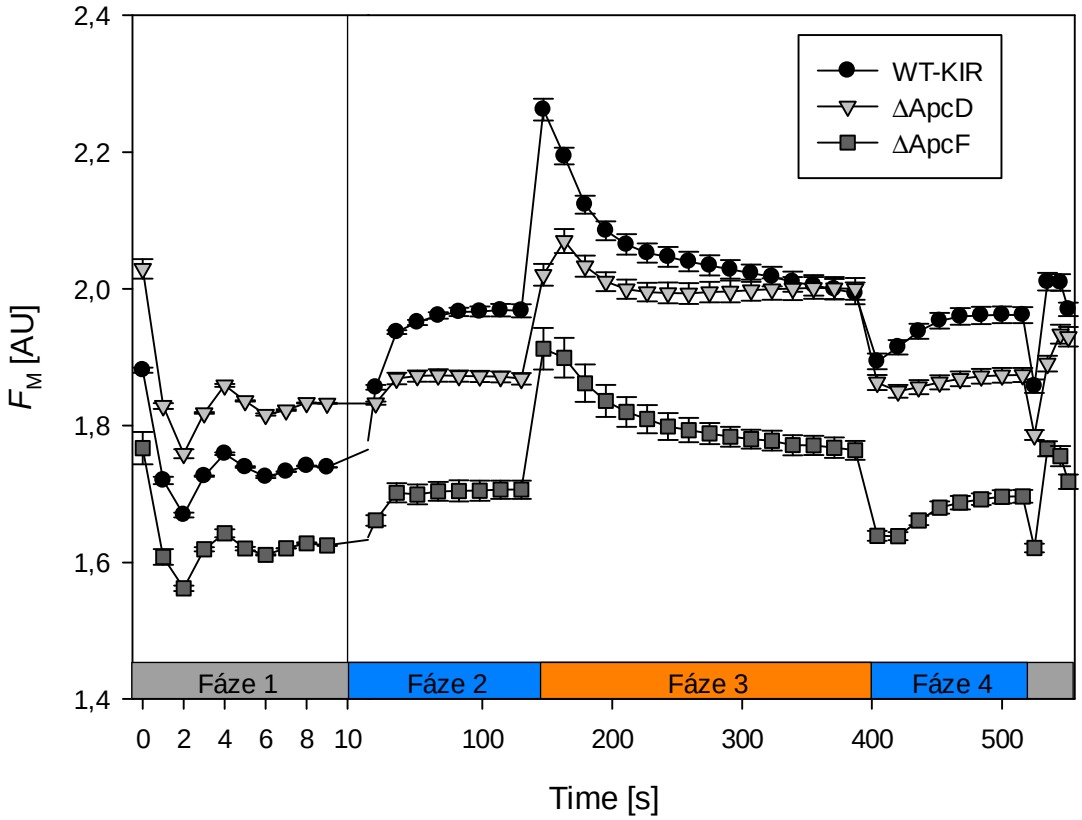
Křivky zobrazené v obrázku 11 vykazují podobný trend jako v obrázku 9 s rozdílem, že u měření s aplikací modrého aktinického světla je značný rozdíl také ve velikosti konektivity při PFA.

Tímto měřením jsem potvrdil, že měření fluorescence aplikací jedno−obrátkových záblesků s aktinickým světlem o vyšších intenzitách a vlnové délce 617 nm způsobuje rozdíl ve výsledných hodnotách oproti měření za použití PFA. Pro další měření jsem před každým jedno−obrátkovým zábleskem aplikoval PFA.

## 8.2 Měření stavových přechodů u sinic

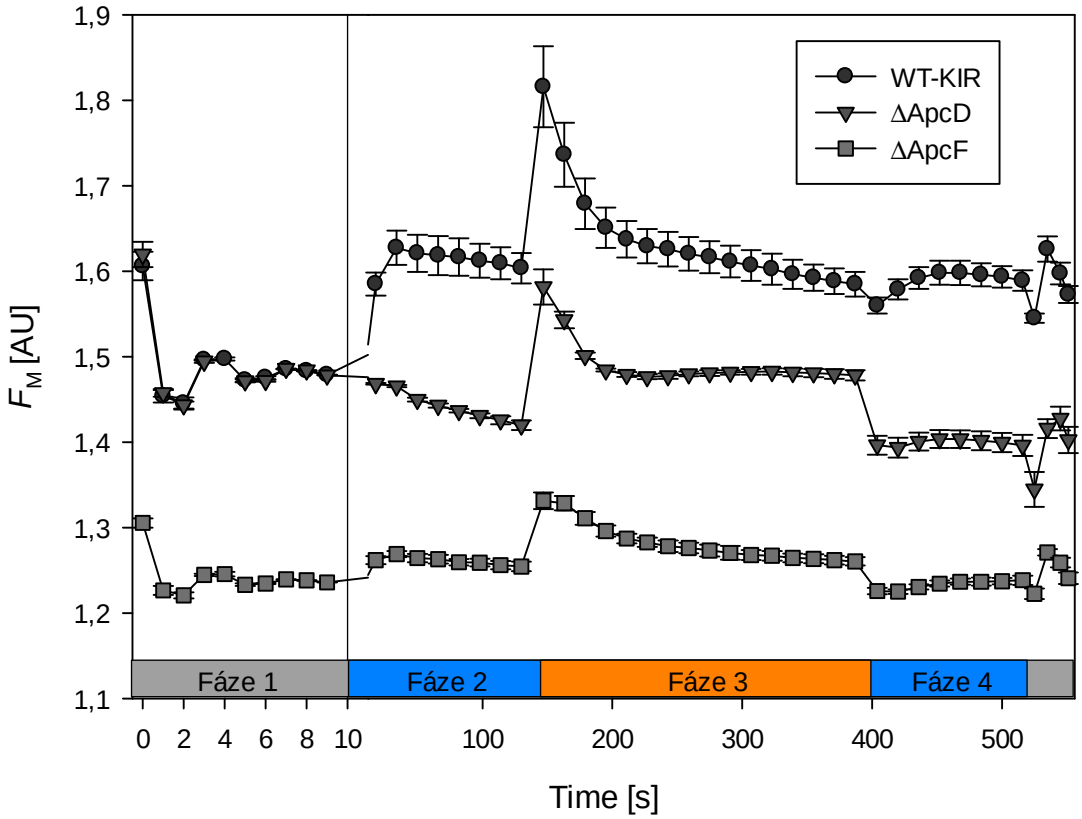
Změřil jsem standardní protokol pro zobrazení stavových přechodů s PFA na kultuře sinice *Synechocystis sp.* PCC6803 WT−KIR a dvou jejích mutantních druzích: ΔApcD kmen ve stavu 1 a ΔApcF kmen ve stavu 2. Hodnoty konektivity jsou zobrazeny

v grafech v příloze 2. Výsledné grafy zobrazující úrovně $F_M^{ST}$ jsou zobrazené v obrázcích 12 a 13.




**Obrázek 12:** Kinetika změn $F_M^{ST}$ excitací reakčních center modrými záblesky. Délka PFA byla 200 ms a intenzita modrého a oranžového aktinického světla 75 μmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$. Hodnoty $F_M$ jsou normalizovány na koncentraci odvozené z hodnoty $F_0$ měřené v čase 8 sekund.

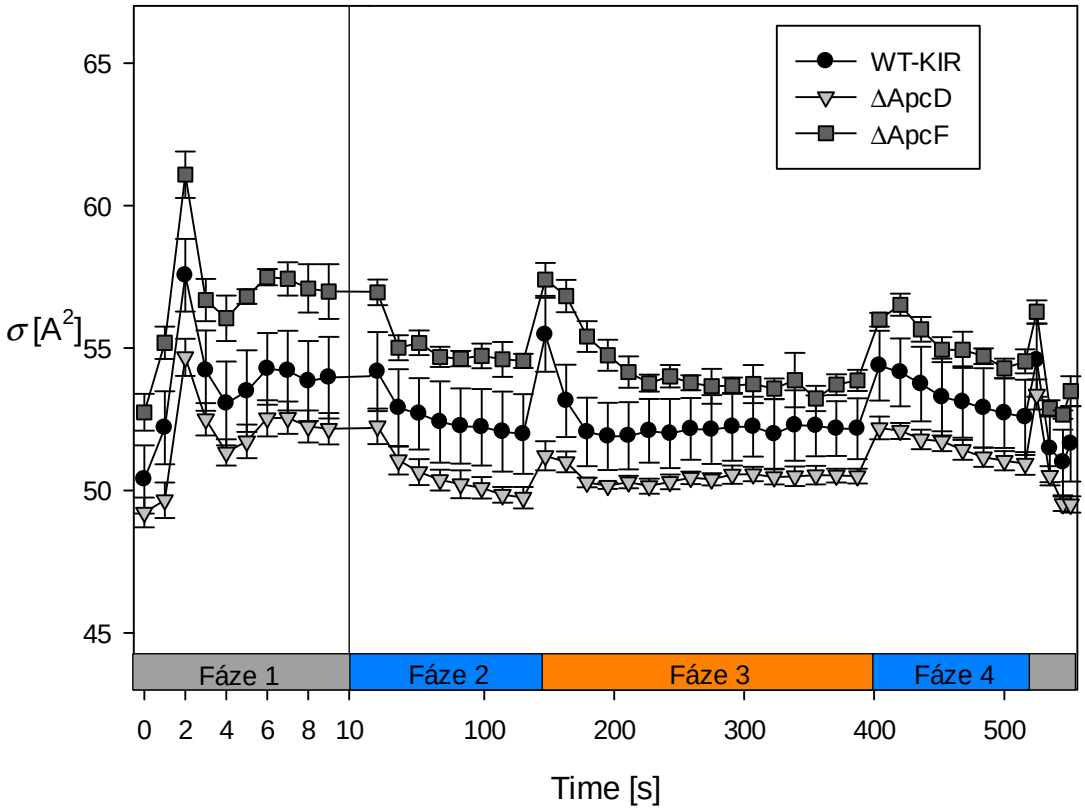
V obrázku 12 jsou u WT−KIR vidět změny úrovně $F_M^{ST}$. Na modrém světle (fáze 2 a 4), dochází k nárůstu úrovně $F_M^{ST}$, což je známkou stavových přechodů ze stavu 2 na stav 1. Pokles úrovně $F_M^{ST}$ ve fázi 3 odpovídá stavovým přechodům, konkrétně přechodu ze stavu 1 na stav 2. Mutantní kmen ΔApcD má minimální nárůst úrovně $F_M^{ST}$ ve fázi 2 a 4, což odpovídá předpokladu, že se může nacházet pouze ve stavu 2. Pokles úrovně $F_M^{ST}$ ve fázi 3 u mutantního kmenu ΔApcD je v poměru k WT−KIR značně malá. Mutantní kmen ΔApcF je schopen předávat excitační energii z fykobilisomu pouze na fotosystém I. Nárůst $F_M^{ST}$ ve fázi 2 a 4 je minimální, což odpovídá předpokladu, že není schopen přechodu na stav 1. Ve fázi 3 je pokles $F_M^{ST}$ značně podobný WT−KIR, i když celková intenzita $F_M^{ST}$ je slabší.




**Obrázek 13:** Kinetika změn $F_M^{ST}$ excitací fykobilisomů oranžovými záblesky. Délka PFA byla 200 ms a intenzita modrého a oranžového aktinického světla 75 μmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$. Hodnoty $F_M$ jsou normalizovány na koncentraci chlorofylu *a* odvozené z hodnoty $F_0$ měřené v čase 8 sekund.

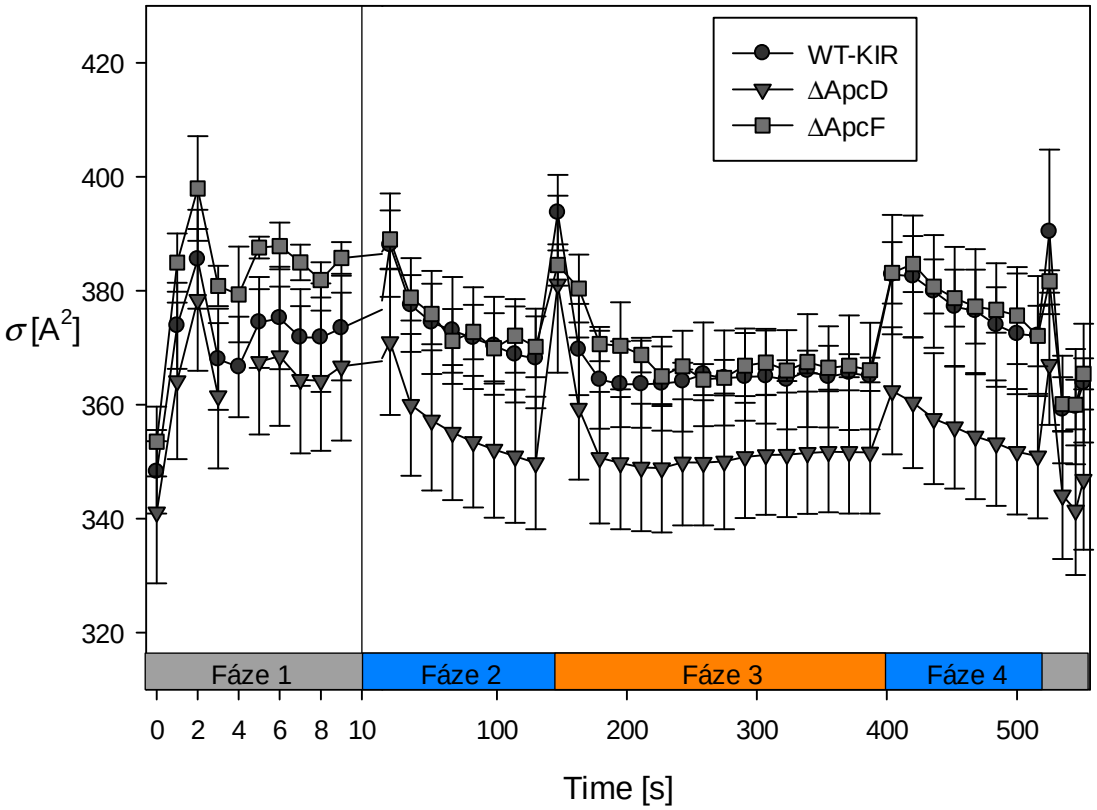
Průběh změn $F_M^{ST}$ zobrazený v obrázku 13 vykazuje u WT−KIR nárůst ve fázi 2 a 4 a pokles ve fázi 3. Tento průběh odpovídá stavovým přechodům. Mutantní kmen ΔApcD nevykazuje navýšení hodnoty $F_M^{ST}$ ve fázi 2 a 4, což odpovídá předpokladu, že se již ve stavu 1 nachází.

Kinetiky efektivní velikosti chlorofylových antén a fykobilisomů jsou zobrazeny v obrázcích 14 a 15 v tomto pořadí.




**Obrázek 14:** Kinetika efektivní velikosti chlorofylových antén měřených excitací modrými (455 nm) jedno−obrátkovými záblesky. Délka PFA byla 200 ms a intenzita modrého a oranžového aktinického světla 75 μmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$.

Efektivní velikost chlorofylových antén zobrazena v obrázku 14 je značně neměnná, ukazující společný trend poklesu ve fázích 2, 3 a 4, s počátečním nárůstem na začátku fáze 3 a 4.




**Obrázek 15:** Kinetika efektivní velikosti fykobilisomových antén měřených excitací oranžovými (617 nm) jedno−obrátkovými záblesky. Délka PFA byla 200 ms a intenzita modrého a oranžového aktinického světla 75 μmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$.

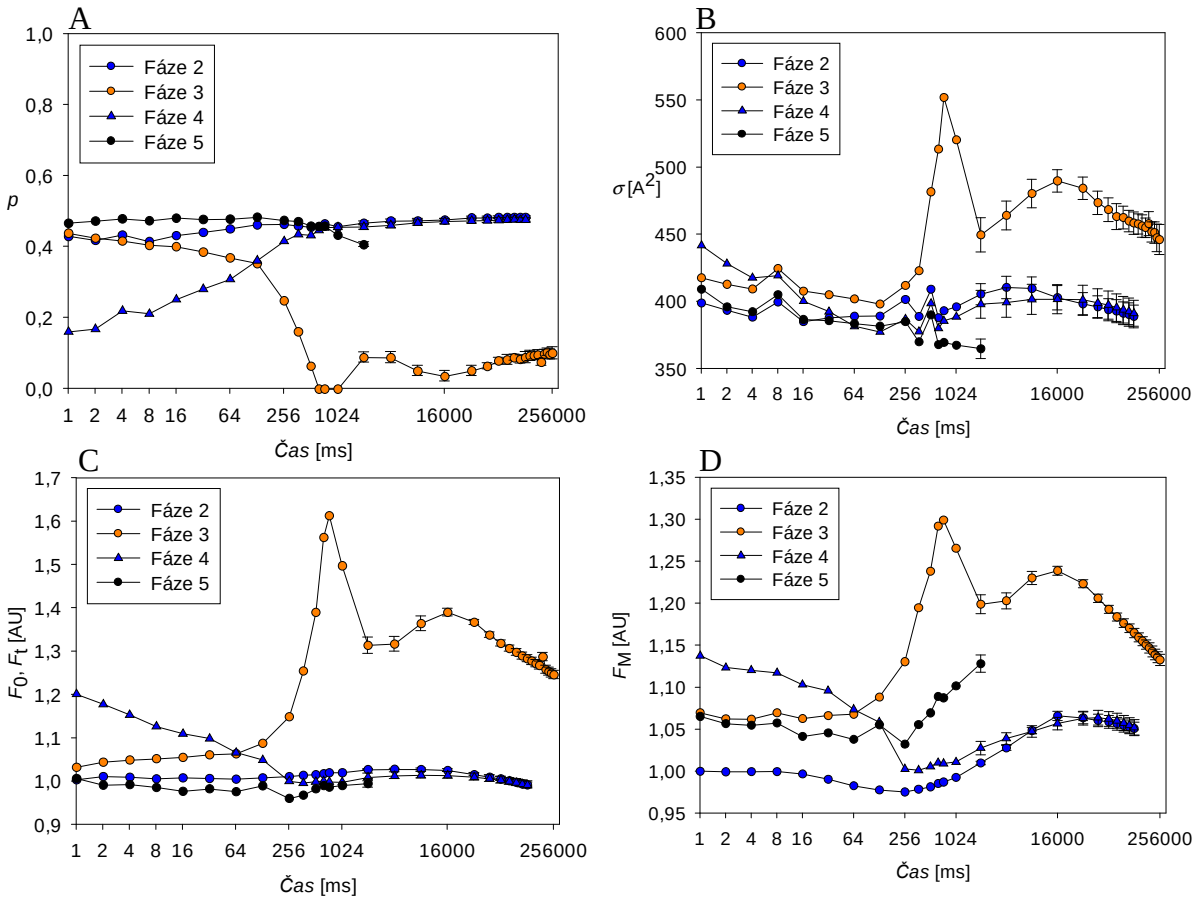
Efektivní velikost fykobilisomových antén zobrazena v obrázku 15 je značně neměnná s podobným trendem jako v obrázku 14, se společným trendem poklesu ve fázích 2, 3 a 4, s počátečním nárůstem na začátku fáze 3 a 4.

## 8.3 Kinetika rychlých změn *σ* během protokolu pro vyvolání stavových přechodů

Rychlé změny během zapnutí/vypnutí světla (přechod fáze 1-2 a 4-5) a při změně typu aktinického světla (přechod fáze 2-3 a 3-4) u protokolu pro vyvolání stavových přechodů (viz obrázek 12) jsem prozkoumal proměřením kinetiky parametrů $\sigma$, $p$, $F_0^{ST}$, $F_M^{ST}$ se zvýšeným časovým rozlišením na začátku jednotlivých fází, a to každý bod pro nový vzorek. Protokol jsem rozdělil na 5 fází, kde každá fáze odpovídá specifickým podmínkám aplikace aktinického světla a stavu vzorku. Schéma průběhu fází je zobrazeno v obrázku 16.

**Obrázek 16:** Schéma aplikace aktinického světla při měření protokolu pro vyvolání stavových přechodů. V průběhu fáze 1 a 5 není aplikováno aktinické světlo. V průběhu fáze 2 a 4 je vzorek vystaven aktinickému světlu s vlnovou délkou 455 nm a intenzitou 75 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$. V průběhu fáze 3 je vzorek vystaven aktinickému světlu s vlnovou délkou 617 nm a intenzitou 75 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$.

Změřené rychlé kinetiky jsem z důvodu přehledného zobrazení rozdělil podle jednotlivých fází. Fáze 1 není zobrazená, protože u ní probíhá pouze Kokova oscilace způsobená desynchronizací S−stavů vlivem jedno−obrátkových záblesků (Kok, Forbush et al. 1970). Výsledné kinetiky jsou zobrazené v obrázku 17.




**Obrázek 17:** Rychlá kinetika jednotlivých parametrů při stavových přechodech viz obrázek 12. Pro měření jsem použil *Synechocystis sp.* PCC 6803 WT−KIR, oranžové (617 nm) jedno−obrátkové záblesky a aktinické světlo o intenzitě 75 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ v barvě modré 455 nm zobrazené jako modrá výplň značek datových bodů a v barvě oranžové 617 nm zobrazené jako oranžová výplň značek datových bodů. Při měření jsem nepoužil PFA z technických důvodů. Podle testování efektu PFA by však vzniklá chyba byla relativně malá, protože jsem použil relativně nízkou úroveň intenzity aktinického světla viz obrázek 8.

Z obrázku 17 ve fázi 3 je viditelný jistý efekt pozvolného nárůstu parametrů $F_0^{ST}$ (obrázek 17C), $F_M^{ST}$ (obrázek 17D) a $\sigma$ (obrázek 17B), respektive pokles úrovně $p$ (obrázek 17A). Tato extrémní hodnota poté relaxuje do úrovně, kde podléhá změnám řádově pomalejším, odpovídající stavovým přechodům. Extrémní výkyv se vyskytuje v 750 ms po aplikaci oranžového aktinického světla. Průběh křivek jednotlivých fází v delších časech odpovídá průběhu měření zobrazeným v obrázku 13 a 15. Obrázky 13 a 15 však zobrazují hodnoty pouze od času 8 s. Spojitost průběhu změn jednotlivých fotosyntetických parametrů popisujících indukci fluorescence chlorofylu *a* a parametrů ($\sigma$, $p$) vyvolanou jedno−obrátkovým zábleskem ukazuje, že se jedná o efekt fyziologický a ne o artefakt měření.

## 8.4 Porovnání procesu NPQ a jeho korelace se $\sigma$ u různých fotosyntetických organizmů

Provedl jsem proměření průběhu parametrů $p$, $\sigma$, $F_0^{ST}$ a $F_M^{ST}$ silným aktinickým světlem stimulujícím NPQ. Hodnoty konektivity jsou zobrazeny v tabulce Tabulka 1.

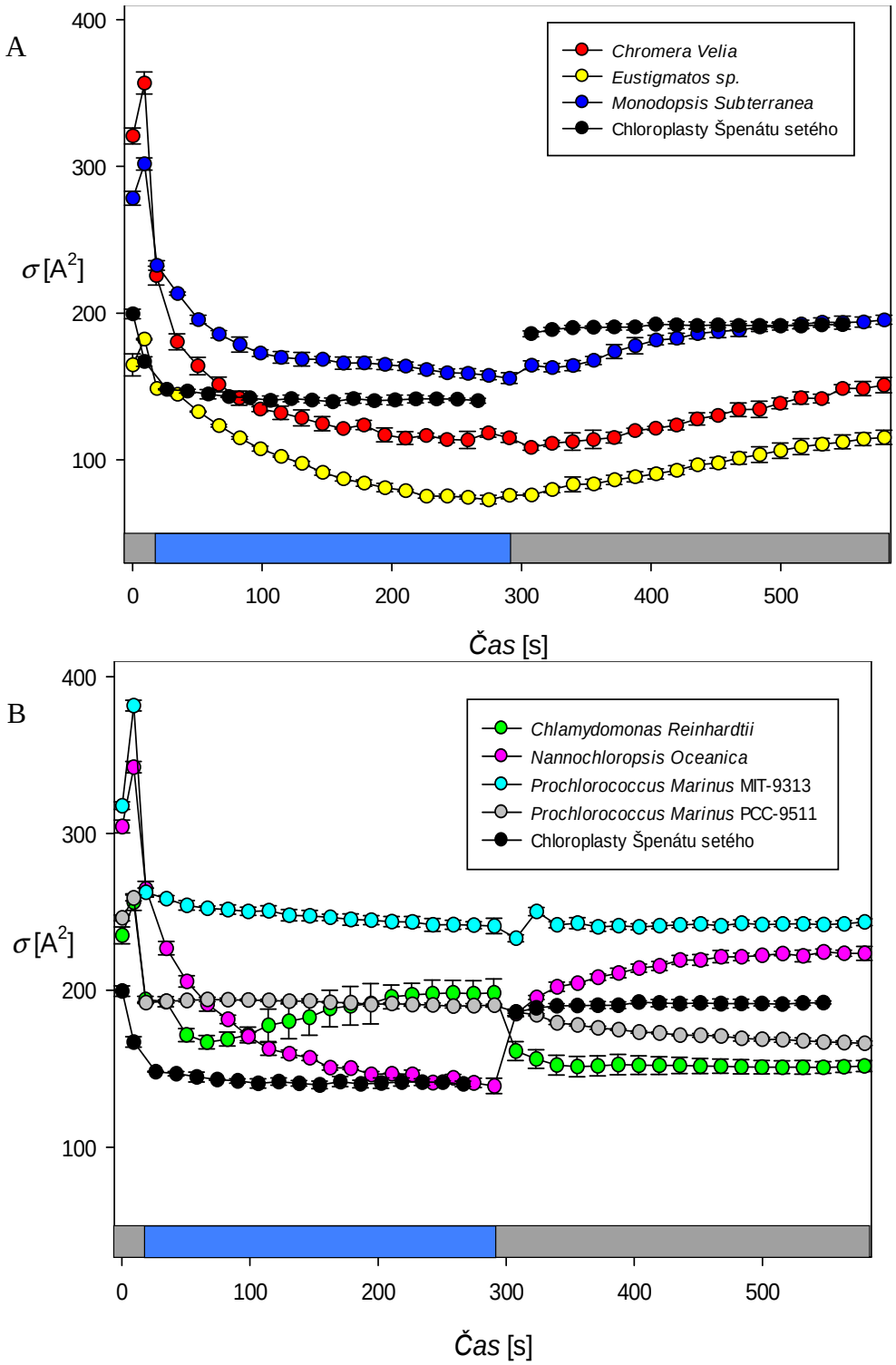
**Tabulka 1:** Hodnoty konektivity ($p$) ve vybraných bodech během stimulace aktinickým světlem. Směrodatná odchylka uvedených hodnot je průměrně 1 % s maximální hodnotou nepřesahující 6 % pro jednotlivé měření.

| Světelné podmínky | Tma (1) | | Světlo | | Tma (2) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Druh \ Čas | 0 s | 9 s | 8 s | 280 s | 8 s | 200 s |
| *Chromera Velia* | 0,30 | 0,32 | 0,33 | 0,01 | 0,01 | 0,06 |
| *Chlamydomonas Reinhardtii* | 0,47 | 0,41 | 0,36 | 0,23 | 0,26 | 0,29 |
| *Eustigmatos sp.* | 0,44 | 0,48 | 0,15 | 0,07 | 0,09 | 0,32 |
| *Monodopsis Subterranea* | 0,39 | 0,44 | 0,12 | 0,05 | 0,12 | 0,36 |
| *Nannochloropsis Oceanica* | 0,48 | 0,52 | 0,13 | 0,04 | 0,31 | 0,45 |
| *Prochlorococcus Marinus* MIT−9313 | 0,17 | 0,25 | 0,14 | 0,04 | 0,15 | 0,16 |
| *Prochlorococcus Marinus* PCC−9511 | 0,34 | 0,32 | 0,31 | 0,21 | 0,30 | 0,28 |

V měření zobrazené v tabulce 1 jsem indukci fluorescence vyvolal aplikací modrých (455 nm) jedno−obrátkových záblesků. Stav vzorku v bodě *„Tma (1) 0 s“*, *„Světlo 8 s“* a *„Tma (2) 8 s“* odpovídá hodnotám naměřeným hned po začátku měření nebo změně intenzity aktinického světla. Stav vzorku v bodě *„Tma (1) 9 s“*, *„Světlo 280 s“* a *„Tma (2) 200 s“* odpovídá hodnotám ustáleným, a to po vymizení oscilace způsobené postupnou desynchronizací S−stavů kyslík vyvíjejícího komplexu, po stabilizaci na aktinickém světle a po stabilizaci při relaxaci v tomto pořadí.

Vybrané hodnoty konektivity zobrazené v tabulce 1 ukazují převážný trend poklesu úrovně konektivity v průběhu aplikace aktinického světla s opětným navýšením ve fázi relaxace (viz tabulka 1, Tma (2)). U všech řas vyjma *Chlamydomonas Reinhardtii* a *Prochlorococcus Marinus* PCC−9511 došlo v průběhu aplikace aktinického světla ke snížení úrovně konektivity prakticky na nulu. U řasy *Chromera Velia* došlo k pomalejší reakci na aktinické světlo a míra navýšení ve fázi relaxace je minimální. U sinice *Prochlorococcus Marinus* je vidět rozdíl v úrovni konektivity, konkrétně druh MIT−9313 má úroveň konektivity celkově nižší, s nulovou úrovní v ustálené fázi aplikace aktinického světla oproti druhu PCC−9511, jehož úroveň konektivity je více neměnná.

Kinetika změn velikosti $\sigma$ na světle pro různé organizmy je zobrazena v obrázku 18.

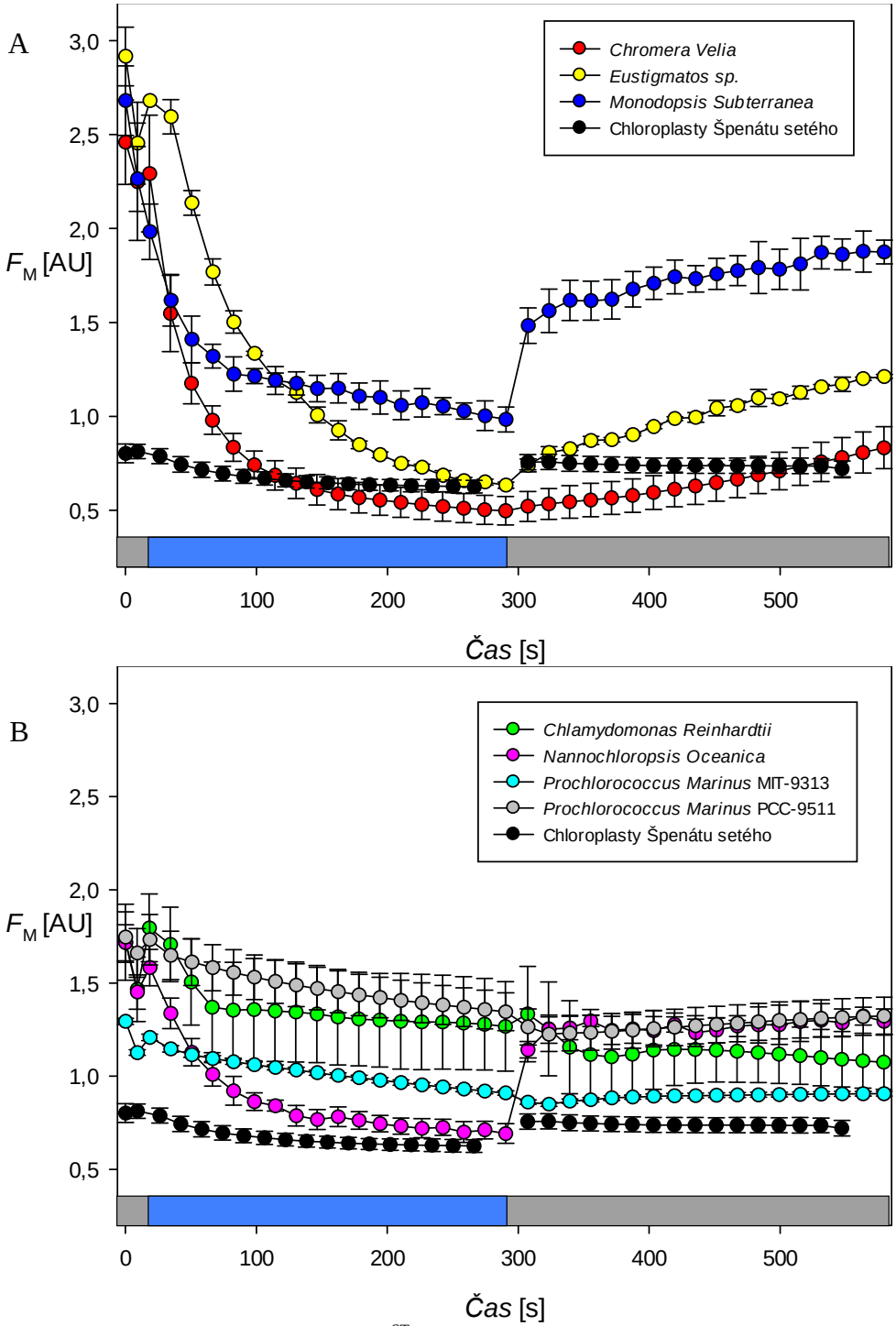



**Obrázek 18:** Porovnání $\sigma$ u jednotlivých druhů vystavených aktinickému světlu vyvolávajícímu proces NPQ. Indukci fluorescence jsem vyvolal aplikací modrých (455 nm) jedno−obrátkových záblesků. U řasy *Chromera Velia* jsem vyvolal proces NPQ pomocí oranžového aktinického světla o intenzitě 500 µmol kvant $\cdot$ m$^{-2}$ $\cdot$ s$^{-1}$ s použitím PFA o délce 200 ms. U *Eustigmatos sp.*, *Monodopsis Subterranea*, *Nannochloropsis Oceanica*, *Prochlorococcus Marinus* MIT−9313 a *Prochlorococcus Marinus* PCC−9511 jsem vyvolal proces NPQ pomocí modrého aktinického světla o intenzitě 200 µmol kvant $\cdot$ m$^{-2}$ $\cdot$ s$^{-1}$, s použitím PFA o délce 500 ms. U *Chlamydomonas Reinhardtii* a chloroplastů špenátu setého jsem vyvolal proces NPQ pomocí modrého aktinického světla o intenzitě 600 µmol kvant $\cdot$ m$^{-2}$ $\cdot$ s$^{-1}$, s použitím PFA

o délce 200 ms. Hodnoty velikosti antén u relaxace chloroplastů Špenátu setého jsem posunul o 24 s, aby fáze světla a relaxace odpovídaly ostatním měřením.

Hodnoty $\sigma$ zobrazené v obrázku 18A následují podobný trend jako konektivita, a to pokles po aplikaci aktinického světla a poté pozvolný nárůst ve fázi relaxace. Pro ilustraci jsem připojil kinetiku velikosti světlosběrných antén chloroplastů špenátu setého, kde je rychlost změn podstatně vyšší. Hodnoty $\sigma$ zobrazené v obrázku 18B jsou značně různorodé. Trend kinetiky u sinice *Prochlorococcus Marinus* (v obrázku 18B) je velmi podobný s rozdílem ve velikosti, kde druh MIT−9313 má $\sigma$ vyšší, než druh PCC−9511, a to přibližně o 20 %, což odpovídá vyššímu poměru chlorofylu *b* k chlorofylu *a* u druhu MIT−9313, jelikož chlorofyl *b* se vyskytuje hlavně v anténách. Hodnota $\sigma$ u *Nannochloropsis Oceanica* (v obrázku 18B) má podobný trend velikosti jako chloroplasty špenátu setého s opětovným rozdílem, a to ve vyšší rychlosti změn u chloroplastů špenátu setého. *Chlamydomonas Reinhardtii* (v obrázku 18B) vykazuje nezvyklý průběh kinetiky velikosti světlosběrných antén při porovnání s ostatními měřeními. Tento průběh je charakterizovaný počátečním poklesem $\sigma$ s následným nárůstem na počáteční hodnotu v průběhu aplikace aktinického světla. Ve fázi relaxace dojde k opačnému fenoménu a to k poklesu hodnoty $\sigma$.

Hodnoty velikosti $F_M^{ST}$ jsou zobrazeny v obrázku 19.



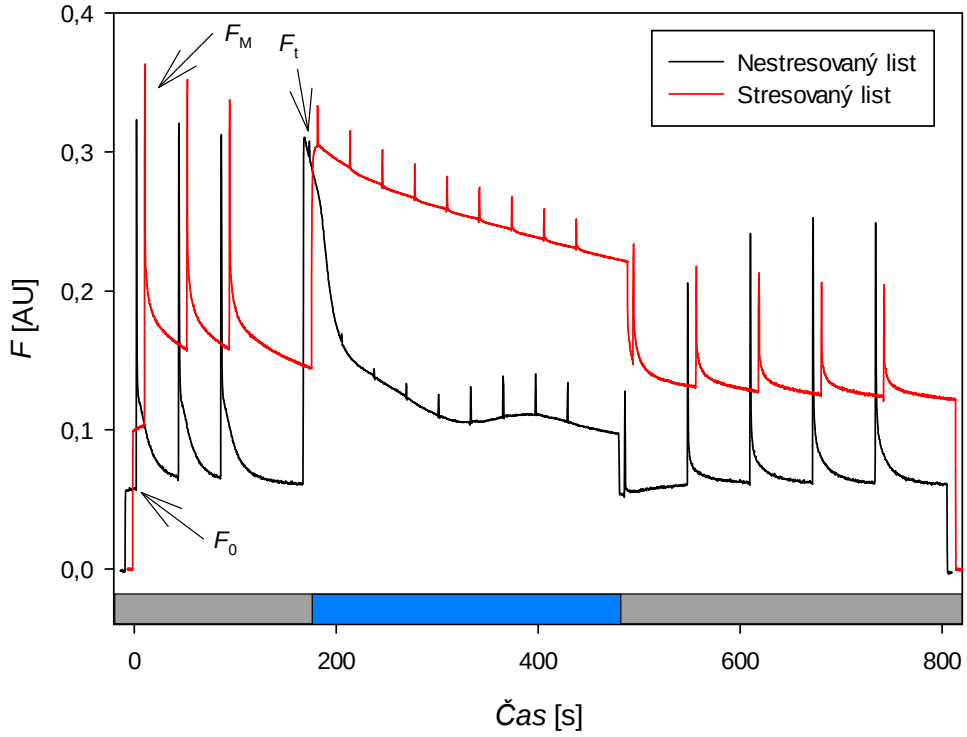

**Obrázek 19:** Porovnání úrovně $F_M^{ST}$ u jednotlivých druhů vystavených aktinickému světlu vyvolávajícímu proces NPQ. Indukci fluorescence jsem vyvolal aplikací modrých (455 nm) jedno−obrátkových zábleskŭ. U řasy *Chromera Velia* jsem vyvolal proces NPQ pomocí oranžového aktinického světla o intenzitě 500 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ s použitím PFA o délce 200 ms. U *Eustigmatos sp.*, *Monodopsis Subterranea*, *Nannochloropsis Oceanica*, *Prochlorococcus Marinus* MIT−9313 a *Prochlorococcus Marinus* PCC−9511 jsem vyvolal proces NPQ pomocí modrého aktinického světla o intenzitě 200 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ s použitím PFA o délce 500 ms. U *Chlamydomonas Reinhardtii* a chloroplastů špenátu setého jsem vyvolal proces NPQ pomocí modrého aktinického světla o intenzitě 600 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$, s použitím PFA o délce 200 ms. Hodnoty $F_M^{ST}$ u relaxace chloroplastů špenátu

setého jsem posunul o 24 s, aby fáze světla a relaxace odpovídaly ostatním měřením. Z důvodu přehlednosti jsem naměřené hodnoty rozdělil do dvou grafů.

Pokles $F_M^{ST}$ je patrně způsoben nárůstem NPQ u vzorku vystavenému vysokým intenzitám aktinického světla. Obrázek 19A zobrazuje kinetiku velikosti $F_M^{ST}$. Vzorky vykazují trend poklesu úrovně $F_M^{ST}$ po aplikaci aktinického světla, což odpovídá předpokladu, že dochází k stimulaci NPQ, které je reversibilní ve fázi relaxace ve tmě. Hodnoty velikosti $F_M^{ST}$, zobrazené v obrázku 19B, sledují podobný trend jako hodnoty v obrázku 19A, s výjimkou řasy *Chlamydomonas Reinhardtii*, u které došlo k dalšímu poklesu ve fázi relaxace. Oba druhy sinice *Prochlorococcus Marinus* sledují stejný trend, s mírným posunem, který je nejspíše způsoben rozdílnou koncentrací vzorků. K největšímu poklesu hodnoty $F_M^{ST}$ , a tedy patrně i ke stimulaci NPQ, došlo u druhů *Chromera Velia*, *Eustigmatos sp.*, *Monodopsis Subterranea* a *Nannochloropsis Oceanica*. Hodnoty $F_0^{ST}$, respektive $F_t^{ST}$ jsou zobrazeny v grafech v příloze 1.

## 8.5 Porovnání $\sigma$ s úrovní NPQ u špenátu setého

Pro získání chloroplastů s vysokým kvantovým výtěžkem fotosyntézy je nutné použít listy špenátu, které byly předem vystaveny minimálnímu stresu. Jelikož jsem listy špenátu určené pro izolaci chloroplastů získával z lokálního supermarketu, listy byly vystaveny různým druhům stresu. Jako prvotní posouzení použitelnosti jsem vybíral listy bez viditelného poškození, nezvadlé a s uniformním zeleným zabarvením. Protože pouze subjektivní posouzení kvality listu není dostatečné, provedl jsem v laboratoři proměření kvality pomocí fluorometru Dual PAM. Užil jsem protokol určený k vyvolání procesu NPQ, což sleduje efektivitu fotosystému II. Průběh fluorescence chlorofylu *a* je zobrazen v obrázku 20.

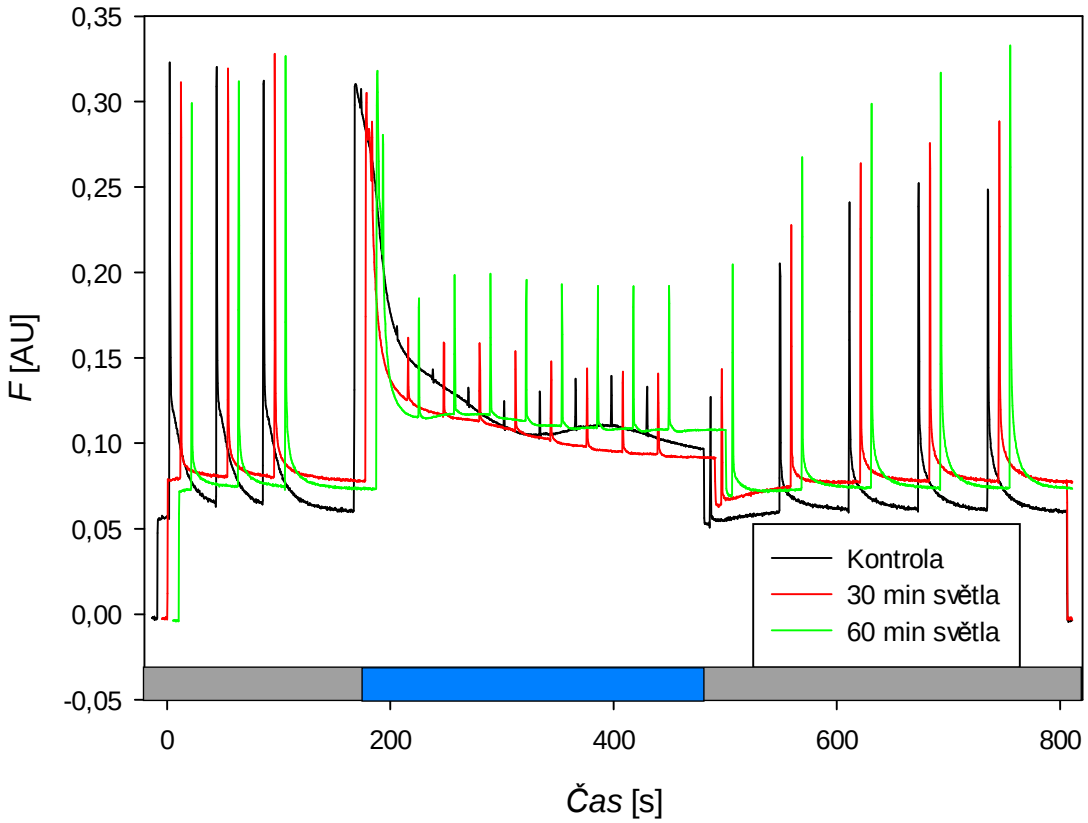



**Obrázek 20:** Průběh signálu fluorescence chlorofylu *a* u listu špenátu vybraného pro izolaci chloroplastů. Nestresovaný list vykazoval kvantový výtěžek fotosystému II o hodnotě 0,82 a stresovaný list 0,72. Stresované listy (které nebyly použity pro izolaci chloroplastů) byly vystaveny aktinickému světlu o intenzitě 600 µmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, průběh ozáření je zobrazen modrým pruhem pro světlo a šedým pruhem pro tmu ve spodní části grafu. Křivka, zobrazující průběh signálu pro stresovaný list je posunuta na časové ose o 10 s z důvodu zamezení překryvu.

Při porovnání intenzity fluorescence chlorofylu *a* v průběhu aplikace aktinického světla je u listu ze tmy (nestresovanému) vidět značný pokles $F_M^{MT}$ (Bjorkman and Demmig), což značí aktivaci fotoprotektivního mechanizmu NPQ (Ruban and Horton 1994). Tento pokles je mnohem pozvolnější u stresovaného listu. Po ukončení aplikace aktinického světla došlo u zdravého listu k zotavení hodnot $F_M'$ ze zhášeného stavu, což je indikováno nárůstem $F_M^{MT}$ ve tmě. Tento reverzní návrat $F_M^{MT}$ je u stresovaného listu kompletně nepřítomen. Tento test byl esenciální pro získání kvalitních listů, protože mnohokrát listy subjektivně považované za vyhovující po změření přístrojem Dual PAM vykazovaly průběh křivky, který neodpovídá standardnímu průběhu již dříve popsanému v (Muller, Li et al. 2001).

Pouze nestresované listy dle výše popsaného testu (viz obrázek 20) jsem použil pro izolaci chloroplastů. Pro získání vzorku izolovaných chloroplastů z listů vystavených

světelnému stresu jsem listy vystavil po dobu 30 min nebo 60 min světelnému záření o intenzitě 350 μmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ v dusíkaté atmosféře a stálé teplotě 23 °C. Tyto listy jsem ještě jednou proměřil pomocí Dual PAM fluorometru pro charakterizaci listu po vystavení intenzivnímu světlu. Porovnání křivek zobrazujících průběh fluorescence chlorofylu *a* v listech vystavených po různou dobu vysoké intenzitě světla je zobrazen v obrázku 21.

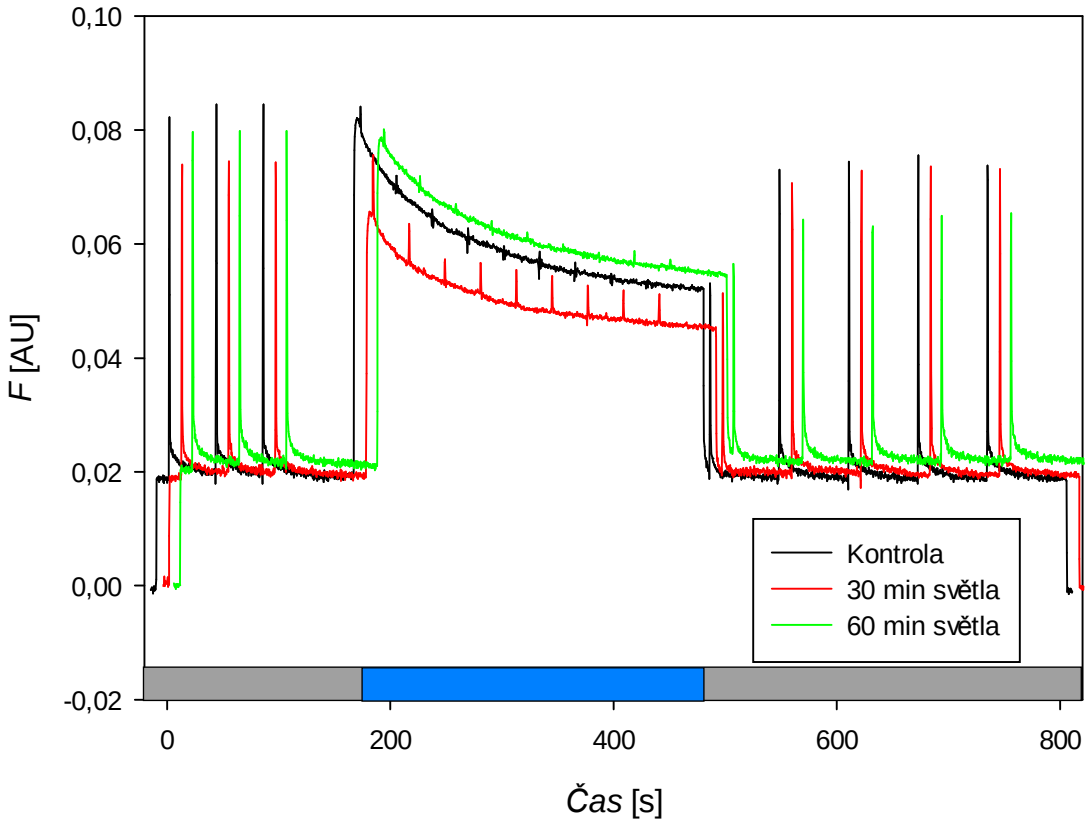



**Obrázek 21:** Průběh signálu fluorescence chlorofylu *a* u listu špenátu před izolací chloroplastů. Listy špenátu v grafu byly vystaveny vysokému světlu o intenzitě 350 μmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ v dusíkaté atmosféře po dobu 30 min a 60 min. List, který nebyl takto exponován (Kontrola), vykazoval kvantový výtěžek o hodnotě 0,82 a ošetřené listy po dobu 30 min a 60 min, 0,76 a 0,78 v tomto pořadí. V průběhu měření byly listy vystaveny aktinickému světlu o intenzitě 600 μmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$. Křivky zobrazující průběh signálu pro listy vystaveny 30 min a 60 min světla jsou posunuty na časové ose o 10 s a 20 s v tomto pořadí z důvodu zamezení překryvu.

Vliv intenzivního světla je viditelný při porovnání křivek v obrázku 21. Po aplikaci saturačního záblesku dojde k relaxaci zobrazené jako pozvolný pokles intenzity fluorescence chlorofylu *a* téměř až k úrovni $F_0$ (efekt je viditelný v prvních třech saturačních záblescích, viz čas cca 0 s – 150 s). Listy vystavené různým úrovním

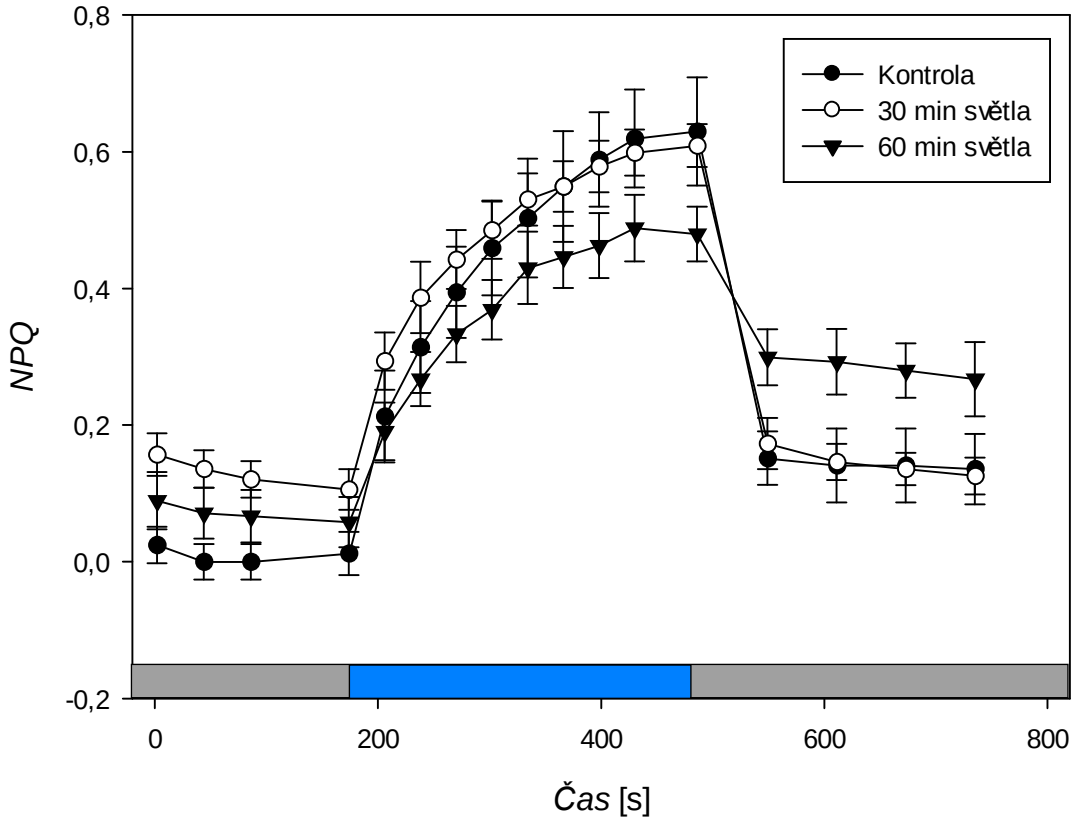
světelného stresu mají tento pokles mnohem výraznější, tj. k hodnotě $F_0$ se vrátí mnohem rychleji.

Z důvodu nestálosti chloroplastů jsem izolované chloroplasty použil pouze ke třem po sobě následujícím měřením. Vzorek chloroplastů pro Dual PAM fluorometr jsem naředil na výslednou přibližnou koncentraci chlorofylů 15 $\mu g \cdot ml^{-1}$ a vzorek pro FRR fluorometr na koncentraci desetkrát menší tj. 1,5 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Do obou vzorků jsem přidal Methyl viologen, jenž působí jako akceptor elektronů (Ofallon and Wright 1991) na výslednou koncentraci 100 $\mu mol \cdot ml^{-1}$.




**Obrázek 22:** Průběh signálu fluorescence chlorofylu a u vzorku chloroplastů. Vzorek chloroplastů označený jako kontrola byl připraven z listů nevystavených vysoké intenzitě světla. Zbylé vzorky chloroplastů byly připraveny z listů vystavených světelnému záření o intenzitě 350 $\mu mol\ kvant \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ v dusíkaté atmosféře po dobu 30 min a 60 min. Vzorek chloroplastů připravený z listů, které nebyly vystaveny vysokému světlu, vykazoval kvantový výtěžek o hodnotě 0,781 ± 0,004, ošetřené listy po dobu 30 min a 60 min, 0,78 ± 0,02 a 0,77 ± 0,01 v tomto pořadí. V průběhu měření byly listy vystaveny aktinickému světlu o intenzitě 600 $\mu mol\ kvant \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Křivky zobrazující průběh signálu pro 30 min a 60 min světla jsou posunuty na časové ose o 10 s a 20 s, v tomto pořadí, z důvodu zamezení překryvu.

Z obrázku 22 je vidět, že u všech měření byl stimulován proces NPQ, který byl reversibilní ve tmě. Vzorek, který jsem připravil z listů špenátu ošetřených světlem po dobu 60 minut, vykazoval menší úroveň NPQ a také úroveň zotavení ze zhasnutého stavu byla výrazně menší. To mohlo být způsobeno fotoinhibicí, která pravděpodobně proběhla z důvodu delší doby vystavení listů vyšším hladinám světelného záření, nebo z důvodu vystavení listů úrovni neznámého stresu před jejich získáním, nebo určitou kombinací obou. Z důvodu pozvolné degradace vzorku izolovaných chloroplastů docházelo k poklesu hodnot kvantového výtěžku, což se odrazilo na vyšší hodnotě směrodatné odchylky. Úroveň nefotochemického zhášení (NPQ) je zobrazena v obrázku 23.

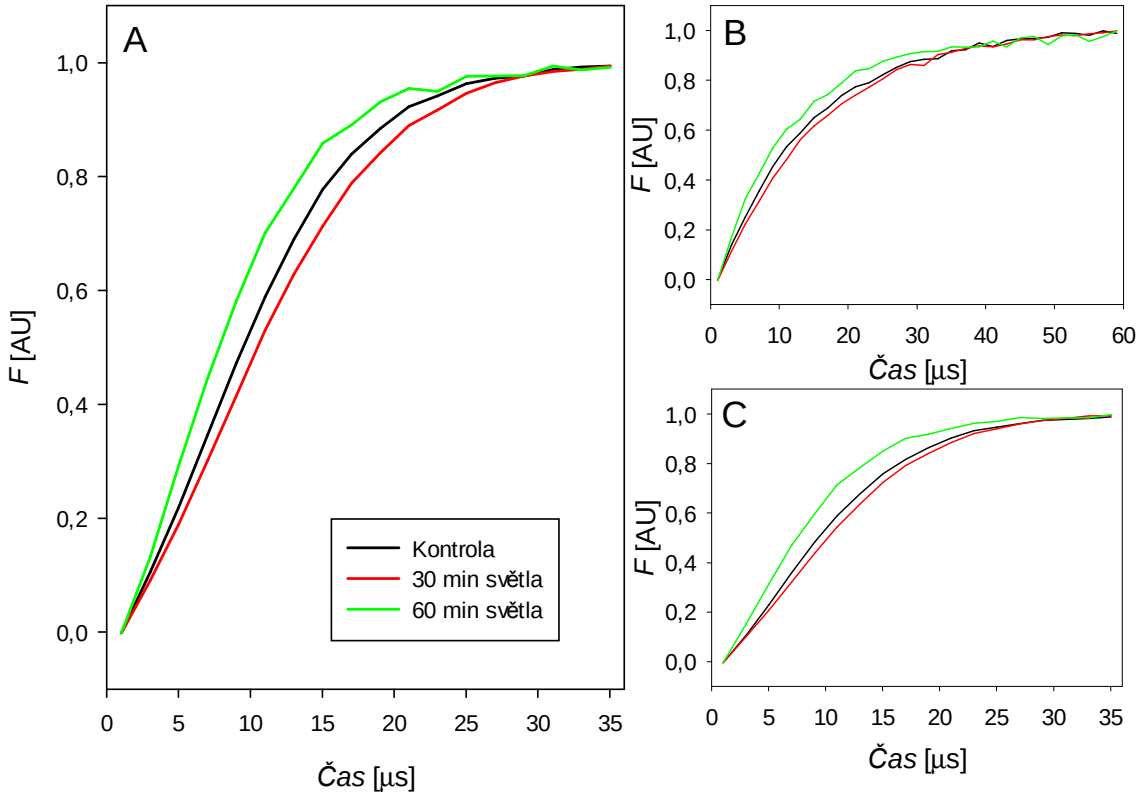



**Obrázek 23:** Průběh úrovně NPQ (viz kapitola 5, rovnice (3)) ve vzorcích chloroplastů. Jelikož vzorky vystavené vysokému světlu se vyskytují v částečně zhaslém stavu, mají nižší úroveň $F_M^{MT}$ na začátku měření. Pro výpočet velikosti NPQ jsem použil upravené hodnoty $F_M^{MT}$ pomocí velikosti $F_V$ získané z měření vzorku kontrola, který nebyl vystaven světelnému stresu.

Z obrázku 23 je patrné, že vzorek vystavený světelnému stresu po dobu 30 min má rychlejší nárůst úrovně NPQ. Dále u vzorku vystaveného po dobu 60 min světelnému stresu, jak bylo již zmíněno, lze jednoduše vidět nižší úroveň NPQ a následného návratu

ve tmě. Z obrázku 23 je také patrný jistý posun úrovně NPQ ve tmě na začátku křivek zobrazujících vzorky vystavené různé úrovni světelného stresu. Toto je způsobeno tím, že vzorky se již vyskytují ve stavu, kde byla hodnota $F_M^{MT}$ ve tmě snížena vlivem NPQ a pro výpočet jsem tedy použil upravené hodnoty $F_M^{MT}$ získané na začátku experimentu před vystavením vysokému světlu.

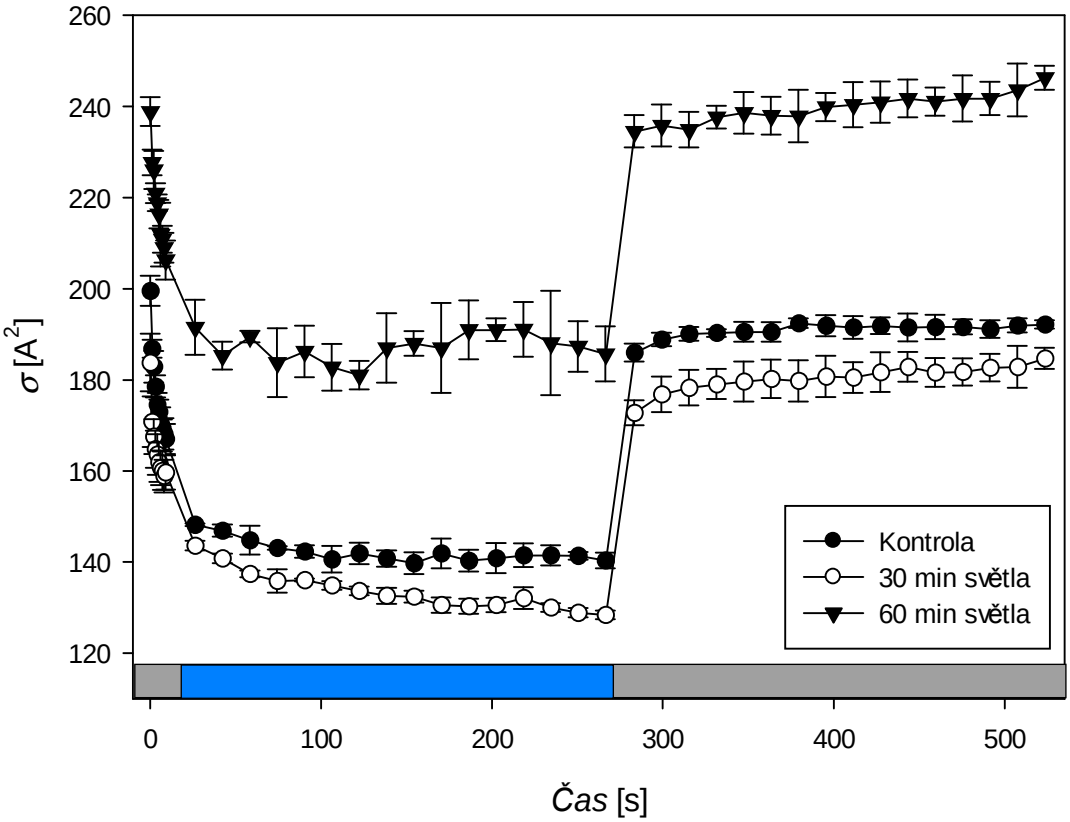
Při měření pomocí fluorometru Dual PAM jsem simultánně měřil vzorek pomocí FRR fluorometru (viz kapitola 7.3). Pomocí tohoto přístroje jsem aplikoval jedno−obrátkové záblesky a ze získané kinetiky fluorescence chlorofylu *a* poté pomocí fitování matematickým modelem změřil efektivní velikost antén fotosystému II ($\sigma$).




**Obrázek 24:** Typická kinetika fluorescence chlorofylu *a* excitované jedno−obrátkovým zábleskem u izolovaných chloroplastů. Jednotlivé křivky byly normalizované na $F_0$ a $F_M$. Zobrazené indukční křivky jsou z prvního připraveného vzorku. Graf A zobrazuje první bod měření (v čase 0 s v obrázku 25), graf B zobrazuje poslední bod měřený během aplikace aktinického světla (v čase 266 s v obrázku 25) a graf C zobrazuje bod na konci měření (v čase 507 s v obrázku 25).

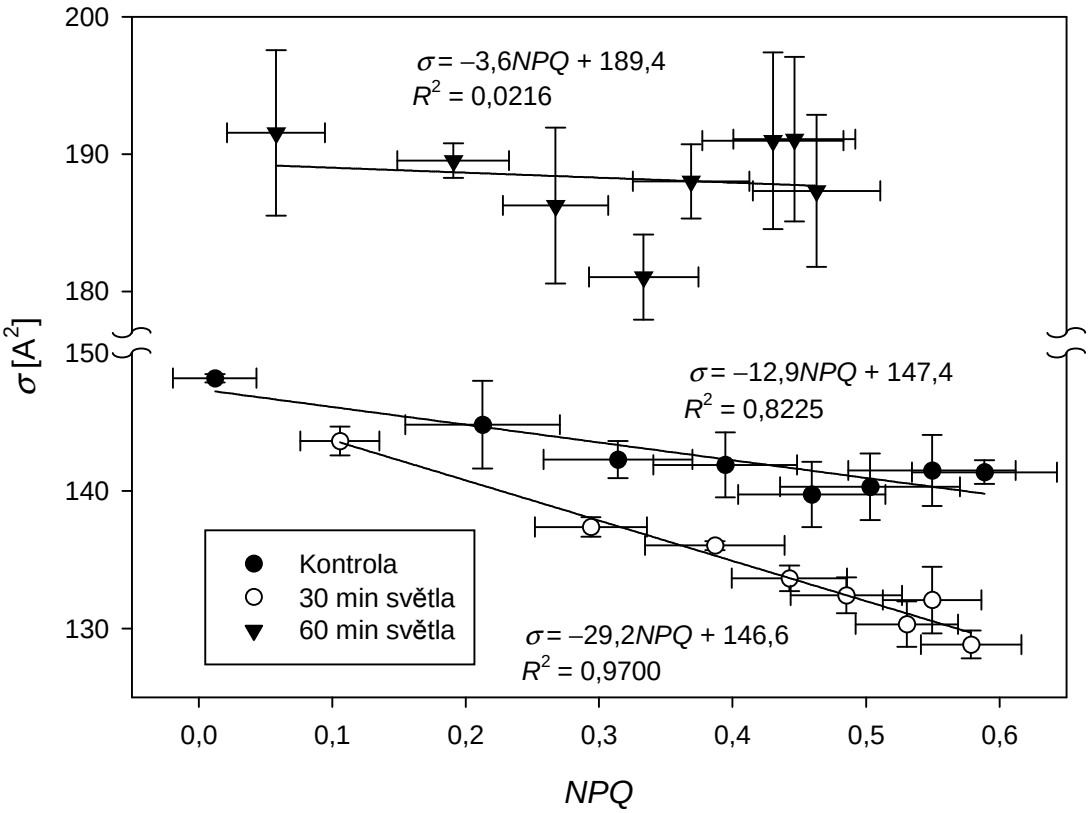
Z indukčních křivek nelze jednoduše vyčíst jednotlivé parametry, přestože průběh křivky vzorku vystaveného 30 min světelnému stresu je oproti křivce kontrolního vzorku chloroplastu posunutý na časové ose doprava, což značí větší velikost antén. Po nafitování

matematickým modelem jsem získal kompletní kinetiku změn velikosti antén fotosystému II.




**Obrázek 25:** Kinetika změn velikosti $\sigma$. Vzorek byl stimulován aktinickým světlem o intenzitě 600 μmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$. Náhlé změny před a po aplikaci aktinického světla ve velikosti jsou způsobené nedostatečným rozlišením měření v daném místě (viz kapitola 8.3).

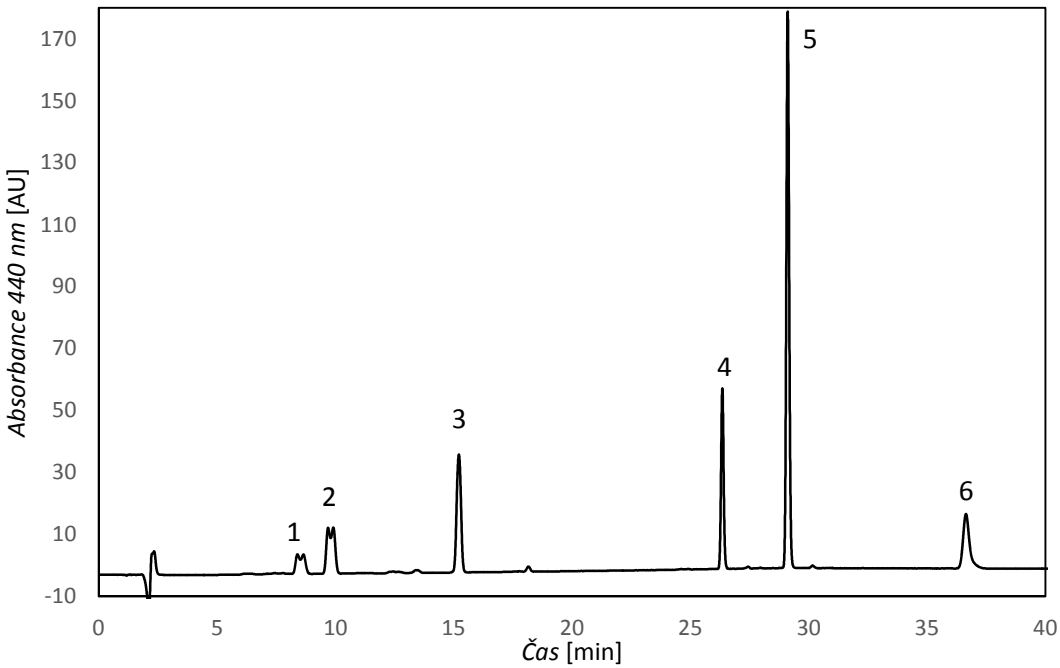
Po aplikaci aktinického světla během protokolu v obrázku 25, došlo k mírnému poklesu $\sigma$. Vzorek vystavený 60 min světelnému stresu v obrázku 25 má značně větší $\sigma$, která je nejspíše způsobená již výše zmíněnou fotoinhibicí. Zaměřil jsem se na část s aktinickým světlem a porovnal hodnoty s úrovní NPQ. Porovnání je zobrazeno v obrázku 26.




**Obrázek 26:** Závislost $\sigma$ na úrovni NPQ. Kontrola vykazuje směrnici o velikosti −12,9, vzorek vystaveny 30 min světelnému stresu −29,2 a vzorek vystavený 60 min světelného stresu −3,6.

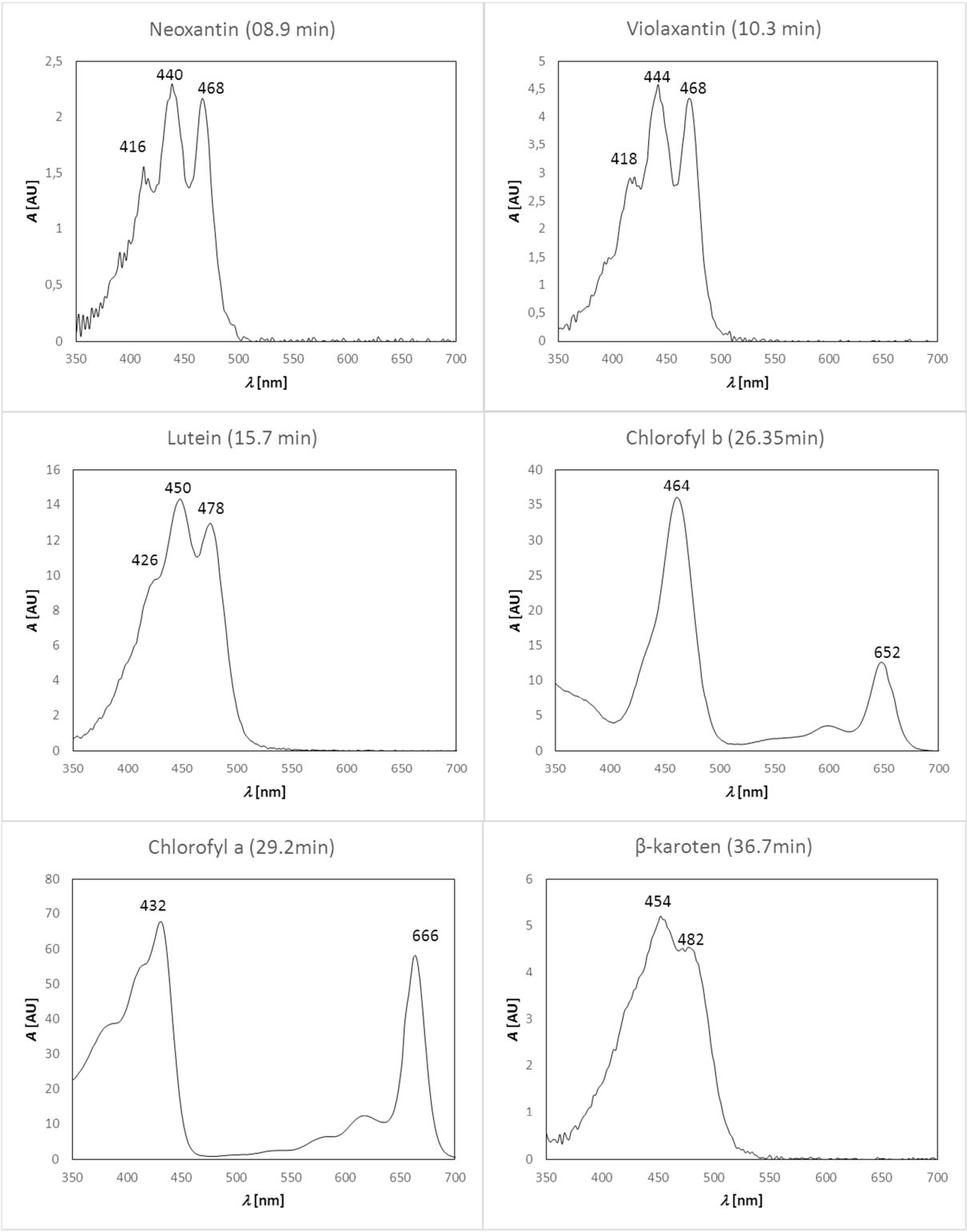
Z obrázku 26 je patrné, že rychlost změn $\sigma$ je ovlivněna úrovní světelného stresu. Jelikož při vystavení listu světelnému stresu se list dostane do stavu, kdy je stimulováno NPQ, tak první bod vzorku označeného jako 30 min je posunutý na úroveň NPQ o velikosti přibližně 0,1.

Pro detailní analýzu pigmentů jsem nechal změřit extrahované pigmenty ze vzorků izolovaných chloroplastů pomocí metody HPLC. Výsledný chromatogram je zobrazen v obrázku 27.




**Obrázek 27:** Chromatogram získaný z HPLC analýzy pigmentů ve vzorku špenátu (kontrola). Jednotlivé pigmenty zobrazené v grafu jsou: 1 neoxantin, 2 violaxantin, 3 lutein, 4 chlorofyl *b*, 5 chlorofyl *a*, 6 β−karoten. Zeaxantin by se měl eluovat hned před luteinem v čase okolo 15 minut a anteraxanting okolo 12 minut.

Při analýze chromatogramů pigmentu jsem nenašel známky výskytu zeaxantinu, jenž by se měl ve vzorku vyskytovat po jeho vystavení světelnému stresu. Chromatogramy ostatních vzorků vypadají stejně. Jednotlivá absorpční spektra jsou zobrazena v obrázku 28.




**Obrázek 28:** Absorpční spektra jednotlivých eluovaných frakcí z HPLC. V jednotlivých grafech jsou zobrazeny vlnové délky lokálních maxim, které je možno porovnat s literaturou, a podle toho určit typ pigmentu.

# 9 Diskuze

Při měření protokolů s vyšší intenzitou aktinického světla jsem si povšiml, že docházelo k výraznému nárůstu $\sigma$ (viz obrázky 12 a 13). Jedním z možných vysvětlení je chyba při aplikaci matematického modelu na experimentální data. Podle článku (Kolber, Prasil et al. 1998) je model popisující indukční křivky získané na aktinickém světle jiný, než model popisující indukční křivky získané ve tmě. Jedním z řešení by mohla být úprava fitovacího modelu. Ale jelikož pro nový model bych potřeboval znát parametry velikosti amplitud a rychlostních konstant $Q_A^-$ reoxidace, které jsem neměřil, zvolil jsem cestu úpravy měřícího protokolu a to přidáním krátké (řád stovek ms) tmy před každý jedno−obrátkový záblesk v průběhu aplikace aktinického světla. Tato krátká, před záblesková adaptace ve tmě PFA (anglicky: Pre Flash Adaptation), umožnila otevření reakčních center, která byla zavřena aktinickým světlem. Tímto jsem zaručil předpoklad, že na začátku měření jedno−obrátkovou excitací jsou všechna reakční centra otevřená, a že v průběhu měření nedochází k $Q_A^-$ reoxidaci. Pro ověření mého předpokladu jsem provedl porovnání měření obou přístupů (protokol bez a s aplikací PFA) při různých intenzitách aktinického světla (viz obrázky 8 a 10).

Rozdíl mezi hodnotami s a bez aplikace PFA jsou výrazné při měření s aplikací oranžového aktinického světla. Přechody mezi jednotlivými intenzitami oranžového (617 nm) aktinického světla u měření bez PFA, zobrazené v obrázku 8, jsou náhlé bez viditelné spojitosti. Toto může být vysvětleno vzniklou chybou při fitování nebo neznámým, velice rychlým procesem. Oproti tomu hodnoty měření s aplikací PFA jsou relativně stabilní, nebo vykazují pozvolnou změnu způsobenou jiným efektem, u modrého (455 nm) aktinického světla proces NPQ u vyšších intenzit (Kirilovsky 2007).

Body v obrázku 8 byly získány měřením pomocí jedno−obrátkové excitace fluorescence chlorofylu *a*, ukázka indukčních křivek pro hodnotu 500 μmol kvant $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ je zobrazena v obrázku 9. Odlišný průběh indukční křivky s a bez použití PFA, zobrazené v obrázku 9 pro oranžové (617 nm) aktinické světlo má pro měření bez aplikace PFA rychlejší nárůst hodnoty fluorescence. Za předpokladu, že při měření ve vzorku bez aplikace PFA bylo určité procento reakčních center v různých fázích reoxidace, efektivita předávání excitační energie ze zavřeného reakčního centra na jiné otevřené byla nízká, což se odráželo v nulové konektivitě. Tento efekt se vyskytoval pouze při použití oranžového (617 nm) aktinického světla pro obě barvy měřících ST záblesku.

Tímto experimentem jsem ověřil efekt aplikace PFA na výsledné hodnoty u sinic. Pro další měření jsem, pokud to bylo možné, používal PFA před samotnou aplikací jedno−obrátkových záblesků.

S protokolem s PFA jsem proměřil proces stavových přechodů v sinici *Synechocystis sp.* PCC 6803 WT−KIR a jejích mutantních kmenů neschopných stavových přechodů, ΔApcD a ΔApcF (viz obrázky 12, 13, 14 a 15). Jak vidno ze změny $F_M^{ST}$, WT−KIR vykazuje stavový přechod, a to ze stavu 2 na stav 1, při aplikaci modrého (455 nm) aktinického světla (viz obrázky 12 a 13, fáze 2 a 4). Tento stavový přechod je charakterizovaný nárůstem $F_M^{ST}$ (Mullineaux and Allen 1990). Při tomto stavovém přechodu dochází k mírnému poklesu $\sigma$ (viz obrázky 14 a 15, fáze 2 a 4). Toto pozorování je v rozporu s předpokladem, že při stavovém přechodu ze stavu 2 na stav 1 dochází k nárůstu $\sigma$ (Kirilovsky, Kana et al. 2013). Tento nárůst bychom měli pozorovat v obrázku 15 fáze 2 a 4, avšak k nárůstu nedošlo. Stavový přechod ze stavu 1 na stav 2 vyvolaný oranžovým (617 nm) aktinickým světlem je charakterizovaný poklesem hladiny $F_M^{ST}$. Stavové přechody zobrazené v kapitole knihy (Kirilovsky, Kana et al. 2013) ukazují takovýto pokles, avšak k měření byly využity mnoho−obrátkové pulzy měřené pomocí PAM fluorometru o délce 400 ms. Světelných podmínek pro vyvolání stavového přechodu ze stavu 1 na stav 2 oranžovým (617 nm) aktinickým světlem jsem docílil ve fázi 3 v obrázcích 12 a 13. Úroveň $F_M^{ST}$ zaznamenala výrazný nárůst s následným poklesem sledující charakteristiku stavového přechodu zobrazenou v kapitole knihy (Kirilovsky, Kana et al. 2013). Při přechodu ze stavu 2 na stav 1 dochází k reorganizaci fykobilisomů, a to nahromaděním okolo fotosystémů I. Z toho můžeme usuzovat, že dojde ke snížení $\sigma$, což je možné vidět v obrázku 15 ve fázi 3. Pokles je sice viditelný, ale stabilizovaná velikost je téměř totožná se stabilizovanou velikostí ve fázi 2, tj. ve stavu 1. Korelaci $\sigma$ s $F_M^{ST}$ jsem pozoroval avšak oproti předpokladu s nepřímo úměrnou závislostí při stavovém přechodu vyvolanému modrým (455 nm) aktinickým světlem a s přímo úměrnou závislostí, avšak s minimálními změnami, pro stavový přechod vyvolaný pomocí oranžového (617 nm).

Náhlá změna na začátku jednotlivých světelných fází (viz obrázky 14 a 15) se lišila od podobného experimentu provedeného pomocí PAM fluorometrie zobrazené v kapitole knihy (Kirilovsky, Kana et al. 2013). Provedl jsem proměření rychlé kinetiky v místech změny v aplikaci aktinického světla. Kinetiky zobrazené v obrázku 17 vykazují neočekávaný, zato spojitý průběh. Vzhledem k tomu, že každý bod křivky byl získán

s novým vzorkem, spojitost kinetiky během přechodu mezi fázemi poukazuje na biologický proces a ne na artefakt způsobený technikou měření.

Dále jsem studoval závislost mezi stimulací NPQ zobrazenou jako pohles $F_M^{ST}$ a $\sigma$ u různých druhů (viz obrázky 18 a 19). Při porovnání průběhu zhášení fluorescence u různých druhů (viz obrázek 19 a tabulka 1) je patrné, že se zásadně liší. Druhy vykazující standardní průběh NPQ, tedy pokles $F_M^{ST}$ při stimulaci aktinickým světlem a následný nárůst ve fázi zotavení, jsou *Chromera Velia*, *Eustigmatos sp.*, *Monodopsis Subterranea*, *Nannochloropsis Oceanica* a chloroplasty špenátu setého. U obou druhů sinice *Prochlorococcus Marinus* nedošlo k výraznému procesu NPQ. *Chlamydomonas Reinhardtii* vykazuje malý pokles ve velikosti $F_M^{ST}$ (viz obrázek 19B)

Průběh změn $\sigma$ (viz obrázek 19) do jisté míry koreluje s $F_M^{ST}$. *Chlamydomonas Reinhardtii* vykazuje nezvyklý průběh $\sigma$ (viz obrázek 18B). Tento průběh na začátku sleduje pokles, který by odpovídal procesu NPQ, avšak přibližně minutu po začátku stimulace aktinickým světlem začne $\sigma$ narůstat. Po skončení stimulace aktinickým světlem dojde k pozvolnému poklesu $\sigma$ na přibližnou úroveň jejího stavu v jedné minutě po začátku aktinického světla. Tento průběh naznačuje, že zde probíhá jistý proces, který je aktivovaný silným aktinickým světlem a aktivní v jeho průběhu aplikace. V práci (Allorent, Tokutsu et al. 2013) popisují proces NPQ jako spojení dvou procesů a to proces regulace pH (Briantais, Vernotte et al. 1979) a proces stavových přechodů (Allen, Bennett et al. 1981). Data v práci (Allorent, Tokutsu et al. 2013), a to kinetika $F_M^{MT}$ při procesu NPQ, nekorelují s velikostí $F_M^{ST}$ (viz obrázek 19B). Ve zmiňované práci průběh v oblasti označované jako fáze II a fáze III avšak částečně odpovídá průběhu změn $\sigma$ (viz obrázek 18B).

V další části jsem se zaměřil na studium korelace $\sigma$ a NPQ u izolovaných chloroplastů, abych prověřil výsledky (Belgio, Kapitonova et al. 2014) pomocí naší metody detekce σ pomocí indukčních křivek fluorescence chlorofylu *a* jedno−obrátkovými záblesky. Nejprve jsem optimalizoval izolaci chloroplastů. Metoda pro extrakci chloroplastů popsaná v (Crouchman, Ruban et al. 2006) je uzpůsobená pro větší objem listů. Moje optimalizace spočívala ve snížení množství rostlinného materiálu potřebného pro izolaci intaktních chloroplastů. Optimalizovaný postup nedosahoval stejné preciznosti v homogenizaci, a proto výtěžek byl nižší, ale pro následující účely dostačující.

Pro účely porovnání jednotlivých metod měření fluorescence chlorofylu *a* pomocí jedno−obrátkových a mnoho−obrátkových záblesků jsem zvážil jednotlivé možnosti nastavení přístrojů Dual PAM a FL3500−F fluorometru. Oba přístroje umožnovaly využití modrého (460 nm) měřícího i aktinického světla vhodného pro anténní komplexy vyšších rostlin (Croce, Cinque et al. 2000).

Biologický materiál, listy špenátu setého, použitý pro izolaci intaktních chloroplastů jsem získával z lokálního supermarketu. Kontrolu vitality jsem prováděl dle hodnoty $F_V/F_M$.

Vyšší rostliny se chrání proti vyšší intenzitě světla pomocí fotoprotektivních mechanizmů (Ruban and Horton 1994; Muller, Li et al. 2001), aby zabránily poškození fotosyntetického aparátu (Kok 1956). Jedním z fotoprotektivních mechanizmů je NPQ. NPQ se projevuje výrazným zmenšením hodnoty $F'_M{}^{MT}$. Tento pokles jsem nepozoroval u listů špenátu setého vystavené zvýšené ozářenosti před měřením (viz obrázek 21) pro hodnotu $F'_M{}^{MT}$ ze tmy, ani u vzorku izolovaných chloroplastů (viz obrázek 22). Rozdíl jsem pozoroval až po zapnutí aktinického světla protokolu, kdy byl zřejmý rychlejší pokles $F_t$ a $F_M$ pro světlem stresované vzorky (viz obrázek 21, popisovaný modrým obdélníkem). U listů špenátu vystavenému 30 minut světelného stresu (viz obrázek 21) je viditelná rychlejší relaxace po saturačním mnoho−obrátkovém pulzu z úrovně $F_M{}^{MT}$ téměř na úroveň $F_0{}^{MT}$, v porovnání s kontrolním měřením. Tento efekt již není pozorovatelný u měření provedeném na vzorcích izolovaných chloroplastů. Vystavení listů světelnému stresu patrně dostatečně nestimulovalo proces NPQ. Mírný pokles na začátku průběhu NPQ (viz obrázek 23, první tři body) představuje stavový přechod způsobený saturačními mnoho−obrátkovými pulzy. Průběh NPQ na světle (viz obrázek 23, popisovaný modrým obdélníkem) sleduje charakteristický nárůst s poklesem ve fázi relaxace. Sledoval jsem podobnou úroveň NPQ pro vzorky izolovaných chloroplastů vystavených 30 minutám světelného světlu s kontrolním měřením. Rozdíl jsem zaznamenal v rychlejším nárůstu úrovně NPQ oproti kontrolnímu měření. Vzorek izolovaných chloroplastů vystavených 60 minutám světelného stresu vykazoval známky fotoinhibice.

Změny hodnot NPQ měřené metodou PAM jsem porovnal se změnou hodnot $\sigma$ měřené metodou jedno−obrátkových záblesků během světelné fáze protokolu (viz obrázky 23 a 25, část popsaná modrým obdélníkem). Sledovaný pokles $\sigma$ v průběhu aktinického světla (viz obrázek 25) není dříve popsaný. Toto měření můžeme porovnat

s měřením provedeném v práci (Belgio, Kapitonova et al. 2014), které bylo také provedeno na chloroplastech izolovaných z listů špenátu setého, nebo s měřením provedeném v práci (Koblizek, Kaftan et al. 2001), které bylo provedeno také na zelené řase *Desmodesmus quadricauda* (v práci označované jako *Scenedesmus quadricauda*). Práce (Belgio, Kapitonova et al. 2014) byla provedená na chloroplastech a využívala jiné metody měření $\sigma$, a to metody popsané v (Malkin, Armond et al. 1981), která využívá inhibitoru 3−(3,4−dichlorophenyl)−1,1−dimethylurea (DCMU). Tento inhibitor se váže na plastochinon vázající místo na D1 proteinu fotosystému II, a tím zabraňuje přenosu elektronu v elektronovém řetězci (Pfister, Steinback et al. 1981). Mnou prováděné měření využívá způsobu FRR fluorometrie (viz (Kolber, Falkowski et al. 1992)), kterým je možné měřit $\sigma$ v nativním stavu bez použití DCMU. Toto může být jeden z důvodů rozdílu mezi mými výsledky a článkem (Belgio, Kapitonova et al. 2014). Dále v zmíněné práci měření $\sigma$ nebylo provedeno během aktinického světla, ale až těsně po jeho vypnutí. Z mého měření (viz obrázek 25 v čase 270 s) je patrné, že po vypnutí aktinického světla dochází k velmi rychlé reverzibilitě $\sigma$, tím mohou být výsledky práce (Belgio, Kapitonova et al. 2014) ovlivněny. Experiment provedený v práci (Koblizek, Kaftan et al. 2001) na zelené řase *Desmodesmus quadricauda* využíval stejné techniky měření $\sigma$ po vypnutí aktinického světla metodou jedno−obrátkových záblesků. V této práci ale neměřili $\sigma$ v průběhu aktinického světla, ale před jeho zapnutím a po jeho skončení.

Data získaná během světelné fáze protokolu FFR fluorimetrie (viz obrázky 23 a 25, část popsaná modrým obdélníkem) jsem využil pro stanovení korelace mezi $\sigma$ a NPQ (viz obrázek 26). Náš způsob měření umožňuje získat značné množství bodů k vytvoření korelace. Ostatní práce (Koblizek, Kaftan et al. 2001; Belgio, Kapitonova et al. 2014) mají mnohem menší počet měřených bodů a měření v průběhu světla není vůbec přítomno. V našem FRR protokolu jsem tmy nutné pro udržení všech reakčních center fotosystému II v otevřeném stavu docílil vypnutím aktinického světla na krátký okamžik (200 ms) před samotným měřením. Toto mi dovolilo vytvoření korelace $\sigma$ s úrovní NPQ. Během aktinického světla výsledky (viz obrázek 26), ukazují změny korelace pro různé vzorky. To lze vyjádřit směrnicí, která byla pro kontrolní měření −12,9. Záporná hodnota značí, že dochází k poklesu $\sigma$ v průběhu navýšení NPQ během měřicího protokolu na modrém světle (viz kinetika v obrázku 25 a korelace v obrázku 26). Pro vzorek vystavený světelnému stresu po dobu 30 min před měřením byla směrnice −29,2. Rychlost poklesu hodnoty $\sigma$ byla tedy 2,3 krát větší v porovnání s kontrolním měřením.

Poslední vzorek, který jsem vystavil světelnému stresu po dobu 60 min již nevykazoval téměř žádnou korelaci. U tohoto vzorku nejspíše došlo k fotoinhibici způsobené delším světelným stresem (Kok 1956; Aro, Virgin et al. 1993).

Pro ověření, zdali vzorek obsahuje navýšené množství deepoxidovaných xantofylů, které by mohly souviset s korelací kontrolního a vzorku vystaveného 30 min světelnému stresu (viz obrázky 23 a 26) jsem proměřil pigmenty pomocí HPLC. Výsledky HPLC ale neukázaly žádnou změnu epoxidace xantofylů. Při měření listů (viz obrázek 21) jsem pozoroval efekt, rychlejší relaxace signálu fluorescence chlorofylu *a* po aplikaci saturačního záblesků, který může ukázat, že vzorek obsahuje vyšší množství deepoxidovaných xantofylů. Tento efekt jsem ale už nepozoroval u měření provedeném na vzorku izolovaných chloroplastů (viz obrázek 22). Toto spolu s měřením z HPLC ukazuje, že mohlo dojít k epoxidaci zeaxantinu zpět na violaxantin v průběhu izolace intaktních chloroplastů, i když samotná izolace byla provedená velmi rychle (okolo 10 min).

# 10 Závěr

Optimalizoval jsem metodu měření efektivní velikosti světlosběrných antén PS II ($\sigma$) metodou jedno−obrátkových záblesků na aktinickém světle, přidáním krátkodobé adaptace ve tmě (PFA – Pre Flash Adaptation).

Prozkoumal jsem proces stavových přechodů na sinici *Synechocystis sp.* PCC 6803 a jejích mutantních kmenech ΔApcD a ΔApcF. Zjistil jsem, že při přechodu ze stavu 2 na stav 1 dochází k nepřímo úměrné závislosti mezi $\sigma$ a $F_M^{ST}$ a k přímo úměrné závislosti při přechodu ze stavu 1 na stav 2.

Prozkoumal jsem rychlé změny kinetiky $\sigma$ ve škále ms při změnách ve světelných podmínkách. Zjistil jsem, že výrazné změny $\sigma$ v průběhu zapnutí oranžového aktinického světla mají fyziologický charakter a nejedná se o artefakt měření.

Proměřil jsem proces zhášení NPQ u různých druhů sinic a eukaryotických druhů řas ze skupiny SAR. Zjistil jsem, že proces nefotochemického zhášení je rozdílný pro různé druhy a že většina druhů vykazuje přímo úměrnou závislost mezi $\sigma$ a $F_M^{ST}$ s výjimkou *Chlamydomonas Reinhardtii*, která vykazuje atypický průběh kinetiky $\sigma$.

Prozkoumal jsem změny $\sigma$ a NPQ v průběhu aktinického světla pro různě světlem stresované vzorky izolovaných chloroplastů špenátu. Tyto výsledky jsem porovnal a došel k závěru, že $\sigma$ je nepřímo úměrná NPQ, a že nefotoinhibující světelný stres (vyvolaný 30 min světelného ozáření) tuto závislost ještě zvyšuje.

# 11 Přehled použité literatury


Allen, J. F., J. Bennett, et al. (1981). "Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems." Nature **291**: 25.

Allen, J. F., W. B. M. de Paula, et al. (2011). "A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis." Trends in Plant Science **16**(12): 645-655.

Allorent, G., R. Tokutsu, et al. (2013). "A Dual Strategy to Cope with High Light in Chlamydomonas reinhardtii." Plant Cell **25**(2): 545-557.

Aro, E. M., I. Virgin, et al. (1993). "Photoinhibition of photosystem-2 - inactivation, protein damage and turnover." Biochimica Et Biophysica Acta **1143**(2): 113-134.

Arsalane, W., B. Rousseau, et al. (1992). "Isolation and characterization of native pigment protein complexes from 2 Eustigmatophyceae." Journal of Phycology **28**(1): 32-36.

Austin, J. R. and L. A. Staehelin (2011). "Three-Dimensional Architecture of Grana and Stroma Thylakoids of Higher Plants as Determined by Electron Tomography." Plant Physiology **155**(4): 1601-1611.

Bassham, J. A., A. A. Benson, et al. (1950). "The Path of Carbon in Photosynthesis VIII. The Role of MalicAcid." Journal of Biological Chemistry **185**(2): 781-787.

Belgio, E., E. Kapitonova, et al. (2014). "Economic photoprotection in photosystem II that retains a complete light-harvesting system with slow energy traps." Nature communications **5**: 4433.

Bjorkman, O. and B. Demmig (1987). "Photon yield of O2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins." Planta **170**(4): 489-504.

Briantais, J. M., C. Vernotte, et al. (1979). "A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **548**(1): 128-138.

Bryant, D. A. and N.-U. Frigaard (2006). "Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated." Trends in Microbiology **14**(11): 488-496.

Burki, F., K. Shalchian-Tabrizi, et al. (2007). "Phylogenomics Reshuffles the Eukaryotic Supergroups." PLOS ONE **2**(8): e790.

Butler, W. L. (1978). " Energy-distribution in photo-chemical apparatus of photosynthesis." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **29**: 345-378.

Croce, R., G. Cinque, et al. (2000). "The Soret absorption properties of carotenoids and chlorophylls in antenna complexes of higher plants." Photosynthesis Research **64**(2-3): 221-231.

Crouchman, S., A. Ruban, et al. (2006). "PsbS enhances nonphotochemical fluorescence quenching in the absence of zeaxanthin." FEBS Letters **580**(8): 2053-2058.

Deisenhofer, J. and H. Michel (1989). "The photosynthetic reaction center from the purple bacterium rhodopseudomonas-viridis." Science **245**(4925): 1463-1473.

Demmig-Adams, B. (1990). "Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1020**(1): 1-24.

Demmig, B., K. Winter, et al. (1987). "Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves - a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy." Plant Physiology **84**(2): 218-224.

Emerson, R. and W. Arnold (1932). "A separation of the reactions in photosynthesis by means of intermittent light." Journal of General Physiology **15**(4): 391-420.

Forbush, B. and B. Kok (1968). "Reaction between primary and secondary electron acceptors of photosystem II of photosynthesis." Biochim Biophys Acta **162**(2): 243-253.

Fromme, P. and P. Mathis (2004). "Unraveling the Photosystem I reaction center: a history, or the sum of many efforts." Photosynthesis Research **80**(1-3): 109-124.

Gorbunov, M. Y., F. I. Kuzminov, et al. (2011). "A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1807**(12): 1591-1599.

Govindjee (2004). Chlorophyll a Fluorescence: A Bit of Basics and History. Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. G. C. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht, Springer Netherlands**:** 1-41.

Harris, E. H., D. B. Stern, et al. (2009). The Chlamydomonas Sourcebook, Elsevier.

Heinz.Walz.GmbH (2006). "Dual-PAM-100 Measuring System for Simultaneous Assessment of P700 and Chlorophyll Fluorescence, Instrument Description and Instructions for Users ".

Hill, R., U. Schreiber, et al. (2004). "Spatial heterogeneity of photosynthesis and the effect of temperature-induced bleaching conditions in three species of corals." Marine Biology **144**(4): 633-640.

Horton, P., A. V. Ruban, et al. (1996). "Regulation of light harvesting in green plants." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **47**: 655-684.

Chisholm, S. W., S. L. Frankel, et al. (1992). "Prochlorococcus marinus nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll a and b." Archives of Microbiology **157**(3): 297-300.

Jallet, D., M. Gwizdala, et al. (2012). "ApcD, ApcF and ApcE are not required for the Orange Carotenoid Protein related phycobilisome fluorescence quenching in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803." Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics **1817**(8): 1418-1427.

John, D. M., B. A. Whitton, et al. (2002). The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae, Cambridge University Press.

Kirilovsky, D. (2007). "Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism." Photosynthesis Research **93**(1-3): 7-16.

Kirilovsky, D., R. Kana, et al. (2013). Mechanisms modulating energy arriving at reaction centers in cyanobacteria. Non-Photochemical Quenching and Thermal Energy Dissipation In Plants, Algae and Cyanobacteria. B. Demmig-Adams, W. Adams, G. Garab and E. Govindjee, Springer Netherlands, Dordrecht.

Kitajima, M. and W. L. Butler (1975). "Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone." Biochim Biophys Acta **376**(1): 105-115.

Koblizek, M., D. Kaftan, et al. (2001). "On the relationship between the non-photochemical quenching of the chlorophyll fluorescence and the Photosystem II light harvesting efficiency. A repetitive flash fluorescence induction study." Photosynthesis Research **68**(2): 141-152.

Kok, B. (1956). "On the inhibition of photosynthesis by intense light." Biochimica Et Biophysica Acta **21**(2): 234-244.

Kok, B., B. Forbush, et al. (1970). "Cooperation of charges in photosynthetic O2 evolution-I. A linear four step mechanism." Photochem Photobiol **11**(6): 457-475.

Kolber, Z. S., P. G. Falkowski, et al. (1992). Fast repetitive rate (FRR) fluorometer for making insitu measurements of primary productivity. New York, I E E E.

Kolber, Z. S., O. Prasil, et al. (1998). "Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols." Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics **1367**(1-3): 88-106.

Krause, G. H. and E. Weis (1991). "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis - the basics." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **42**: 313-349.

Kromdijk, J., K. Glowacka, et al. (2016). "Improving photosynthesis and crop productivity by accelerating recovery from photoprotection." Science **354**(6314): 857-861.

Krupnik, T., E. Kotabova, et al. (2013). "A Reaction Center-dependent Photoprotection Mechanism in a Highly Robust Photosystem II from an Extremophilic Red Alga, Cyanidioschyzon merolae." Journal of Biological Chemistry **288**(32): 23529-23542.

Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. University of Maryland School of Medicine Baltimore, Maryland, USA, Springer Science+Business Media, LLC.

Malkin, S., P. A. Armond, et al. (1981). "Photosystem II photosynthetic unit sizes from fluorescence induction in leaves: correlation to photosynthetic capacity." Plant Physiology **67**(3): 570-579.

Mamedov, M., Govindjee, et al. (2015). "Primary electron transfer processes in photosynthetic reaction centers from oxygenic organisms." Photosynthesis Research **125**(1-2): 51-63.

Melis, A., C. W. Mullineaux, et al. (1989). "Acclimation of the photosynthetic apparatus to photosystem-I or photosystem-II light - evidence from quantum yield measurements and fluorescence spectroscopy of cyanobacterial cells." Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences **44**(1-2): 109-118.

Moore, L. R. and S. W. Chisholm (1999). "Photophysiology of the marine cyanobacterium Prochlorococcus: Ecotypic differences among cultured isolates." Limnology and Oceanography **44**(3): 628-638.

Muller, P., X. P. Li, et al. (2001). "Non-photochemical quenching. A response to excess light energy." Plant Physiology **125**(4): 1558-1566.

Mullineaux, C. W. and J. F. Allen (1990). "State-1-state-2 transitions in the cyanobacterium Synechococcus 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between photosystem-I and photosystem-II." Photosynthesis Research **23**(3): 297-311.

Nelson, N. and C. F. Yocum (2006). "Structure and function of photosystems I and II." Annual Review of Plant Biology **57**: 521-565.

Neubauer, C. S., U (1987). "The Polyphasic Rise of Chlorophyll Fluorescence upon Onset of Strong Continuous Illumination: I. Saturation Characteristics and Partial Control by the Photosystem II Acceptor Side." Z. Naturforsch. 42c: 1246-1254.

Nishimura, M., D. Graham, et al. (1976). "Isolation of Intact Chloroplasts and Other Cell Organelles from Spinach Leaf Protoplasts." Plant Physiology **58**(3): 309-314.

Obornik, M., D. Modry, et al. (2012). "Morphology, Ultrastructure and Life Cycle of Vitrella brassicaformis n. sp., n. gen., a Novel Chromerid from the Great Barrier Reef." Protist **163**(2): 306-323.

Ofallon, J. V. and R. W. Wright (1991). "Methyl viologen as a preferred electron-acceptor in metabolic experiments." Analytical Biochemistry **198**(1): 179-183.

Owens, T. G. (1996). Photosynthesis and the Environment. Springer Netherlands.

Pfister, K., K. E. Steinback, et al. (1981). "Photoaffinity-labeling of an herbicide receptor protein in chloroplast membranes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences **78**(2): 981-985.

Porra, R. J., W. A. Thompson, et al. (1989). "Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents - verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy." Biochimica Et Biophysica Acta **975**(3): 384-394.

Procházka, S., I. Macháčková, et al. (1998). Fyziologie rostlin. Praha, Academia.

Prokhorenko, V. I. and A. R. Holzwarth (2000). "Primary processes and structure of the photosystem II reaction center: A photon echo study." Journal of Physical Chemistry B **104**(48): 11563-11578.

Purves, W. K. O., Gordon H.; Heller, H. C Raig (1994). Life: The Science of Biology, Sinauer Associates Inc

Redinbo, M. R., T. O. Yeates, et al. (1994). "Plastocyanin - structural and functional-analysis." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **26**(1): 49-66.

Rippka, R., T. Coursin, et al. (2000). "Prochlorococcus marinus Chisholm et al. 1992 subsp pastoris subsp nov strain PCC 9511, the first axenic chlorophyll a(2)/b(2)-containing cyanobacterium (Oxyphotobacteria)." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**: 1833-1847.

Rohacek, K. (2002). "Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships." Photosynthetica **40**(1): 13-29.

Ruban, A. V. and P. Horton (1994). "Spectroscopy of nonphotochemical and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in leaves - evidence for a role of the light-harvesting complex of photosystem-ii in the regulation of energy-dissipation." Photosynthesis Research **40**(2): 181-190.

Ruben, S., M. Randall, et al. (1941). "Heavy Oxygen (O18) as a Tracer in the Study of Photosynthesis." Journal of the American Chemical Society **63**(3): 877-879.

Saldrnoto, K. K., N. Kornienko, et al. (2017). "Cyborgian Material Design for Solar Fuel Production: The Emerging Photosynthetic Biohybrid Systems." Accounts of Chemical Research **50**(3): 476-481.

Selvas, V. M. V. (2010). "Spinach plant." Retrieved 4. 12., 2017, from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Espinac_5nov.JPG.

Shelaev, I. V., F. E. Gostev, et al. (2008). "Primary light-energy conversion in tetrameric chlorophyll structure of photosystem II and bacterial reaction centers: II. Femto- and picosecond charge separation in PSII D1/D2/Cyt b559 complex." Photosynthesis Research **98**(1-3): 95-103.

Shevela, D., J. J. Eaton-Rye, et al. (2012). "Photosystem II and the unique role of bicarbonate: A historical perspective." Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics **1817**(8): 1134-1151.

Schreiber, U. (1986). "Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer." Photosynth Res **9**(1-2): 261-272.

Schreiber, U., C. Klughammer, et al. (2012). "Assessment of wavelength-dependent parameters of photosynthetic electron transport with a new type of multi-color PAM chlorophyll fluorometer." Photosynthesis Research **113**(1-3): 127-144.

Suda, S., M. Atsumi, et al. (2002). "Taxonomic characterization of a marine Nannochloropsis species, N-oceanica sp nov (Eustigmatophyceae)." Phycologia **41**(3): 273-279.

SuperManu. (2017). "Scheme of a chloroplast." Retrieved 6. 12., 2017, from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chloroplast.svg.

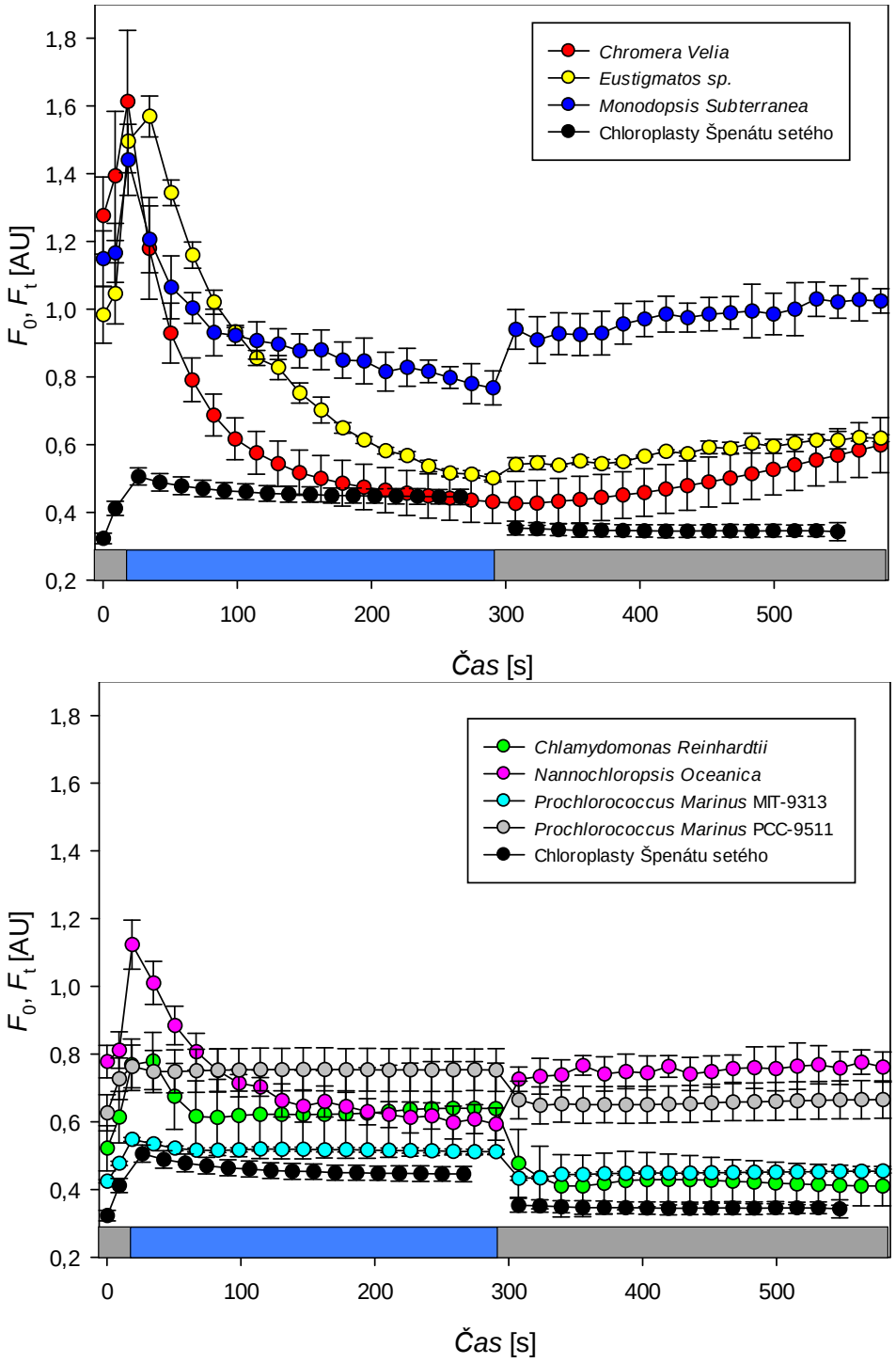
van Niel, C. B., S. Ruben, et al. (1942). "Radioactive carbon as an indicator of carbon dioxide utilization VIII The role of carbon dioxide in cellular metabolism." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **28**: 8-15.

Wilson, A., G. Ajlani, et al. (2006). "A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria." Plant Cell **18**(4): 992-1007.

Wilson, A., C. Punginelli, et al. (2008). "A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(33): 12075-12080.

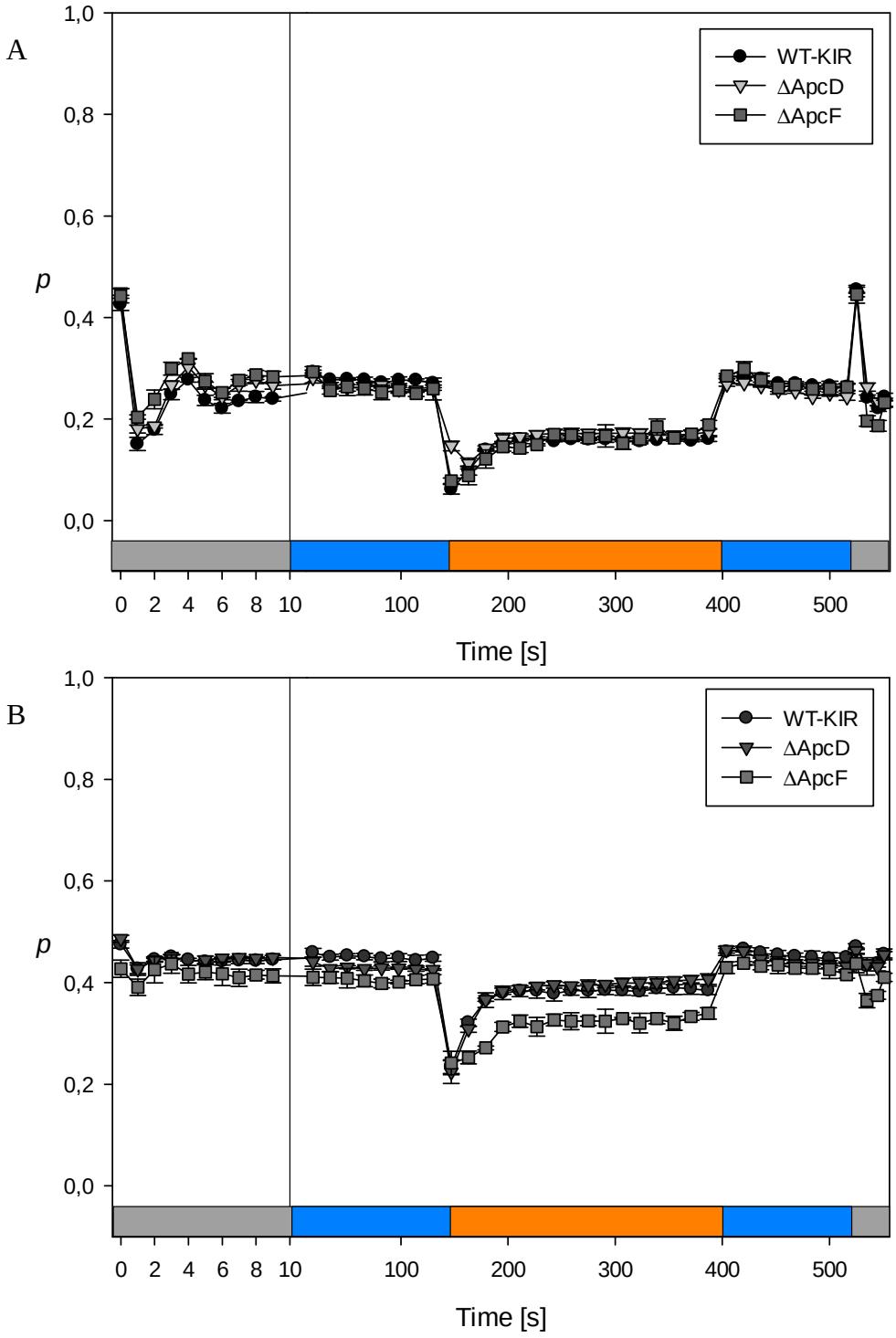
Yikrazuul. (2009). "The violaxanthin cycle or xanthophyll cycle." Retrieved 9.12., 2017, from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Violaxanthin_cycle.png.

# 12 Přílohy




**Příloha 1:** Porovnání $F_0^{ST}$ respektive $F_t^{ST}$ u jednotlivých druhů vystavených aktinickému světlu vyvolávající proces NPQ. U vzorku *Chromera Velia* jsem vyvolal proces NPQ pomocí oranžového aktinického světla o intenzitě 500 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ s použitím PFA o délce 200 ms. U *Eustigmatos sp.*, *Monodopsis Subterranea*, *Nannochloropsis Oceanica*, *Prochlorococcus Marinus* MIT−9313 a *Prochlorococcus Marinus* PCC−9511 jsem vyvolal proces NPQ pomocí modrého aktinického světla o intenzitě 200 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ s použitím PFA o délce 500 ms. U *Chlamydomonas Reinhardtii* a chloroplastů Špenátu setého jsem vyvolal proces NPQ pomocí modrého aktinického světla o intenzitě

600 µmol kvant · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ s použitím PFA o délce 200 ms. Hodnoty $F_0^{ST}$ respektive $F_t^{ST}$ u relaxace chloroplastů Špenátu setého jsem posunul o 24 s, aby odpovídaly ostatním měřením.




**Příloha 2:** Kinetika změn *p* měřením fluorescence chlorofylu *a* excitací reakčních center modrými (A) a oranžovými (B) jedno−obrátkovými záblesky.