

# **Středoškolská odborná činnost**

**Obor SOČ: 4. Biologie**

## **Sledování fotoochranných mechanismů vybraných jednobuněčných řas pomocí fluorescence chlorofylu**

**Autor: Karel Bouda**

**Škola: Gymnázium  
Jírovцова 8, České Budějovice  
Jihočeský kraj**

**Vedoucí: RNDr. Radek Litvín, Ph.D.**  
Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita  
Branišovská 1760, České Budějovice  
a  
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.  
Branišovská 31, České Budějovice

**České Budějovice 2015**

## **Prohlášení**

*Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Radka Litvína, Ph.D. a veškeré použité publikace a články jsem uvedl v seznamu literatury, na konci práce.*

*Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.*

*Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.*

V..... dne ..... podpis:.....

## **Poděkování**

*Rád bych zde poděkoval zejména Radku Litvínovi, jenž mě vedl při psaní této práce. Poděkování mu patří za jeho ochotu a trpělivost při vysvětlování záludných zákoutí fotosyntetického procesu, zodpovídání mých všetečných dotazů a konzultace práce celkově. Mimo to mu také patří dík za to, že pod vlivem jeho prezentaci daného tématu, která mne zaujala, jsem se rozhodl pro napsání této práce.*

*Dále bych chtěl poděkovat Biologickému centru Akademii věd ČR, konkrétněji Ústavu molekulární biologie za poskytnutí prostor, části vybavení a biologického materiálu pro mé experimenty.*

*A děkuji také Přírodovědecké fakultě Jihočeské Univerzity za zapůjčení vybraného experimentálního vybavení, jež jsem při svých měřeních využíval.*

## Abstrakt

Má práce je zaměřena na sledování fotoochranných mechanismů u čtyř různých druhů autotrofů. Hlavním experimentálním druhem byla řasa *Nannochloropsis oceanica*, dále jsem pracoval také s druhy *Phaeodactylum tricorneratum*, *Chromera velia* a *Emiliana huxleyi*. U vzorků buněk jsem měřil výtěžek fluorescence, z něhož jsem později počítal variabilní fluorescenci a parametr NPQ (nefotochemické zhášení). V protikladu k některým publikovaným výsledkům jsem zaznamenal velkou schopnost nefotochemického zhášení u buněk *N. oceanica*. Buňky kultivované na vysoké intenzitě světla vykazují rychlejší aktivaci NPQ, avšak celkové dosažené NPQ po 5 minutách osvětlení bylo stejné jako u buněk pěstovaných na slabém světle. Ukázalo se, že hlavním mechanismem NPQ buněk *N. oceanica* je rychlé „energetické“ zhášení. U druhu *P. tricorneratum* a *E. huxleyi* výsledky měření potvrdily domnětku, že hlavním fotoochranným mechanismem těchto buněk je xantofylový cyklus. Hodnoty NPQ zjištěné pro *C. velia* byly nižší než publikované, pravděpodobně vlivem příliš nízké teploty při kultivaci kultury tropických řas.

**Klíčová slova:** fluorescence chlorofylu; *Nannochloropsis oceanica*; nefotochemické zhášení

# Obsah

1	Teoretický úvod.....	6
1.1	Světlo.....	6
1.1.1	Vlnový charakter světla.....	7
1.1.2	Částicový charakter světla.....	9
1.1.3	Fotosynteticky aktivní záření.....	10
1.2	Sktruktura chloroplastu.....	10
1.3	Fotosyntéza.....	11
1.3.1	Uspořádání proteinů v thylakoidní membráně a její struktura.....	12
1.3.2	Fotosystém II a Cytochrom b <sub>6</sub> /f.....	13
1.3.3	ATP-syntáza.....	14
1.3.4	Fotosystém I a NADP <sup>+</sup> reduktáza.....	15
1.4	Fotoochranné mechanismy v chloroplastu.....	15
1.4.1	Xantofylový cyklus.....	16
1.4.2	Fluorescence chlorofylu.....	17
1.4.3	Nefotochemické zhášení (NPQ).....	18
2	Použité metody měření a měřicí aparatura.....	20
2.1	Metoda saturačních pulzů.....	20
2.2	Hodnota NPQ.....	21
2.3	Laboratorní aparatura.....	22
2.4	Protokol měření.....	25
3	Biologický materiál.....	26
3.1	<i>Nannochloropsis oceanica</i> .....	26
3.2	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	27
3.3	<i>Chromera velia</i> .....	27
3.4	<i>Emiliana huxleyi</i> .....	28
4	Výsledky měření.....	29
4.1	Srovnání NPQ křivek různých druhů.....	29
4.2	Porovnání NPQ křivek pro buňky pěstované na nízké a vysoké intenzitě světla.....	31
4.2.1	Samostatné měření hodnot NPQ při spuštění aktinického světla a při jeho vypnutí.....	32
4.2.2	Kontinuální měření hodnot NPQ.....	34
4.3	Vztah vývoje výtěžku fluorescence a NPQ.....	37
4.4	Vliv slabého světla na relaxaci zhášení buněk <i>N. oceanica</i> .....	40
4.5	Měření s přidaným inhibitorem DCMU.....	42
	Závěr.....	45
	Příloha.....	46
	Seznam použitých zkratk.....	47
	Seznam literatury.....	48

# 1 Teoretický úvod

Smysl mé práce spočívá ve výzkumu fotoochranných mechanismů uvnitř chloroplastů vybraných autotrofních mikroorganismů pouze s použitím světla, respektive jevu zvaného fluorescence chlorofylu. Díky tomu, že se jedná o neinvazivní metodu, lze měřené buňky vystavovat různým (především světelným) podmínkám a sledovat jejich reakci spojitě v průběhu času. Tento přístup má řadu výhod. Za prvé lze na jedné sadě buněk provést dlouhé kontinuální měření, které nám poskytne představu o průběhu dějů v buňkách v čase, což například pigmentová analýza nedovoluje. Další výhodou použití světla jako nástroje výzkumu je možnost zkoumat do detailu stav fotosyntetického aparátu v konkrétním, velice přesně určeném čase. Také se jedná o principiálně jednoduchou metodu, což eliminuje chybovost měření vlivem nesprávného nastavení přístrojů apod.

Než přejdu k samotné práci, dovolím si ještě pár slov k její struktuře. Celá první kapitola s názvem „Teoretický úvod“ je věnována popisu všech faktů, se kterými jsem ve své práci pracoval - od „rozporuplného“ vnímání pojmu světlo, přes stavbu chloroplastů, až k mechanismům, chránícím autotrofy před silným světlem. Pro úspěšné provedení mé práce ovšem nestačí pouze teoretické informace, ale je nutné se seznámit i s praktickou stránkou věci. Od toho je zde kapitola 2, pojmenovaná „Použité metody měření a měřicí aparatura“. Jak jsem uvedl výše, má práce se zabývá zkoumáním živých buněk autotrofů a je tedy nutné se s jednotlivými použitými druhy alespoň krátce seznámit - kapitola 3. Biologický materiál. Kapitolou 3 zakončím teoretickou část a přesunu se do experimentální části, do kapitoly 4 „Výsledky měření“. Na závěr práce samozřejmě nebude chybět shrnutí zjištěných faktů (kapitola Závěr), poté už jen výčet mnou používaných zkratk, několik přiložených fotografií laboratorního vybavení a seznam literatury.

## 1.1 Světlo

Člověk získává zhruba 80% veškerých informací o svém okolí prostřednictvím zraku. Není tedy divu, že již od starověku se lidé pokoušeli pochopit podstatu světla a jeho šíření prostorem. V historii se pochopitelně objevila řada teorií vysvětlujících, co je světlo. Obecně by se daly rozdělit do dvou proudů - částicové a vlnové. Například proslulý anglický fyzik sir Isaac Newton (1643-1727), jenž se inspiroval prací francouzského kněze a filozofa Pierra Gassendiho (1592-1655), si světlo sice představoval jako vlnění, ale mechanické tvořené částicemi. Dnes víme, že světlo se za jistých podmínek opravdu chová jako proud částic - tzv. fotonů. Newton měl tedy v jistém aspektu pravdu. Fotony se ale řadí mezi bosony a tudíž mají s Newtonovým pojetím částic světla, které by se daly z dnešního hlediska popsat jako fermiony, jen pramálo společného (Bosony jsou částice zprostředkovávající interakce a mají nulovou klidovou hmotnost. Fermiony jsou částice, které mají nenulovou klidovou hmotnost a jde tedy o částice hmoty). Nicméně tato tzv. korpuskulární teorie se jako většinový názor vědecké obce udržela až do počátku experimentů s interferencí světla, tedy do začátku 19. století. Přibližně ve stejnou dobu, kdy Newton prosazoval své myšlenky, se objevily i snahy o vysvětlení světla jako vlnění. Prvním zastáncem vlnové podstaty světla byl angličan Robert Hooke (1635-1703). Ten přirovnával chování světla k vlnám na vodě, ale jeho myšlenky se příliš neuchytily. Tím, kdo opravdu položil základ vlnové teorie světla, byl vědec francouzského původu Christian Huygens (1629-1695). V roce 1690 publikoval svou práci *Traité de la lumière (Pojednání o světle)*, v níž uveřejnil svou tezi, že světlo je druhem vlnění. Huygensova představa světla jako vlnění však nebyla po dlouhou dobu přijímána. Změna v názorech vědecké obce nastala až v roce 1800, kdy Angličan Thomas Young (1773-1829) a Francouz Augustin-Jean Fresnel (1788-1827) provedli se světlem pokusy, které bylo možné vysvětlit s pomocí vlnové, nikoliv však

korpuskulární teorie.

Opravdový přelom v pohledu na světlo však přišel až v roce 1847, kdy Angličan Michael Faraday (1791-1867) vyslovil myšlenku, že světlo je vysokofrekvenční elektromagnetická vibrace. Další díl do skládky o původu světla přidal James Clerk Maxwell (1831-1879), který v roce 1873 vydal spis *A Treatise on Electricity and Magnetism (Pojednání o elektřině a magnetismu)*. V tomto díle uveřejnil rovnice dokazující provázanost elektrického pole s magnetickým a vytvořil představu elektromagnetického pole. Nedlouho po zveřejnění svých rovnic se dočkal i jejich experimentálního ověření fyzikem německého původu Heinrichem Hertzem (1857-1894). Nyní tedy chyběla k pochopení světla jen jediná věc - nějakým způsobem provázat vlnovou a částicovou podstatu světla. Oním pojítkem se stala kvantová teorie tvořená počátkem 20. století. Klíčový byl poznatek známého německého fyzika Maxe Karla Ernsta Ludwiga Plancka (1858-1947). Ten si povšiml, že energie není vyzařována a pohlcována v libovolném množství, ale pouze v přesně daných kvantech, přičemž energii jednoho kvanta světla o určité vlnové délce lze spočítat vztahem:

$$1.1(1) \quad E = h f$$

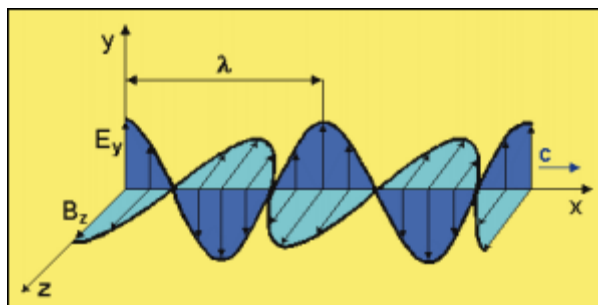
Kde  $f$  je frekvence světla (viz 1.1.1 Vlnový charakter světla) a  $h$  je *Planckova konstanta* ( $h = 6,6260693 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$ ) [RNDr. Jiří Mikulčák, *Csc. a kolektiv; Tabulky & vzorce; Prometheus; Praha; 2012*]. Na Planckovu kvantovou hypotézu navazoval asi nejznámější fyzik všech dob - německý rodák Albert Einstein. I on se zabýval nově vznikající kvantovou teorií. S pomocí Plackovy myšlenky kvant se mu podařilo popsat princip tzv. *fotoelektrického jevu*, za jehož vysvětlení později obdržel i Nobelovu cenu. Při fotoelektrickém jevu dochází vlivem světelného záření k vyražení elektronů z povrchu kovové desky. Elektron je ovšem na svém místě poután elektromagnetickou silou a k jeho vyražení je tedy potřeba určité množství energie, závisující na konkrétním kovu. V době kdy Einstein začal se svým výzkumem fotoelektrického jevu, byla obecně přijímána spíše myšlenka vlnové, nikoliv částicové podstaty světla. Podle této teze by měl fotoelektrický jev nastat při ozáření kovu světlem s libovolnou frekvencí, či chcete-li vlnovou délkou (vzájemný vztah těchto veličin je popsán dále vztahem 1.1.1(1) ). Energetické rozdíly mezi zářeními s rozdílnou frekvencí lze snadno vykompenzovat vyšší intenzitou záření. Četné pokusy ovšem prokázaly, že při nižších frekvencích již jednoduše nedojde k vyražení elektronu, nezávisle na intenzitě použitého světla. Einstein zjistil, že pro každý kov existuje jistá hraniční frekvence ( $f_0$ ) a pokud má světlo nižší frekvenci, již není schopno vyrazit elektron. Jediné možné vysvětlení tohoto jevu byla existence částic světla. Princip je zcela jednoduchý. Všechny částice mají stále stejnou energii nezávisle na intenzitě světla, zvýšením intenzity dosáhneme pouze zvýšení počtu dopadajících částic, což nijak neovlivní schopnost jednoho fotonu vyrazit elektron. Dále Einstein přispěl ještě jednou „maličkovitostí“, pojmenováním částice světla jako fotonu. [Halliday, 2013; Horák a Krupka, 1981]

Díky kvantové teorii, na jejíž jednotlivých částech se podílela celá řada významných fyziků své doby, tedy vzniklo dnešní pojetí světla s jeho tzv. vlnově-částicovou dualitou. Tato vlastnost vyjadřuje schopnost světla projevit se buď jako vlna, nebo jako proud fotonů. Kterou z těchto dvou vlastností budeme nakonec pozorovat, závisí zejména na námi právě měřené veličině světla.

### 1.1.1 Vlnový charakter světla

Jak je uvedeno výše, zakladatelem moderního vlnového pojetí světla byl Christian Huygens. Průlomovost jeho myšlenek spočívala zejména ve faktu, že se dokázal odpoutat od Newtonova mechanického pojetí částic světla a představoval si světlo jako vlnění šířící se nehmotným éterem. Éter byl poté dlouhou dobu uznávanou substancí, která měla naplňovat veškerý prostor (včetně vakua) a jež svou přítomností měla umožňovat šíření světla. Pozdější pokusy však existenci éteru

vyvrátily. Přesto by se dalo říci, že se Huygens již značně přiblížil podstatě světla jako elektromagnetického záření a svým éterem vlastně „nahrazoval“ elektromagnetické pole, i když samozřejmě mechanismus vzniku a šíření světla v elektromagnetickém poli je odlišný od Huygensovy představy světla v éteru. V principu jde o to, že elektrické a magnetické pole jsou spolu těsně provázány. Pokud dojde k poklesu intenzity elektrického pole, projeví se tato skutečnost nárůstem hodnot v magnetickém poli a opačně, přičemž vektory těchto dvou polí jsou navzájem kolmé (viz obrázek 1.1(1)).



Obrázek 1.1(1): Znárodnění elektromagnetické vlny. Vertikálně jsou znázorněny výkyvy elektrického pole a horizontálně pole magnetického. Vlna se šíří prostorem ve směru osy  $x$ .

Zdroj: [http://www.odbornecasopisy.cz/index.php?id\\_document=22854](http://www.odbornecasopisy.cz/index.php?id_document=22854)

Christian Huygens však nebyl pouze autorem vlnové teorie světla. Byl také autorem Huygensova principu, který popisuje vlastnosti všech typů vlnění obecně a platí tedy i na světlo. Tento princip ale v době svého vzniku nebyl zformulován zcela přesně, a proto jej později mírně přeformuloval francouzský vědec Augustin-Jean Fresnel (1788-1827). Hlavní myšlenkou nyní již ne Huygensova, ale Huygensova-Fresnelova principu je teze, že jakýkoli bod vlnoplochy, do něhož dospělo v určitém okamžiku vlnění, může být novým zdrojem vlnění. Tento princip tedy vysvětlil lom světla, jeho odraz a také difrakci na štěrbinách. Navíc umožňuje předpovědět plochu a tvar vlnoploch v libovolném čase. Díky Fresnelovu zpřesnění byl Huygensův, chcete-li Huygensův-Fresnelův princip schopen přesně popsat a předpovědět chování vlnění, čímž položil na lopatky dříve uznávanou korpuskulární teorii, která měla s popisem odrazu a zejména lomu světla značné problémy.

Základní veličinou charakterizující vlnění, světlo nevyjímaje, je vlnová délka ( $\lambda$ ). Jde o vzdálenost mezi dvěma nejbližšími údolími/ hřebeny vln. Základní jednotkou je samozřejmě metr ( $m$ ), ale z praktických důvodů se v souvislosti s viditelným světlem užívá jednotek nanometrů ( $1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$ ). Vlnová délka má také přímou spojitost s energií záření. Platí zde nepřímá úměrnost, tedy čím je vlnová délka delší, tím je energie záření vyšší a naopak. Dále se pro popis vlnového charakteru světla užívá frekvence ( $f$ ), či periody ( $T$ ). Frekvence obecně představuje počet cyklů, za jednotku času, tedy za sekundu ( $s$ ). V konkrétním případě světla jde tedy o počet vlnových délek, které projdou zvoleným bodem prostoru za jednotku času. Jednotkou frekvence je hertz ( $\text{Hz}$ ). Druhá jmenovaná veličina, tedy perioda, udává obecně čas potřebný k uběhnutí jednoho cyklu. Pro světlo jde tedy o čas potřebný k tomu, aby vlnění urazilo vzdálenost jedné vlnové délky. Základní jednotkou periody je stejně jako u frekvence sekunda ( $s$ ). Z výše uvedených definic tedy vyplývá, že perioda, frekvence a vlnová délka jsou spolu navzájem provázány. Toto provázání lze vyjádřit za pomoci rychlosti světla ( $c$ ) vztahy:

$$1.1.1(1) \quad \lambda = \frac{c}{f} \quad a \quad f = \frac{1}{T} \quad a \quad \lambda = cT$$



### 1.1.2 Částicový charakter světla

Pro popis světla jako proudu částic je nejdůležitějším pojmem foton, tedy částice světla. Nejde o částici, která se přímo podílí na stavbě prostoru, ale pouze o způsob přenosu energie v prostoru. Foton patří mezi tzv. polní částice (zprostředkovávají interakce mezi ostatními druhy částic). Jak je uvedeno výše, řadí se foton mezi bosony. Bosony jsou částice, které mají nulovou klidovou hmotnost. To v praxi znamená, že pokud je foton v klidu, nemá žádnou měřitelnou hmotnost a jeho energie má tedy dle Einsteinovy rovnice, kde figuruje energie ( $E$ ), hmotnost ( $m$ ) a rychlost světla ( $c$ ), nulovou hodnotu.

$$1.1.2(1) \quad E = mc^2$$

Pokud ovšem foton letí prostorem, získá kinetickou energii. Z uvedené rovnice lze tedy vypočítat jeho momentální odpovídající hmotnost a díky ní posléze i hybnost ( $p$ ) fotonu. Jednotkou hybnosti je  $kg \cdot m \cdot s^{-1}$ . Vzorec pro výpočet hybnosti v klasické fyzice vypadá takto:

$$1.1.2(2) \quad p = mv$$

Kde  $m$  je hmotnost tělesa a  $v$  jeho rychlost. Ač se může na první pohled zdát zbytečné a bezúčelné počítat hybnost fotonu, opak je pravdou. Tato veličina je naprosto klíčovou při popisu působení fotonu na částice hmoty. Pokud dojde ke srážce fotonu s částicí s nenulovou klidovou hmotností (tedy s jiným fermionem) předává foton této částici právě svou hybnost, či její určitou část. Tímto mechanismem je tedy světlo, či elektromagnetické záření obecně, schopno zprostředkovávat interakce mezi částicemi hmoty.

Částicové podstaty světla se využívá zejména při výpočtech energie záření. V kapitole 1.1 jsem již uvedl jeden možný výpočet energie fotonu - vzorec 1.1(1). Tento vztah je samozřejmě plně platný, ale v praxi se používá jiný jeho obrat. Důvodem nepoužívání tohoto tvaru je zejména přítomnost frekvence ( $f$ ) ve vzorci. Změřit počet vlnových délek, které projdou bodem za jednu sekundu totiž rozhodně není triviální úkol. Proto se využívá vztahu mezi vlnovou délkou, frekvencí a rychlostí světla (viz 1.1.1(1)). Po dosazení za frekvenci do vztahu 1.1(1) dostaneme energii jednoho fotonu ( $E_p$ ).

$$1.1.2(3) \quad E_p = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

Ovšem energie jednoho fotonu je číslo velice malé, což znesnadňuje následné výpočty. Z praktických důvodů tedy byla zavedena jednotka einstein ( $E$ ), která ovšem nepatří mezi základní jednotky soustavy SI. Jeden einstein představuje jeden mol fotonů, přičemž mol je základní jednotka soustavy SI a představuje množství atomů ve 12g uhlíku  $^{12}_6C$ , které je vyjádřeno Avogadrovou konstantou ( $N_A = 6,0221415 \cdot 10^{23}$ ). Ve své práci ale využívám ještě odvozenější jednotku, a sice mikroeinstejn na metr čtvereční za sekundu ( $\mu E \cdot m^2 \cdot s^{-1}$ ). Tato jednotka vyjadřuje počet fotonů, které dopadnou na plochu jednoho metru čtverečního za sekundu. [Horák a Krupka, 1981]

### 1.1.3 Fotosynteticky aktivní záření

Šířka pásma dnes známého elektromagnetického záření je obrovská. Největší energii a tedy nejkratšími vlnovými délkami se může pochlubit gama záření. Vzdálenost mezi dvěma sousedními údolími vlny se zde pohybuje pouze v řádech pikometrů ( $1\text{pm} = 10^{-12}\text{m}$ ). Na druhé straně pomyslného žebříčku si hoví tzv. *ELF* (*Extremely low frequency*) jejichž vlnová délka dosahuje hodnot až tisíc kilometrů (tj.  $10^6\text{m}$ ). Z tohoto obrovského rozsahu je pro lidské oko viditelný jen zlomek vlnových délek, od 390nm zhruba do 790nm. Pokud toto rozmezí ještě o něco zúžíme, dostaneme fotosynteticky aktivní záření - tzv. *FAR*. Je nutno podotknout, že některé druhy bakterií jsou schopny díky svému bakteriochlorofylu využívat elektromagnetické záření až do vlnových délek okolo 1040nm. Ale fotosynteticky aktivní organismy obsahující *chlorofyl a*, či *chlorofyl b* jsou schopny absorbovat záření v rozsahu 400-700nm. Důležité ale je si uvědomit, že každé barvivo, chlorofyl nevyjímaje, má někde své absorpční maximum a nevyužívá tedy všechny vlnové délky, které je schopno pohltnout, stejnou měrou. [Jelínek et al., 2014]

## 1.2 Struktura chloroplastu

Atmosférický kyslík, koloběh uhlíku, ozónová vrstva,... přítomnost a funkčnost těchto tří entit velice výrazně ovlivnila vývoj života na Zemi a umožnila jeho rozvinutí do podoby, jak ho známe dnes. To ovšem není jediné vodítko, které tyto tři věci spojuje. Všechny fungují, či byly vytvořeny díky schopnosti zelených rostlin využít energii slunečního záření k zabudovávání atomů uhlíku do organických sloučenin - fotosyntéze. Přesněji řečeno tedy fotosyntéze využívající jako zdroj uhlíku  $\text{CO}_2$  a jako zdroje protonů fotolýzu vody, k jejímuž vzniku došlo zhruba před 3,5 miliardami let. Existují i druhy bakterií využívající jako zdroj elektronů sirovočís ( $\text{H}_2\text{S}$ ). V této práci budu však pojmem fotosyntéza rozumět fotosyntetickou asimilaci probíhající v zelených rostlinách, při níž je zdrojem elektronů štěpení molekul vody. Dříve, než se však budu věnovat podrobnému popisu fotosyntézy, uvedu zde něco málo o chloroplastu, tedy struktuře ve které fotosyntéza probíhá. [Jelínek, 2014]

Chloroplast obsahuje různé typy zelených barviv - chlorofylů, díky nimž disponuje schopností fotosyntézy. Je to nejmenší struktura, ve které po separaci od zbytku buňky stále ještě probíhá fotosyntéza. Za zmínku jistě stojí i původ chloroplastu, jehož vliv se silně projevuje v jeho stavbě. Společně s mitochondrií jde o buněčnou organelu vzniklou endosymbiózou. To znamená, že v minulosti pohltil složitější eukaryot nějakou menší fotosyntetizující prokaryotní buňku (sinici). Za obvyklých okolností by byla pohlcená buňka strávena, ale z nějakého důvodu nebyla rozložena a „hostitel“ začal využívat její schopnosti fotosyntézy. Postupem času se pohlcená buňka redukovala, až vznikl dnešní chloroplast. Tento způsob vzniku zapříčinil existenci dvou obalových membrán chloroplast (toto tvrzení platí pro primární endosymbiózu). Jedna z membrán je pozůstatkem původní obalové membrány zelené buňky a druhou vytvořil eukaryot, který ji pohltil. Takto tedy vypadá chloroplast u rostlin, ale buňky, se kterými jsem pracoval ve své práci nemají za sebou primární, nýbrž sekundární, či dokonce terciární endosymbiózu. To znamená, že eukaryot nepohltil jiného jednoduchého prokaryota, ale došlo k endosymbióze eukaryota, který předtím již prodělal primární endosymbiózu. Nebo v „extrémním“ případě terciální endosymbiózy je pohlcen dokonce eukaryot, který prošel sekundární endosymbiózou. S každou další uskutečněnou endosymbiózou samozřejmě může růst i počet membrán obalujících chloroplast. Další vlastností chloroplastu, která je způsobena jeho specifickým vznikem je přítomnost jeho vlastní, byť značně redukované molekuly DNA. Pro mé měření ovšem tato vlastnost není přímo nijak určující a proto se jí dále zabývat nebudu.

Uvnitř chloroplastu se nachází několik typů barviv. Pro průběh fotosyntézy je nejdůležitějším barvivem chlorofyl. Rostlinami nejčastěji využívaný je *chlorofyl a* či *chlorofyl b*, dále existují chlorofyly *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub>, *c*<sub>3</sub>, *d*, *f* a některé bakteriální chlorofyly. Klíčová role chlorofylu spočívá v jeho schopnosti převádět energii získanou z fotonů na elektronové přenašeče schopné získaný energetický potenciál dále transportovat k dalšímu využití. Ostatní barviva, jako jsou karotenoidy a xantofyly, plní pouze pomocné funkce. Jejich hlavním úkolem je sběr fotonů, které nebyly zachyceny některým z chlorofylů. Sekundární funkci tvoří ochrana fotosyntetického aparátu před poškozením vlivem nadměrného ozáření, či například volným radikálem kyslíku.

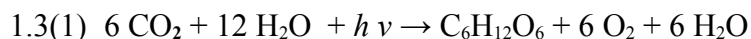
Molekulu chlorofylu tvoří dvě části: porfyrin a fytol. Ústředním atomem molekuly porfyrinu je hořčnatý kationt  $Mg^{2+}$ , který je vázán mezi pyroly. Tato část chlorofylu se vyznačuje hydrofilním charakterem. Ovšem u celé molekuly barviva převažuje lipofilní charakter. Tento rozpor je způsoben přítomností fytolové části chlorofylu, která je velice silně lipofilní a částečně tak překrývá i hydrofilní povahu porfyrinu.

V lumenu chloroplastů, tedy ve vnitřním prostoru ohraničeném membránou chloroplastu, se nachází malé váčky, zvané thylakoidy. Ty bývají často uspořádány nad sebe do tzv. gran, jejichž význam není zatím zcela vysvětlen. I přes to je známo, že rozložení fotosystému I ( *PSI* ) a fotosystému II ( *PSII* ), o kterých budu podrobně hovořit dále v kapitole 1.3, se značně liší mezi thylakoidy vystavenými stromatu (stroma je prostor okolo membránové organely v buňce) a stěsnanými thylakoidy, které svými stěnami přiléhají na sebe a v podstatě tento prostor není součástí okolního lumenu chloroplastu. V thylakoidních membránách vystavených stroma chloroplastu se objevují zejména PSI, kdežto v stěsnaných membránách je mnohem četnější výskyt PSII. Díky přítomnosti fotosystémů v thylakoidní membráně zde tedy probíhá tzv. světelná (fotochemická) fáze fotosyntézy. Naproti tomu zabudovávání uhlíku do organických molekul, tedy tzv. temnostní fáze fotosyntetického cyklu probíhá v lumenu thylakoidů. Toto tvrzení ovšem není pravdivé pro tzv. C<sub>4</sub> rostliny, kde je fotochemická a syntetická část fotosyntézy výrazně prostorově oddělena díky adaptaci na suché a teplé oblasti.

[Procházková, 1998]

### 1.3 Fotosyntéza

V předchozí kapitole jsem nastínil, jak vypadá vnitřní prostor chloroplastu, je tedy čas pustit se do podrobnějšího popisu fotosyntézy. Z hlediska vstupních a výstupních látek jde proces fotosyntézy velice zjednodušeně popsat touto sumární rovnicí (  $h$  je Planckova konstanta a  $v$  rychlost světla, jde o výpočet energie dle vzorce 1.1(1) )

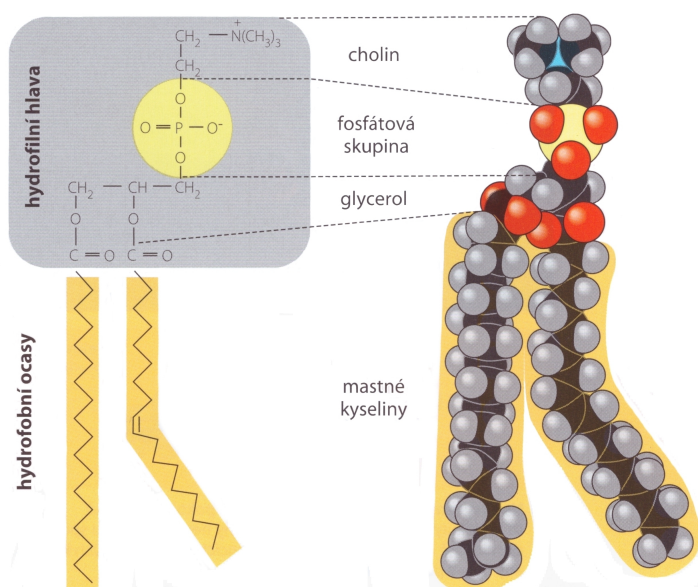


Fotosynteticky aktivní organismus tedy spotřebovává oxid uhličitý, nacházející se v jeho okolí, štěpí vodu a vyrábí nejjednodušší organický cukr - glukózu. Jako vedlejší produkt také vzniká kyslík. Ten je sice nepostradatelný při dýchání organismů, ale v procesu fotosyntézy nehraje žádnou roli. Ba naopak, rostlina se snaží z thylakoidů kyslík co nejrychleji odvádět, protože díky své reaktivitě (především pokud se nachází ve formě radikálu) by mohl poškodit některé z proteinů podílejících se na přenosech energie na membráně thylakoidu. Nejdůležitější funkcí fotosyntézy je tedy tvorba glukózy. Tento jednoduchý cukr může být dále řetězen a upravován ve složitější sacharidy, či využit při buněčném dýchání pro získání energie potřebné k chodu buňky.

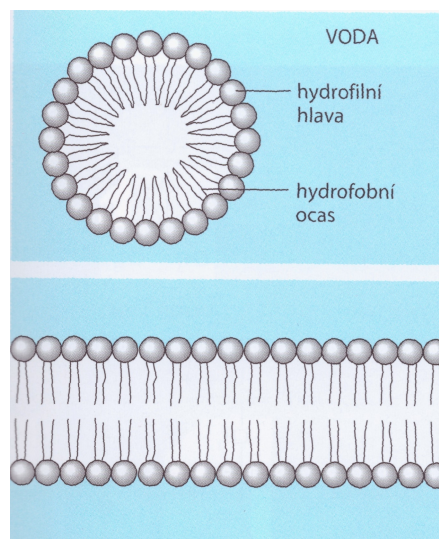
Samotná fotosyntéza se dá rozdělit na dvě části, část fotosyntetickou (světlostní) a syntetickou (temnostní, která nemá přímou závislost na světle). V rámci syntetické části probíhá soubor reakcí nazývaný jako Calvinův cyklus, do něhož vstupují produkty světlostní fáze - NADPH+H<sup>+</sup> a ATP, společně s oxidem uhličitým. Výsledkem řady chemických reakcí probíhajících v jeho rámci je vznik výše zmíněné glukózy (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>). V této práci se však temnostní fázi fotosyntézy zabývat dále nebudu. Jak již napovídá název „temnostní“ fáze (i když není zcela přesný) nezávisí Calvinův cyklus přímo na osvětlení rostliny a nelze ho tedy studovat s pomocí fluorescence. Zaměřil jsem se zejména na světlostní část fotosyntézy, jejíž průběh přímo závisí na ozáření rostliny. Kromě světla je průběh světlostní fáze samozřejmě podmíněn i přítomností fotosyntetického barviva, tedy *chlorofylu a*, respektive čtyř základních proteinových komplexů v membráně: *fotosystému I*, *fotosystému II*, *Cytochromu b<sub>6</sub>/f* a *ATP-syntázy*. [Jelínek, 2014; Procházka, 1998]

### 1.3.1 Uspořádání proteinů v thylakoidní membráně a její struktura

Membrána thylakoidu se svou stavbou vzdáleně podobá cytoplazmatické membráně obalující buňku. Jejím základem je shodně jako u cytoplazmatické membrány dvojvrstva fosfolipidů. Jde o tzv. amfipatické molekuly, tedy obsahující jak hydrofobní, tak hydrofilní část. Hydrofobní část je zde představována dvěma mastnými kyselinami navázanými na hydrofilní fosfátovou hlavu (viz obrázek 1.3(1)). Díky tomu jsou fosfolipidy schopné samoorganizace do micel, nebo jako zde do dvojvrstvy a to vždy hydrofobními konci k sobě (obrázek 1.3(2)). Prostor membrány tedy tvoří hydrofobní mastné kyseliny a její povrch hydrofilní fosfátové hlavičky. Toto rozložení dává buněčné membráně řadu důležitých vlastností. Tou nejzásadnější pro fotosyntézu je její nepropustnost pro všechny větší částice a ionty, která umožňuje vytvoření protonového gradientu, čili zvýšení koncentrace H<sup>+</sup>, na membráně, jenž se posléze využívá ke tvorbě ATP. Další vlastností fosfolipidové membrány, která jistě stojí za zmínku je její konzistence. Nejde totiž o nijak pevnou strukturu, nýbrž o polotekutou substanci, kde jednotlivé komponenty nemají pevně dané místo, ale jsou schopny se laterálně, neboli bočně pohybovat membránou. Tento pohyb si lze představit jako plutí velice viskózní kapalinou. Rychlost pohybu závisí na velikosti pohybující se molekuly. Zatímco fosfolipidy jsou schopny přemístit se laterálním pohybem až o 2 mikrometry za jednu



Obrázek 1.3(1): Struktura fosfolipidu tvořícího biologické membrány [Převzato z Campbell a Reece, 2006, str. 70]



Obrázek 1.3(2): Samoorganizace fosfolipidů ve vodním prostředí hydrofobními ocasy k sobě. Ukázka miceli (nahore) a membrány (dole). [Převzato z Campbell a Reece, 2006, str. 71]

sekundu (což odpovídá délce prokaryotní buňky), proteinové komplexy se pohybují velice pomalu, nebo mohou být dokonce připojeny na cytoskelet a tím svou mobilitu ztrácejí prakticky úplně. [Kodíček a Karpenko, 2000]

Jak bylo zmíněno na konci předchozí kapitoly, v thylakoidní membráně jsou zanořeny čtyři, pro fotosyntetickou část fotosyntézy nezbytné pigment-proteinové komplexy. Jedná se o fotosystém II, k němuž je připojen vodu štěpící komplex, cytochrom  $b_6/f$  podílející se na tvorbě protonového gradientu - fotosystém I zajišťující redukci  $NADPH^+$  a ATP-syntáza zajišťující fosforylací ADP. Mezi těmito komplexy se po povrchu membrány, či přímo v lipidových dvojvrstvách pohybují přenašeče, zajišťující přenos energie z jednoho komplexu na druhý, popřípadě i přenos protonů skrze thylakoidní membránu. [Jelínek et al., 2014]

### 1.3.2 Fotosystém II a Cytochrom $b_6/f$

Fotosystém II ( *PSII* ) společně s fotosystémem I obsahuje jako jediný komplex v thylakoidní membráně reakční centrum schopné převést energii získanou z fotonů na elektrony. Je tedy jedním ze dvou zdrojů energie ve fotosyntéze. Jeho reakční centrum se označuje *P680*, podle vlnové délky ve které má PSII své absorpční maximum v červené oblasti viditelného záření - tedy 680 nanometrů. K reakčnímu centru jsou připojeny světlosběrné komplexy ( LHCII, Light Harvesting Complex II ) tvořené molekulami chlorofylu vázanými na proteiny, jejichž úkolem je zachycení energie světelného záření a předání excitační energie do reakčního centra, jež jí převede na elektron. Dále je na reakční centrum napojen systém karotenoidů, který má pomocnou funkci při transferu energie. Anténní systém jednoho fotosystému obsahuje až 300 molekul chlorofylu, který je rozprostřen do velké plochy tak, aby mohl zachytávat co nejvíce fotonů. Díky světlosběrnému komplexu je PSII schopen excitovat velké množství elektronů.

Vysoký počet excitovaných elektronů je důležitý pro vodu štěpící komplex, který je k PSII připojen. Ten zachytí jednu molekulu vody z lumenu thylakoidu a za účasti dvou excitovaných elektronů, dodaných z reakčního centra fotosystému II, ji hydrolyzuje na kyslík, dva kationty vodíku (  $H^+$  ), čili dva protony a dva volné elektrony (  $e^-$  ). Jak je popsáno výše v úvodu této kapitoly, kyslík je pouze vedlejším produktem, který je dále nepotřebný, či dokonce škodlivý pro fotosyntetický aparát a tudíž dochází k jeho rychlému odvádění z oblasti lumenu thylakoidu, nebo alespoň navázání některým z pomocných barviv (např. karotenoidy). Dva kationty vodíku jsou stejně jako kyslík uvolněny do lumenu, kde se podílejí na vzniku protonového gradientu a posléze na fosforylací ADP. Poslední složkou, která se díky hydrolyze uvolní jsou dva volné elektrony. Ty zpětně redukují reakční centrum  $P680^+$ , které se kladně nabílo po předání excitovaných elektronů pro štěpení vody.

Fotosystém II však neposkytuje excitované elektrony pouze vodu štěpícímu komplexu. Druhou a neméně důležitou jeho funkcí je zásobovat elektrony fotosystém I. Na něj však elektrony nedoputovávají excitované, nýbrž jejich energie je využívána v průběhu transportu, na PSI tedy přicházejí opět deexcitované elektrony, jejichž osudy se budou zabývat dále v odstavci 1.3.4. Prvním článkem v transportním řetězci mezi PSII a PSI tvoří plastochinon ( PQ ). Nejprve se projeví přítomnost plastochinu  $Q_A$ , který na sebe váže excitovaný elektron z reakčního centra PSII. Z  $Q_A$  později elektron přechází na plastochinon  $Q_B$ . Ten má schopnost vázání dvou elektronů a je tedy zapotřebí dvou redukovaných molekul  $Q_A$ . Plastochinon  $Q_B$  ovšem není pouze přenašečem elektronů. Kromě elektronů, kterými se redukuje, navazuje také dva protony ze stroma thylakoidu, chcete-li z matrixu chloroplastu. Po navázání prochází ve formě  $PQH_2$  membránou k Cytochromu  $b_6/f$ . Zde jsem použil spojení „prochází membránou“ a to zcela záměrně, jelikož plastochinon se

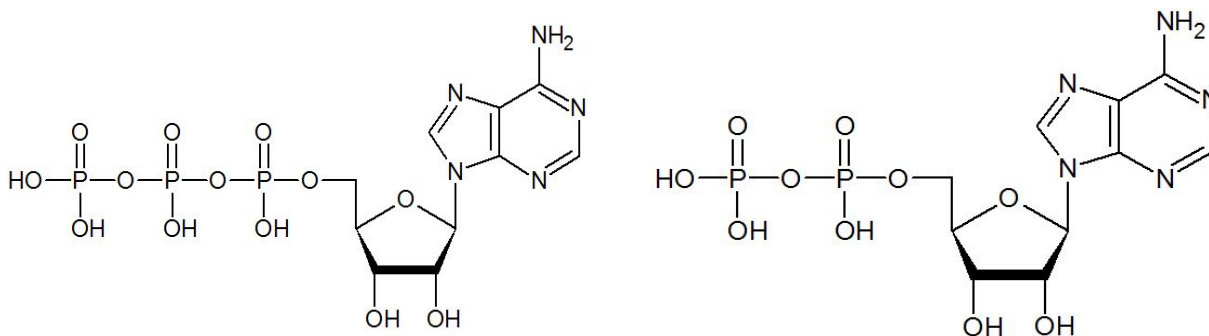
pohybuje v prostoru uvnitř membrány, mezi hydrofobními mastnými kyselinami tvořícími části molekul fosfolipidů, z nichž je thylakiodní membrána složena.

Jakmile doputuje PQH<sub>2</sub> na Cytochrom b<sub>6</sub>/f, předá mu přenášené elektrony a protony. Dva kationty vodíku jsou uvolněny do lumenu thylakoidu, kde se stejně jako H<sup>+</sup> vzniklé při hydrolyze vody podílejí na tvorbě protonového gradientu. Osud dvou elektronů donesených PQH<sub>2</sub> se zpočátku podobá tomu, který potkal přenášené protony. Elektrony jsou také transportovány směrem do lumenu thylakoidu, na rozdíl od protonů však nejsou uvolněny do matrix thylakoidu. První z obou e<sup>-</sup> je transportován dále na plastocyanin ( PC ), který ho přes několik bílkovin a poté lumenem thylakoidu přenáší k fotosystému I. Druhý elektron má však svou cestu o něco složitější. Je přesunut skrze membránu a redukuje další molekulu PQ. Díky tomuto důmyslnému mechanismu se zvýší počet kationtů vodíku uvolněných do lumenu thylakoidu o další 2 H<sup>+</sup>. [Procházka, 1998]

### 1.3.3 ATP-syntáza

V posledních odstavcích jsem se stále zmiňoval o tvorbě protonového gradientu v lumenu thylakoidu. Jeho přítomnost je klíčová pro výrobu jednoho ze dvou produktů fotochemické části fotosyntézy - ATP. Molekula ATP má zcela zásadní význam pro fungování buňky. Její úděl spočívá v přenosu energie potřebné pro různorodé děje probíhající v buňce. Příkladem takového děje může být buněčné dýchání, či aktivní transport molekul nebo iontů skrze cytoplazmatickou membránu. ATP sice není jedinou molekulou, nacházející se v buňkách, se schopností přenosu energie, může se však pyšnit výsostným postavením. Účelem výroby ATP v průběhu fotosyntézy však není zásobování rozličných reakcí v buňce. Vyrobena ATP má jediné poslání - slouží jako zdroj energie pro tvorbu glukózy.

I nezkušený biochemik jistě ví, co se skrývá pod zkratkou ATP. Jedná se o molekulu adenosintrifosfátu. Centrum této molekuly tvoří ribóza, na níž je z jedné strany navázán adenin a ze strany druhé připojen řetězec tří fosfátů (viz obrázek 1.3(3)). Ona zázračná schopnost přenosu energie se ukrývá právě ve vazbách mezi třemi navázanými fosfáty. Výhodnost těchto vazeb pro přenos energie pramení z jejich vysoké energetické bohatosti a poměrné snadnosti štěpení. Pro většinu reakcí uvnitř buňky platí, že dochází k odštěpení pouze jednoho fosfátového zbytku, čímž vzniká ADP ( adenosindifosfát ). V některých případech však může dojít ke štěpení dvou vazeb a vzniku AMP ( adenosinmonofosfát ). Ovšem jeho zpětná fosforylace je opozdnání složitější. Z tohoto důvodu je pro rostliny výhodné štěpení pouze jedné vazby v molekule ATP za vzniku ADP (obrázek 1.3(3)) a následná fosforylace probíhající prostřednictvím ATP-syntázy. [Kodíček a Karpenko, 2000]



Obrázek 1.3(3): Nalevo struktura adenosintrifosfátu (ATP) jako přenašeče energie. Na pravé straně adenosindifosfát (ADP), ze kterého připojením fosfátového zbytku vzniká ATP.

ATP-syntázu lze popsat jako jeden z snad nejzvláštnějších, leč zároveň nejdůmyslnějších proteinových komplexů v thylakoidní membráně. Jeho unikátnost spočívá zejména ve schopnosti využívat kinetickou energii protonů pro vznik chemické vazby, a sice pro připojení jednoho fosfátového zbytku k molekule ADP, čímž vzniká energeticky nabitá molekula ATP. Hnací silou tohoto procesu je protonový gradient vytvořený díky PSII, Cytochromu  $b_6/f$  a PQ v lumen thylakoidu. Protony mají přirozeně tendenci vyrovnávat rozdílné pH mezi stroma a lumenem svým přechodem přes membránu. Ovšem jak jsem zmínil v kapitole 1.3.1, membrána je pro  $H^+$  nepropustná. Protony jsou tedy nuceny hledat proteinové komplexy umožňující jejich transport na druhou stranu membrány. Jediným komplexem, který tento transport umožňuje, je v případě thylakoidní membrány ATP-syntáza, jež se skládá z pěti spojených polypeptidových jednotek. Protony postupně procházejí skrze ATP-syntázu, přičemž jsou nuceny pronikat skrze mechanismus připomínající „kolotoč“. Kationt vodíku se nejprve dostane na jednu „sedačku“ tohoto kolotoče. Aby mohl vypadnout na stromální straně membrány, je nucen tímto kolotočem pootočit. Tím předává ATP-syntáze energii, která je využita pro navázání fosfátového zbytku na molekulu ADP.

#### 1.3.4 Fotosystém I a NADP<sup>+</sup> reduktáza

Maximum absorpance v červené oblasti vykazuje fotosystém I při světle o vlnové délce 700nm, jeho reakční centrum se tedy označuje jako P700. Obdobně jako u PSII je k reakčnímu centru připojen světloběrný komplex napomáhající absorpci energie záření. Narozdíl od PSII však světloběrné molekuly fotosystému I nevykazují téměř žádnou fluorescenci, má práce se proto zabývá pouze zkoumáním chování fotosystému II. I přesto se však krátce zmíním o procesech probíhajících na PSI a přilehlém ferodoxinu.

Na fotosystém I jsou transportovány elektrony z PSII (viz kapitola 1.3.2). Při příchodu na PSI však postrádají enegetický potenciál, který jim byl udělen excitací na PSII. Úkolem reakčního centra fotosystému I je tedy opětovná excitace těchto deexcitovaných elektronů. Po excitaci stojí elektrony před volbou. Mohou se buďto vrátit na Cytochrom  $b_6/f$ , v tomto případě jde o tzv. cyklickou fosforylaci. Při tomto procesu však ve fotosyntéze dochází pouze k fosforylaci ADP na ATP, nikoliv k redukci NADPH<sup>+</sup>. Ostatně proces cyklické fosforylace není rostlinami nijak hojně využíván. Naprostou většinu svého času věnují rostliny necyklické fosforylaci. Při ní nedochází k vracení reexcitovaných elektronů zpátky na Cytochrom  $b_6/f$ , ale jsou dále využívány. Z fotosystému I putují tyto energeticky opět bohaté elektrony na NADP<sup>+</sup> reduktázu, čili ferodoxin. Jeho úkolem je redukce molekuly NADP na NADPH+ $H^+$ , za pomoci elektronů dodaných z PSI a dvou protonů ze stroma thylakoidu. Význam molekuly NADPH+ $H^+$  spočívá zejména ve schopnosti přenosu protonů. Ve fotosyntéze je této její schopnosti využíváno dále v Calvinově cyklu. Ferodoxin se ovšem nezaměřuje pouze na redukci NADP. V případě nedostatku této molekuly v okolí je schopen redukovat nitridy, či sírany. [Procházka, 1998]

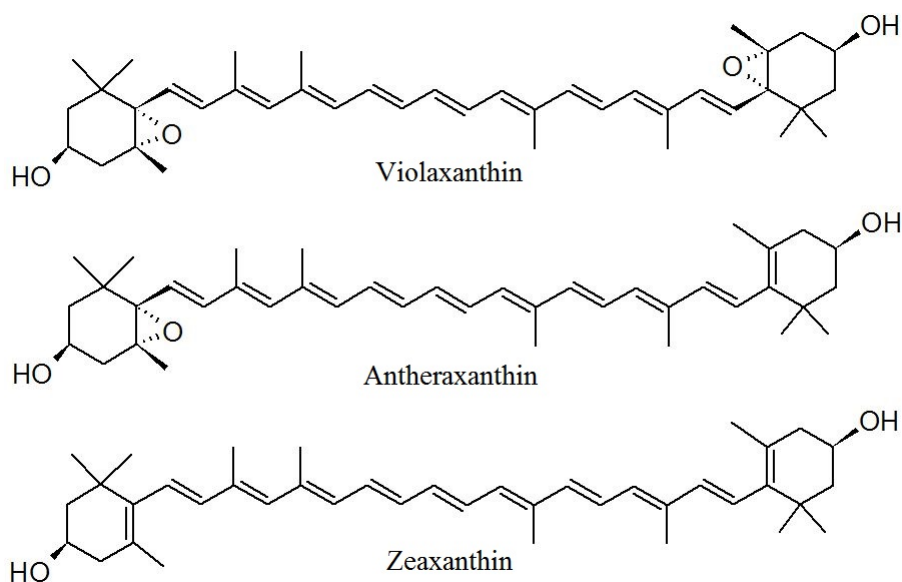
### 1.4 Fotochranné mechanismy v chloroplastu

Fotosyntéza, přesněji řečeno její rychlost a výtěžek, jsou závislé na intenzitě fotosynteticky aktivního záření dopadajícího na thylakoidy. V průběhu dne se ovšem tato intenzita velice razatně mění. Každý si uvědomí, že množství světla dopadajícího ráno a v pravé poledne jistě nelze srovnávat. Další určující faktor tvoří zeměpisná poloha, prakticky řečeno tedy úhel pod kterým dopadá světlo ze Slunce na zemský povrch, s nímž je spjat i koloběh ročních období. Z hlediska intenzity záření tedy v průběhu dne existují dva extrémy. Prvním je tma - prostá nepřítomnost

světla. Ta pochopitelně znemožňuje průběh světelné fáze fotosyntézy. Nenes s sebou však žádné riziko poškození pro fotosyntetický aparát. Druhou, a pro fotosyntetizující organismy mnohem nebezpečnější situací, je přílišná intenzita fotosynteticky aktivního záření. Pokud je rostlina osvětlena intenzitou světla, na kterou není adaptována, dochází k tzv. *fotoinhibici*. Dle typu poškození rozlišujeme *fotoinhibici dynamickou* a *chronickou*. Při dynamické fotoinhibici se v rostlině aktivují mechanismy ochraňující fotosyntetický aparát, který by mohl být poškozen pohlcením přílišného množství energie. Vedlejším efektem těchto ochranných mechanismů je snížení výtěžku fotosyntézy. Po snížení ozáření se však vrací na původní hodnotu. Naproti tomu chronická fotoinhibice představuje nevratné snížení výnosu fotosyntézy, popřípadě i její zastavení. Toto nevratné poškození je způsobeno přebytkem energie, který poškozuje zejména citlivý protein D1 v reakčním centru PSII, které se posléze stává neschopným přenosu elektronů dále do fotosyntetického aparátu. Jediným způsobem reparace tohoto poškození je náhrada nefungujícího proteinu nově syntetizovaným. Vzhledem k tomu, že standardní životnost proteinu D1 se pohybuje okolo 30 minut, mají organismy vždy v zásobě nasyntetizované nové proteiny. Nicméně pokud má silné ozáření delšího trvání, organismus nestačí dostatečně rychle syntetizovat nové proteiny a může tedy dojít až k úplnému zastavení procesu fotosyntézy. Existuje několik způsobů, jak se mohou fotosynteticky aktivní organismy vyhnout chronické fotoinhibici. Jednou z možností je například xantofylový cyklus, či fluorescence chlorofylu. [Pavlová, 2005]

### 1.4.1 Xantofylový cyklus

Jednou z možností, jak ochránit fotosyntetickou membránu před poškozením vlivem nadměrného množství pohlcené energie, je tepelná deexcitace - vyzáření pohlcené excitační energie ve formě tepla. K tomuto účelu byly organismy vyvinuty tzv. *xantofylový cyklus*. Xantofyly jsou kyslíkaté deriváty karotenoidů. V xantofylovém cyklu rostlin se objevují tři formy těchto barviv - *violaxanthin*, *antheraxanthin* a *zeaxanthin* (viz obrázek 1.4(1)). Z chemického hlediska tvoří rozdíl mezi těmito barvivy epoxidové skupiny. *Violaxanthin* obsahuje dvě, na každém konci molekuly jednu. *Antheraxanthin* disponuje už jen jednou epoxidovou skupinou a *zeaxanthin* je jich naprosto „zproštěn“. Nápadná podobnost těchto tří barviv samozřejmě není nahodilá, či bezúčelná.



Obrázek 1.4(1): Chemická stavba violaxanthinu (první od shora), antheraxanthinu (uprostřed) a zeaxanthinu (dole). *Violaxanthin* se běžně vyskytuje v neozářených buňkách, při ozáření buněk silným světlem ovšem dochází k rozeběhnutí xantofylového cyklu, tzn. deepoxidaci violaxanthinu přes *antheraxanthin* až na *zeaxanthin*, který je schopen účinně dissipovat excitační energii ve formě tepla.



Za obvyklých podmínek disponuje fotosyntetizující organismus především violaxanthinem a menším množstvím molekul zeaxanthinu. Při nadměrném ozáření, se vlivem činnosti PSII a Cytochromu  $b_6/f$  zvyšuje koncentrace protonů v lumenu (viz kap. 1.3.2). Dosažení kriticky nízké hodnoty pH uvnitř thylakoidní membrány vede ke spuštění xantofylového cyklu. Jako první krok je z jednoho konce molekuly violaxanthinu odštěpena epoxidová skupina. Vzniká antheraxanthin, který ovšem v celém cyklu vystupuje pouze jako meziprodukt. Z antheraxanthinu je stejným postupem, jako prve z violaxanthinu, odštěpena i druhá epoxidová skupina. Výsledkem je zeaxanthin, který disponuje kýženou schopností účinného odvodu energie ze světlosběrného systému a její následné disipace ve formě tepla. Pomocí čehož chrání proteiny v reakčním centru citlivého fotosystému II, ale i odolnějšího fotosystému I před poškozením. Pokud je intenzita světelného záření snížena, začne opačný cyklus, tedy epoxidace zeaxanthinu přes antheraxanthin zpět na violaxanthin. [Procházková, 1998]

#### 1.4.2 Fluorescence chlorofylu

Při ozáření fotosyntetického aparátu lze pozorovat velice zajímavý jev - fluorescenci chlorofylu. Jisté procento fotonů absorbovaných světlosběrnými systémy je vyzářeno zpět do prostředí, ovšem s delší vlnovou délkou. V případě PSII mají vyzářené fotony vlnovou délku 685 nm, zatímco vlnové délky přijímaných fotonů se pohybují (v červené oblasti) okolo 680 nm (viz graf 2.3(1a)). Fluorescenci vykazují oba fotosystémy, nicméně majoritním podílem přispívá PSII. Například u rostlin má PSII „na svědomí“ až 90% procent celkové fluorescence. Fluorescenci lze pozorovat vždy při ozáření fotosynteticky aktivním zářením. Za standardních podmínek je výtěžek fluorescence velmi malý, pokud však dojde k prudkému zvýšení intenzity dopadajícího světla, prudce vzroste i výtěžek fluorescence. Mezi intenzitou fluorescence a výtěžkem fotosyntézy tedy existuje jakási hrubá nepřímá úměrnost, díky čemuž lze měření fluorescence využít k monitorování fotosyntetické aktivity. [Soukupová a Roháček, 2005]

K pochopení mechanismu fluorescence je nejprve nutné připomenout některé fyzikální vlastnosti, jimiž disponují elektrony v atomu. Každý jistě ze školy zná velice zjednodušený model atomu, kde protony a neutrony tvoří jádro, okolo něž obíhají elektrony po tzv. orbitalech. Orbital vlastně představuje přesně danou energetickou hladinu. Všechny elektrony obíhající ve shodném orbitalu mají stejnou energii, určenou právě orbitalem ve kterém se nachází. Mezi orbitaly se elektrony mohou pohybovat. Tento jev se nazývá *kvantový skok*, či chcete-li *kvantový přechod*. Elektrony si ovšem nemohou jen tak z dlouhé chvíle přeskakovat mezi orbitaly, kvantový skok má „přísná“ pravidla. Především energie potřebná pro excitaci  $e^-$  musí mít stejnou hodnotu, jako rozdíl energetických hladin, mezi nimiž elektron přechází. Při excitaci ovšem elektron nemusí projít všemi energetickými stavy, některé může jednoduše přeskočit. Vše záleží pouze na množství energie, které je elektronu dodáno. Kde ovšem elektron získá energii potřebnou ke kvantovému přechodu? Existuje řada možností, zde se budu zabývat pouze jednou, pro mou práci určující - absorpcí fotonu. Ovšem ne jentak ledajakého fotonu letící prostorem. Elektron může absorbovat pouze foton o energii shodné s energetickým rozdílem dvou valenčních stavů mezi nimiž přeskakuje. V případě fluorescence chlorofylu je celá situace více specifikována. Elektrony mohou být ze základního stavu ( $S_0$ ), excitovány pouze do dvou stavů -  $S_I$  nebo  $S_{II}$ . V případě kvantového skoku do prvního z těchto stavů absorbuje elektron foton z červené oblasti viditelného světla (okolo 680 nm). Pokud dojde k absorpci „modrého“ fotonu (tzn. zhruba 430 nm), provede elektron kvantový přechod do stavu  $S_{II}$ . Jakmile elektron přejde do vyššího stavu, okamžitě se „snaží“ spadávat nazpět do nižšího a tedy i stabilnějšího orbitalu. V excitovaném stavu se zdrží v průměru pouze  $10^{-9}$  sekundy. Prakticky ihned tedy spadává do nižšího orbitalu, což může uskutečnit prostřednictvím několika mechanismů. [Halliday, 2013; Pavlová, 2005]

První z nich se nabízí sám od sebe - celá tato práce je přeci o fotosyntéze. Při osvětlení vhodnou intenzitou FAR (a příhodných ostatních faktorů ovlivňujících fotosyntézu) je excitační energie elektronu předávána do reakčního centra fotosystému, kde je dále využita. Rychlost, s jakou dochází k předávání energie ve fotosyntetickém aparátu, je však omezená. Při opravdu vysoké intenzitě světla dochází k tzv. *saturaci*. Fotosyntetický aparát je zahlcen excitovanými elektrony, které nedokáže předávat dále. Elektrony se tedy své „přebytečné“ energie musí zbavit jiným způsobem. Naskýtá se jim možnost převést ji na teplo, leč chlorofyl není na disipaci energie ve formě tepla nijak uzpůsoben. Opačná situace však panuje u karotenoidů. A právě prostřednictvím jednoho z nich, zeaxanthinu, nejčastěji probíhá tepelná disipace energie u rostlin. Třetí variantou pro zbavení se přebytečné energie je právě fluorescence. Energie uvolněná při deexcitaci je vyzářena do prostoru ve formě fotonu přičemž vyzářené světlo má delší vlnovou délku (tedy nižší energii), než světlo přijaté (viz. úvod kapitoly 1.4). Důležitou poznámku je fakt, že mechanismus fluorescence se uplatňuje pouze při přechodu elektronu ze stavu  $S_1$  do  $S_0$ . Při deexcitaci mezi stavem  $S_{II}$  a  $S_1$  se projevuje pouze tepelná disipace, nikoliv fluorescence. [Pavlová, 2005]

### 1.4.3 Nefotochemické zhášení (NPQ)

Zkratka NPQ pochází z anglického *non-photochemical quenching*, v překladu tedy nefotochemické zhášení fluorescence. Jak se NPQ přesně počítá bude popsáno až v kapitole 2.2. V této podkapitole se budu věnovat objasnění otázky, co je vlastně NPQ. Abych se dobral k jeho definici, dovoluji si nejprve malý popis průběhu výtěžku fluorescence po ozáření předemzatemněného vzorku (pro ilustraci např. graf 4.5(2)). Bezprostředně po ozáření vzorku (0,1-1s) výtěžek fluorescence prudce vzroste na své maximum. V následné fázi, v řádu minut, začíná fluorescence klesat díky rozběhnutí fotochemických procesů v chloroplastech. Tyto fotochemické procesy odčerpávají energii z LHClI, díky čemuž zde nevzniká takový přebytek excitační energie, čímž je fluorescence částečně zhášena (tzv. fotochemické zhášení). Všechny ostatní procesy, vyjma zde právě popsaného rozběhnutí fotochemických procesů, spadají pod nefotochemické zhášení fluorescence, tedy NPQ. [Štroch et al.; 2004]

Jak je patrné z výše uvedeného, NPQ rozhodně nepředstavuje jeden proces, ale zastupuje řadu různorodých procesů, které lze dělit například podle doby, kdy se jejich účinek projeví. Dle tohoto dělení lze NPQ rozlišit na tři složky. První a nejrychlejší tzv. *energy-dependent quenching* (energetické zhášení), o něco pozdější tzv. *state-transition quenching* (stavový přechod) a poslední nejpomalejší *photoinhibitory quenching* (fotoinhibiční zhášení), představující vlastně opravu fotosyntetického aparátu poškozeného vlivem nadměrného množství excitační energie. [Štroch et al.; 2004]

Energetické zhášení fluorescence je proces projevující se rychle, v řádech desítek sekund. Jde o typ tepelné disipace energie, jenž chrání fotosyntetický aparát proti poškození vlivem nadměrného množství excitační energie ve světlosběrných systémech. Pro úspěšné proběhnutí vyžaduje energetické zhášení fluorescence jednak přítomnost xantofylu, zejména zeaxanthinu, a jednak nízké pH v lumenu thylakoidu, tedy vytvoření protonového gradientu na membráně thylakoidu. U rostlin se zpětná reakce zeaxanthinu na violaxanthin (viz kap. 1.4.) odehrává rychle, avšak pro řasy to neplatí. Například u rozsivek *Phaeodactylum trocirnutum* je zhášení výtěžku fluorescence spojené s xantofylovým cyklem sice velmi silné, ale po skončení osvětlení vzorku se výtěžek fluorescence vrací jen velice pomalu. Důvodem tohoto jevu je potřeba NADPH pro zpětnou epoxidaci diatoxanthinu na diadinoxanthin (od xantofylů rostlin se liší v počtu epoxidových vazeb - mají pouze jednu). Bez ozáření ovšem není *P. tricornutum* schopna NADPH tvořit v dostatečné míře a

enzym zajišťující zpětnou epoxidaci (epoxidáza) je tedy v podstatě neaktivní. Díky tomu zůstává v chloroplastech diatoxanthin, který přijatou excitační energii disipuje ve formě tepla a výtěžek fluorescence tedy nemá možnost se nějak výrazně zvyšovat. U rozsivek tedy protonový gradient není pro zhášení nezbytně nutný - postačuje dostatečné množství deepoxidovaných xantofylů. [Grouneva; 2009; str 931 fig.1]

Druhý druh zhášení - *state-transition* (stavový přechod) je založen na naprosto odlišném principu než předchozí energetické zhášení. Jeho relaxace má poločas okolo 8 minut a v zjednodušené podstatě jde o fosforylaci některých LHCII, jehož důsledkem je odpojení od PSII a následné připojení k PSI. Bohužel zatím nelze zcela s určitostí říci, zda se jedná o fotochranný mechanismus, či nikoliv. Pravděpodobně jde o způsob jak co nejúčinněji rozložit excitační energii mezi PSII a PSI, avšak mnoho se o tomto procesu prozatím neví. Pro mou práci je však tento zhášecí mechanismus dalo by se říci irelevantní, protože velká část řas tímto mechanismem nedisponuje. [Štroch et al.; 2004]

## 2 Použité metody měření a měřící aparatura

Doposud jsem se věnoval pouze fyzikálním vlastnostem světla, rozboru stavby chloroplastu, či popisu jevu zvaného fluorescence. Nyní všechny tyto poznatky spojím v popisu měřících metod a postupů, jež jsem při svých experimentech využíval, tedy fluorescence chlorofylu, parametru  $F_V/F_M$  a výpočtu nefotochemického zhášení fluorescence (NPQ). K měření však není potřebná pouze metoda postupu, ale také vybavení. Z tohoto důvodu bude za popisem měřících metod následovat kapitola věnovaná právě laboratorní aparatuře. A jako poslední, avšak neméně důležitou, součástí celé „skládačky“ experimentu uvedu popis protokolu, který jsem při měřeních využíval.

### 2.1 Metoda saturačních pulzů

Existuje celá řada metod, které využívají jevu fluorescence k přiblížení fotosyntetických a fotoochranných mechanismů fungujících uvnitř buněk autotrofů. Mnou použitá metoda založená na fluorescenci chlorofylu se nazývá: metoda saturačních pulzů. Co si ovšem představit pod pojmem „saturační pulz“? V kapitole 1.4.2 jsem se zmiňoval o tom, jak vzniká jev fluorescence. Ve chvíli, kdy je světlosběrný systém zahlcen přebytečnou excitační energií, kterou nedokáže fotosyntetický aparát zpracovat a jež není odváděna tepelnou disipací, dochází k vyzařování pohlcené energie zpět do prostoru ve formě viditelného záření. Je důležité si uvědomit, že aby byla přebytečná energie efektivně odváděna ve formě tepla, je zapotřebí aktivace zhášecích mechanismů, které jsou v buňkách adaptovaných na tmu vypnuté. Musí se tedy nejprve rozběhnout xantofylový cyklus (viz. kapitola 1.4.1) a některé další procesy. Pokud ovšem dodáme světlosběrnému systému vysoké množství energie ve velmi krátkém čase, tyto zhášecí procesy jednoduše nestihnou proběhnout. V případě saturačního pulzu, který trvá pouhou jednu sekundu, tedy nedochází ke změně míry disipace energie ve formě tepla, ale k redukci veškerých molekul plastochinonu, jež je vázán v PSII. Ve chvíli, kdy je všechen plastochinon v redukovaném stavu již neexistuje přenašeč, jež by transportoval excitované elektrony z reakčního centra fotosystému II. Veškerá excitační energie přijatá světlosběrným systémem, která není disipována ve formě tepla, je tedy vyzářena zpět do prostoru jako fluorescence - měřený výtěžek fluorescence se prudce zvýší. Důležité ovšem nejsou pouze vlastnosti saturačního pulzu, ale i jeho umístění z hlediska časové osy měření. Pro dosažení korektních výsledků v experimentu je vhodné aplikovat saturační pulzy v pravidelných intervalech. Rozestup mezi nimi je poté volen s ohledem na typ měření, například v mé práci je zvolen odstup saturačních pulzů 60s (bližší popis protokolu měření v kap 2.3). Správný rozestup je důležitý zejména z hlediska ovlivňování vzorku samotnými saturačními pulzy. Přestože jsem výše uvedl, že saturační pulz by neměl zapříčinit spuštění zhášecích mechanismů, přeci jenom nějaký vliv na fotosyntetický aparát nepochybně má. Pokud by tedy rozestup mezi saturačními pulzy byl příliš krátký nebo jejich trvání příliš dlouhé, mohlo by dojít k ovlivnění výsledků měření, jež je pochopitelně nežádoucí. [Soupová a Roháček, 2005]

V průběhu aplikace prvního saturačního pulzu na předem zatemněný vzorek se měří tzv.  $F_M$ , tedy maximální fluorescence. Jak již napovídá označení, jedná se o maximální intenzitu výtěžku fluorescence, které je daný vzorek schopen dosáhnout. Ještě před aplikací prvního saturačního pulzu na vzorek je ovšem nutné změřit minimální fluorescenci ( $F_0$ ). Ta se určuje při ozáření pouze měřícím světlem, které sice způsobuje excitaci elektronů barviv světlosběrných systémů, nicméně z důvodu jeho příliš slabé intenzity ve fotosytémech II nedochází k přenosu elektronů z vody na  $Q_A$ , proces fotosyntézy tedy neprobíhá. Hodnota minimální fluorescence ( $F_0$ ) představuje „nulovou“ hodnotu fluorescence pro veškeré výpočty následující po měření. Po změření hodnot  $F_M$  a  $F_0$  lze jednoduchým vzorcem (2.1(1)) vypočítat hodnotu variabilní fluorescence ( $F_V$ ).

$$2.1(1) \quad F_V = F_M - F_0$$

V dalším průběhu experimentu se pak sleduje právě vývoj  $F_V$ . Pokud se hodnota  $F_V$  navyšuje, dochází ve vzorku k nárůstu počtu excitonů, které nejsou zpracovány fotosyntetickým aparátem, ani fotoochrannými mechanismy a jsou vyzářeny ve formě fluorescence. Naopak snižování hodnot variabilní fluorescence dává tušit úbytku množství přebytečné energie ve světlosběrných systémech. Za tento úbytek mohou být zodpovědné fotoochranné mechanismy chránící reakční centra fotosystémů II před poškozením vlivem nadměrného množství excitační energie. Druhou variantu, vysvětlující zhášení variabilní fluorescence, představuje aktivace fotosyntézy - jinak řečeno „zpracování“ excitonů fotochemickou cestou. Trvalé snížení hodnot  $F_V$  však může mít ještě jeden, pro buňky mnohem ničivější důvod - trvalou fotoinhibici. Při poškození světlosběrného systému dojde k narušení chemické struktury barviv, jež jej tvoří. Narušení chemické struktury se pochopitelně musí nějak projevit - barviva ztrácí schopnost přijímat a zpracovávat energii fotonů a když nejsou schopna energii fotonů přijmout, nemohou ji ani později vyzářit v podobě fluorescence. Tímto mechanismem je tedy snížena hodnota variabilní fluorescence při trvalé fotoinhibici. [Misra et al., 2012]

S hodnotami maximální a variabilní fluorescence se pojí parametr  $F_V/F_M$ . Hodnotu tohoto parametru nelze přímo měřit, ale určuje se jako rozdíl maximální a minimální fluorescence, dělený hodnotou maximální fluorescence (viz vzorec 2.1.(2)).

$$2.1(2) \quad F_V/F_M = (F_M - F_0) / F_M$$

Parametr  $F_V/F_M$  lze popsat jako maximální možný výtěžek fluorescence, jehož je schopen vzorek dosáhnout. Z toho vyplývá, že jakékoliv poškození fotosyntetického aparátu se projeví snížením hodnoty  $F_V/F_M$  (obdobným mechanismem jako u variabilní fluorescence), díky čemuž lze tento parametr využít jako „měřítko kondice“ ve které se nachází fotosyntetický aparát vzorku. Dokonce se ukazuje, že schopnost úspěšně fotosyntetizovat je silně spjata se stavem celé rostliny, či buňky a parametr  $F_V/F_M$  nám tedy prozrazuje hodně nejen o stavu samotného fotosyntetického aparátu, ale i organismu autotrofa jako celku. Z tohoto důvodu se hodnota  $F_V/F_M$  v praxi často využívá k monitorování stavu rostlin. Její snižování může být způsobeno nedostatkem vody nebo živin, či například napadením rostliny patogeny. Je potřebné dodat, že buňky mořských řas, které jsem při svých měřeních využíval, vykazují i při optimálním stavu menší hodnoty  $F_V/F_M$  než zelené rostliny. V mém experimentu jsem využíval pouze buňky, které vykazovaly hodnotu  $F_V/F_M$  větší než 0,6. Většina měření pak probíhala na buňkách u nichž se poměr  $F_V/F_M$  pohyboval v rozmezí 0,65 a 0,7. [Misra et al., 2012]

## 2.2 Hodnota NPQ

Sledováním změn samotné změřené fluorescence lze odvodit jisté závěry o dění ve vzorku, nepředstavuje však jediný parametr, pomocí kterého si lze udělat představu o procesech, spjatých s fotosyntézou, probíhajících uvnitř chloroplastů. Druhým parametrem, jemuž jsem ve své práci věnoval nejvíce pozornosti, byl vývoj hodnot NPQ (zkratka z angl. *non-photochemical quenching*), česky tzv. nefotochemické zhášení fluorescence. Obdobně, jako u variabilní fluorescence i tento parametr se přímo neměří, ale je vypočítáván dle následujícího vzorce 2.2(1).

$$2.2(1) \quad NPQ = (F_M / F'_M) - 1$$

Hodnota  $F_M$  zde představuje maximální fluorescenci změřenou při prvním saturačním pulzu a  $F'_M$  je maximum fluorescence naměřené při konkrétním saturačním pulzu v průběhu experimentu. Jak je

ze vzorce jistě patrné, parametr NPQ se nesleduje po celou dobu měření, ale pouze při saturačních pulzech. Každá hodnota NPQ vynesena v grafu pak tedy představuje jeden saturační pulz, kterému byl vzorek vystaven. [Misra et al., 2012]

Na první pohled by se mohlo mylně zdát, že parametr NPQ je velice podobný měření samotné fluorescence a nepřináší pro nás nic nového. To však není ani zdaleka pravda. Jak je popsáno výše, fluorescence nám ukazuje, kolik energie bylo ze světloběrného systému vyzářeno zpět do okolí ve formě viditelného světla, respektive kolik energie nebylo zpracováno ani fotosyntetickým procesem, ani odvedeno ze světloběrných systémů prostřednictvím fotoochranných mechanismů. Nefotochemické zhášení fluorescence, jak již napovídá sám název, je od fluorescence samotné svým významem naprosto odlišné. NPQ vyjadřuje právě to množství energie, jež bylo disipováno ve formě tepla, či odvedeno prostřednictvím jiných fotoochranných mechanismů. Stručně lze tvrdit, že čím více fotoochranných mechanismů se aktivuje, respektive čím více se zvedá účinnost fotoochranných mechanismů jako celku, tím roste i hodnota NPQ. Jinak řečeno: NPQ představuje jakési měřítko množství energie odvedené ze světloběrného systému skrze fotoochranné mechanismy. Tyto vlastnosti dělají z parametru NPQ ideální nástroj, jenž nám umožňuje přímo sledovat vývoj aktivace/deaktivace fotoochranných mechanismů v chloroplastech vzorku a jejich účinnost. [Misra et al., 2012]

### 2.3 Laboratorní aparatura

Při měření svých experimentů jsem využíval vcelku jednoduché aparatury sestávající se z řídicí jednotky, detektoru fluorescence, měřícího světla, aktinického světla, saturačního světla a několika filtrů. Všechny tyto části laboratorního vybavení, s výjimkou řídicí jednotky, byly uchyceny pomocí držáků přimontovaných k desce určené pro optické stoly. Díky tomuto uchycení byla zajištěna stabilita a nepohyblivost celé aparatury v průběhu všech experimentů. Zajištění nepohyblivosti jednotlivých komponentů aparatury bylo důležité pro korektní výsledky snímání fluorescence. Pokud by došlo k pohybu detektoru od/ke vzorku, změřené intenzity fluorescence by se lišily díky rozptylu světla na cestě mezi vzorkem a detektorem. Později by tedy nebylo možné nazvájem porovnávat jednotlivá měření, čímž by došlo k znehodnocení výsledků celého experimentu.

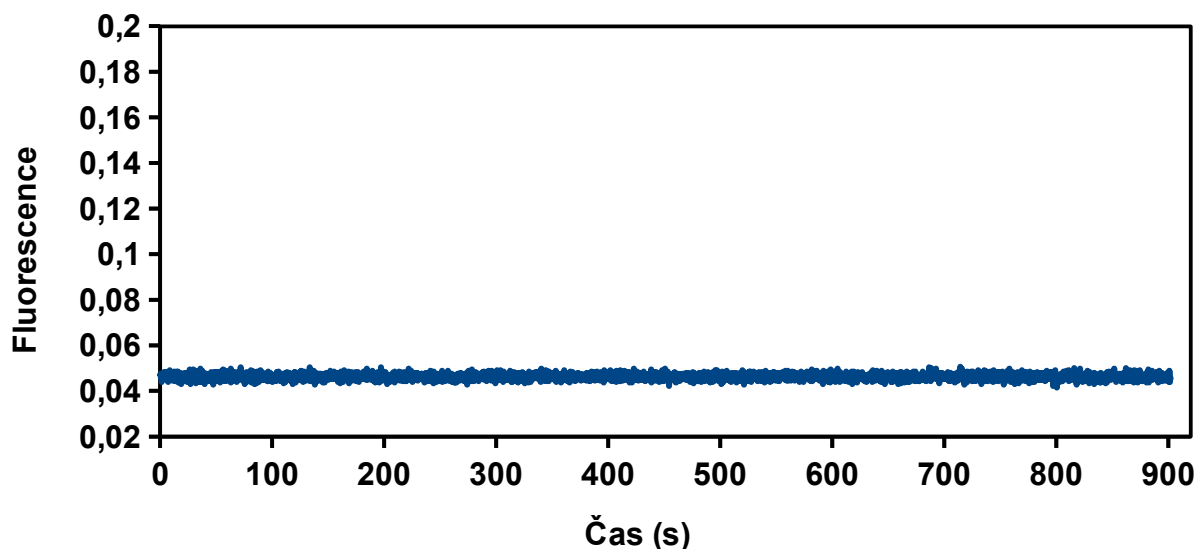
Mnou využívaná řídicí jednotka nese označení *FL200/PS* (viz příloha - ilustrace (1)) Jejím úkolem bylo pochopitelně řízení chodu světla a detektoru v době měření a také převádění analogového signálu přicházejícího od detektoru na digitální data, jež jsem dále zpracovával. Tímto se tedy dostávám k detektoru fluorescence. Jako detektor byla použita *PIN* dioda, umístěná do blízkosti kyvety se vzorkem, kolmo na směr světlovodiče s jehož pomocí byla kyveta osvětlována. Jak řídicí jednotka, tak detektor pocházejí od společnosti Photon Systems Instruments sídlící v Brně. Pro zajištění měření pouze a jen fluorescence chlorofylu a ne rozptýleného světla ze saturačních pulzů, byly před detektorem umístěny dva optické filtry. Prvním filtrem byl interferenční *XVL0650-Longpass* (vyrobený japonskou firmou Asahi Spectra) zajišťující neprůchodnost kratších vlnových délek než 650nm, který byl doplněn červeným skleněným filtrem *RG665 Schott longpass 665 nm* vyráběným firmou Shott sídlící v Německu. Díky kombinaci těchto dvou filtrů dopadalo na detektor pouze červené světlo s delšími vlnovými délkami než 665nm, tedy přesně takové světlo, jaké je vyzařováno do prostoru při fluorescenci chlorofylu.

Dovolím si ještě krátký skok zpět k popisu řídicí jednotky. Nemohu si totiž dovolit opomenout popis měření prostřednictvím metody PAM (z angl. *Pulse Amplitude Modulation*), jež se česky překládá jako pulsně amplitudová modulace. Při ní je při každém měření nejprve zjištěna hodnota

pozadí měření, tedy šumu detektoru a fluorescence vyvolané aktinickým, či saturačním světlem. Teprve po zjištění hodnoty pozadí sepne měřící světlo a jednotka odečte druhou (pochopitelně vyšší) hodnotu intenzity fluorescence. Následně dojde k vzájemnému odečtení první hodnoty od druhé, čímž se z dat extrahuje pouze intenzita fluorescence vyvolaná měřícím světlem. Vzhledem ke stálosti intenzity měřícího světla tedy dostaneme výsledek, jenž není nijak ovlivněn žádnými rušivými faktory, jako je například osvětlení vzorku dalším světlem apod. Na závěr odstavce ještě dodám, že mnou použitá jednotka dokáže standardně spínat s přesností 1  $\mu$ s (1 mikrosekunda), takže i poměrně rychlé spínání světla a detektoru v experimentu zvládala bez nejmenších problémů.

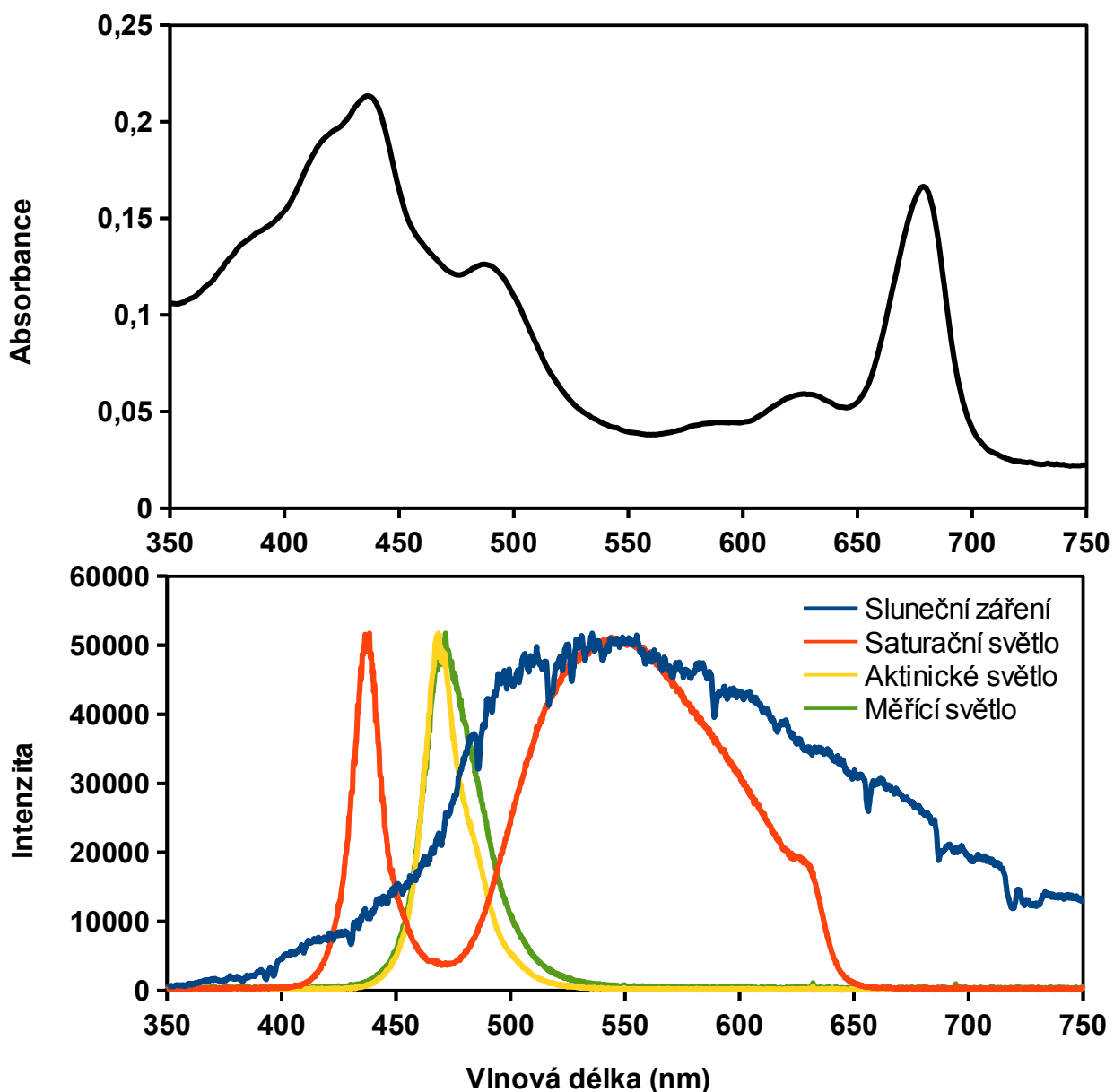
Nyní se budu věnovat popisu použitých zdrojů měřícího, aktinického a saturačního světla. Všechny tři zdroje byly tvořeny LED diodami a světlo z nich bylo vedeno přímo (v případě saturačního světla), či skrze světlovodič (aktinické a měřící světlo) na kyvetu se vzorkem (viz příloha - ilustrace(2)). Funkci měřícího světla zastávala modrá LED dioda *OptoSupply OSUB5111P 15000 mcd* o průměru 5mm, poskytující krátké pulsy (40 $\mu$ s) s intenzitou 17 $\mu$ E. Pro správné provedení experimentu je nutné, aby měřící světlo neovlivňovalo vzorek. To znamená, že měřící světlo nesmí vyvolávat fotosyntetickou aktivitu - na světlosběrném systému sice dochází k excitaci elektronů, ne však už k transportu energie do reakčního centra PSII. Abych dokázal, že mnou použité měřící světlo skutečně neovlivňovalo vzorek, provedl jsem patnácti-minutové měření fluorescence na buňkách *Nannochloropsis oceanica* DAY HL s použitím pouze měřícího světla (viz graf 2.3(1)). Jak je z daného grafu patrné, po celou dobu měření nedošlo k žádnému poklesu, ani navýšení hodnoty fluorescence. Pokud by se ve vzorku během měření spustil proces fotosyntézy, došlo by ke změně výtěžku fluorescence - některé z excitonů by byly odvedeny fotochemickou cestou a ne vyzářeny zpět do prostoru. Jak je ovšem patrné, ke změně fluorescence nedošlo - vzorek nebyl měřícím světlem nijak ovlivněn.

Saturační světlo tvořila bílá (*cold white*) LED dioda *MCWHL2* vyráběná americkou firmou Thorlabs sídlící v Newtonu v New Jersey. Před saturačním světlem byl namontován interferenční filtr *XVS0610-Shortpass* vyráběný firmou Asahi Spectra, jenž propouštěl pouze vlnové délky kratší než 610 nm. Důvodem instalace tohoto filtru byla ochrana detektoru před světlem s delšími vlnovými délkami než 650 nm (připomínám, že před detektorem byl filtr 650 nm longpass), které by ho mohlo při velké intenzitě poškodit a především by zcela znehodnotilo výsledky měření



Graf 2.3(1): Měření fluorescence u buněk *Nannochloropsis oceanica* HL při použití pouze měřícího světla. Ze stále konstantní hodnoty fluorescence je patrné, že měřící světlo neiniciuje zpuštění fotosyntézy uvnitř chloroplastů a žádným způsobem tedy neovlivňuje vzorek.

fluorescence. Od stejné firmy, jako saturační LED dioda, pocházela i modrá LED dioda *M470L2* vykazující maximální emisi v 470nm, jež v mém experimentu plnila funkci aktinického světla. Zmínil jsem zde maximum emise. Vzhledem k tomu, že jsem měřil biologický vzorek, bylo samozřejmě důležité svítit takovým světlem, jaké mnou použité organismy využívají k procesu fotosyntézy. Na následující stránce uvedené grafy 2.3(2a) a 2.3(2b) poskytují srovnání absorbance změřené u v experimentech využívaných buněk *Nannochloropsis oceanica* DAYHL a emisních spekter světél používaných při měření pokusů. Z tohoto srovnání je patrné, že použitá světla mají vlnové délky emisních maxim srovnatelné s vlnovými délkami absorpčních maxim fotosyntetických barviv, která obsahují mnou použité buňky.



Graf 2.3(1a) - nahoře: Absorpční spektrum buněk *Nannochloropsis oceanica* DAYHL.

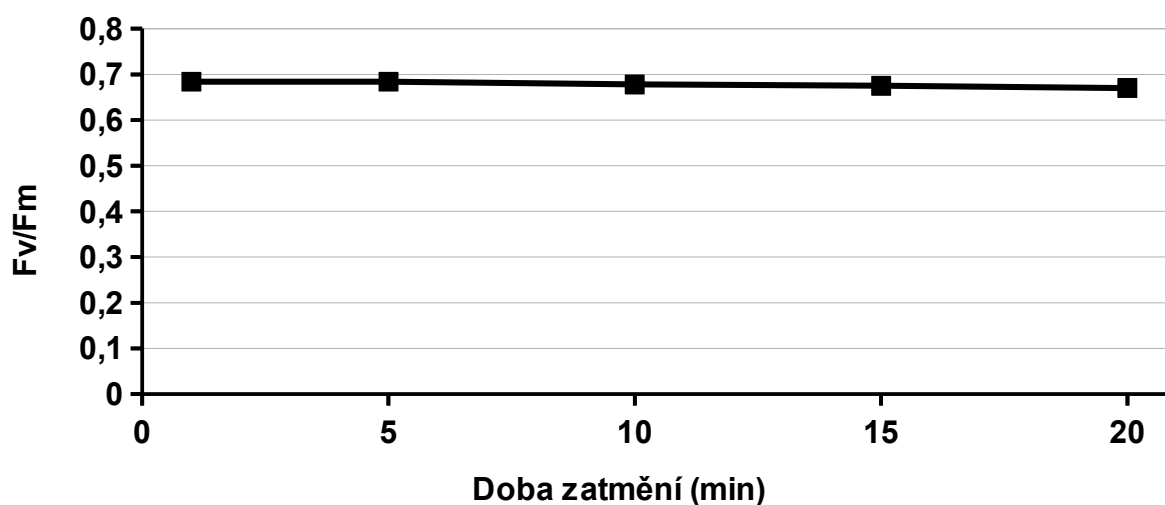
Graf 2.3(1b) - dole: Srovnání spektra slunečního světla a mnou použitého saturačního, aktinického a měřícího světla. Při srovnání s grafem 2.3(1a) je patrné, že v místech kde je absorbance chlorofylu nejvyšší mají použitá světla své emisní maximum.



## 2.4 Protokol měření

Pro svá měření jsem používal jednoduchý protokol s pravidelnými saturačními pulzy. Celková délka jednoho experimentu byla 20 minut. V prvních pěti minutách byl vzorek pouze umístěn do kyvetince, zatemněn a adaptoval se na temnostní stav. Zbylých 15 minut (chcete-li 900s) probíhalo samotné měření variabilní fluorescence. Abych dokázal, že 5 minut je dostatečná doba pro úplnou adaptaci vzorku na temnostní stav provedl jsem jednoduché měření parametru  $F_v/F_M$  na buňkách *Nannochloropsis oceanica* DAYHL - graf 2.4(1). Jak je z grafu patrné parametr  $F_v/F_M$  s přibývajícím časem neroste, což dokazuje, že již po prvních dvou minutách je vzorek plně adaptován na tmu a pětiminutový čas zatemnění je tedy jistě dostačující pro dosažení korektních výsledků experimentu. Nyní bych se měl pokusit vysvětlit, proč se hodnoty  $F_v/F_M$  v grafu pomalu a nepříliš výrazně, ale přeci jen snižují. V průběhu všech prováděných experimentů se takovéto chování vyskytovalo poměrně často, ovšem pouze u řas rodu *Nannochloropsis*. Jedním z možných vysvětlení tohoto jevu by byla pomalá sedimentace buněk vzorku v kyvetě, která by posléze vedla ke snížení hodnoty  $F_v/F_M$ . Tomuto vysvětlení však odporuje malá velikost buněk *Nannochloropsis* a fakt, že nemají tendenci výrazně sedimentovat. Při slabém osvětlení buněk lze navíc pokles hodnoty  $F_v/F_M$  zvrátit, což také příliš neodpovídá představě sedimentace jako příčiny snižování  $F_v/F_M$ . Druhým a o mnoho pravděpodobnějším vysvětlením se jeví nějaký pomalý proces přizpůsobování se zatemnění uvnitř buněk. Je však možné ještě jedno vysvětlení. V rámci korektnosti bylo všech pět měření prováděných v jeden den na jedné kultuře buněk, přičemž po době zatemnění (která byla proměnlivá) proběhl vždy celý měřicí protokol trvajících 15 minut. Snižující se  $F_v/F_M$  tak nemusí být ničím jiným než odrazem přirozeného denního cyklu, který probíhá v buňkách. Po ránu vykazují buňky nejvyšší  $F_v/F_M$  a s blížícím se polednem se tento parametr mírně snižuje.

Ale zpět k protokolu měření. Hned v první vteřině protokolu byl, kromě zapnutí měřicího světla, aplikován i saturační pulz, který se opakoval každých 60s až do konce měření, přičemž jeden saturační pulz trval 1s. Společně s druhým saturačním pulzem, to znamená 60s od počátku měření, se zaplo aktinické světlo, které posléze svítilo po dobu 300s. Po vypnutí aktinického světla v čase 360s (počítáno od začátku protokolu) byl vzorek ozařován už pouze měřicím světlem a pravidelnými saturačními pulzy až do konce měření. Co se týče samotného detekování hodnot, data z detektoru byla zapisována každé dvě desetiny sekundy (0,2s). V průběhu saturačních pulzů, tedy vždy po dobu 1s, byl sběr dat zhuštěn a hodnoty fluorescence se odečítaly po pěti desetitisícinách sekundy (0,0005s tedy 0,5ms).



Graf 2.4(1): Závislost parametru  $F_v/F_M$  na době zatemnění vzorku před měřením. Měřeno na buňkách *Nannochloropsis oceanica* DAYHL.

### 3 Biologický materiál

Ve své práci jsem použil celkem čtyři různé druhy autotrofů pocházejících ze superskupiny SAR. Prvoci patřící do skupiny SAR získali schopnost fotosyntézy sekundární endosymbiózou ruduchy (červené řasy). Ne všichni zástupci z této superskupiny si ovšem ponechali prvotně nabitý fotosyntetický aparát. V průběhu času někteří z nich schopnost fotosyntézy ztratili, přičemž jistá část ji posléze opět nabyli. V dnešní době tedy superskupina SAR zahrnuje jak autotrofy, tak heterotrofy. Pro fotosyntetizující zástupce jsou typická barviva chlorofyl *a*, *c* a z řad karotenoidů je nejčastějším barvivem fucoxanthin. Samotná superskupina SAR se dále dělí na tři podskupiny, přičemž první písmena názvů těchto podskupin dala vzniknout zkratce SAR. Písmeno S je představováno skupinou Stramenopila, do níž jsou řazeny např. hnědé řasy a oomycety. Z mnou použitých druhů sem spadá eustigmatofytní řasa *Nannochloropsis oceanica* a zástupce rozsivek *Phaeodactylum tricornutum*. Druhá ze tří podskupin SAR se nazývá Alveolata a obsahuje zástupce z řad obrněnek, nálevníků a výtrusovců. Mnou zkoumaným organismem z této skupiny byla *Chromera velia*, jež je blíže příbuzná parazitickým výtrusovcům. Poslední podskupinou SAR jsou Rhizaria, mezi něž se řadí například mřížovci, či dírkonožci. Mezi Rhizaria byl dříve řazen můj poslední pokusný organismus - kokolítka *Emiliana huxleyi*. V současné době se vedou spory o zařazení kokolítek, zda lze zařadit pod Rhizaria nebo společně se skrytěnkami tvoří zcela odlišnou skupinu, nespadající do SAR, tzv. Hacrobia.

Bližšímu popisu mnou použitých druhů se budu věnovat o něco dále. Nyní se v rychlosti zmíním o podmínkách, za nichž byly kultury buněk pěstovány. Vzhledem k tomu, že všechny použité organismy mají svůj domov v moři, byly pěstovány v umělé mořské vodě - médium ASW f/2. Pěstovací pětilitrové lahve byly umístěny v klimatizovaných komorách, kde panovala konstantní teplota 22°C. Na kultury svítily LED žárovky a metal-halogenidové výbojky, které spektrálním složením odpovídají slunečnímu světlu. Pěstovací intenzity světla byly využity dvě - nízké světlo představované 15  $\mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a vysoké světlo s hodnotou 300  $\mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Buňky byly osvětlovány v jednoduchém cyklu s pravoúhlými pulzy 15 hodin světlo a 9 hodin tma.

#### 3.1 *Nannochloropsis oceanica*

Hlavní roli v této práci hraje druh *Nannochloropsis oceanica*, patřící mezi Stramenopila, konkrétněji mezi Eustigmatophyta. Jak již napovídá jméno této řasy - *oceanica*, jedná se o druh žijící v moři, čímž se výrazně odlišuje od ostatních, výhradně sladkovodních, zástupců skupiny Eustigmatophyta. Konkrétní mnou použitý kmen pochází z oblasti Rio de La Plata v Jižní Americe. Celá skupina Eustigmatophyta je typická absencí chlorofylu *c* a fucoxanthinu. Hlavním fotosyntetickým barvivem je pro Eustigmatophyta chlorofyl *a*. Dále se ve světlosběrných systémech nacházejí dva karotenoidy - violaxantin a vaucheriaxanthin. [Lee, 1999]

Všechny řasy patřící do rodu *Nannochloropsis* se řadí do tzv. nanoplanktonu. Buňky těchto řas dosahují pouze rozměrů dvou až tří mikrometrů [Kandilian et al., 2013]. I přes tyto malé rozměry je v dnešní době o řasy rodu *Nannochloropsis* velký zájem v průmyslu. Například mnou použitá *N. oceanica* se dnes průmyslově pěstuje jako krmivo pro rybí larvy a také mušle. Krmivo ovšem nepředstavuje jediné možné využití řas tohoto druhu. Vzhledem k velkému obsahu lipidů pohybujícímu se mezi 30 až 60% (v závislosti na pěstovacích podmínkách) vypadají tyto řasy i jako potencionální zdroj biopaliv. [Koberg, 2011; Rodolfi et al., 2008]

V současné době nepanuje úplná shoda na mechanismech NPQ u řas rodu *Nannochloropsis*. Pravděpodobně se zde vyskytuje silné zhášení výtěžku fluorescence, jež by mělo rychle mizet po zhasnutí světla. Hlavní roli zde tedy pravděpodobně hraje protonový gradient, jenž energetické zhášení zpouští. Vzhledem k obsahu violaxanthinu v tomto druhu řas je ale také možné, že zde svou roli hraje i xantofylový cyklus. [Cao; 2013] Jiné práce zase naznačují, že xantofylový cyklus hraje u těchto řas pouze nevýznamnou roli při reakci na nadměrnou teplotu. [Figueroa; 1997, Kotabová; 2011]

### 3.2 *Phaeodactylum tricornutum*

Druhým použitým druhem byla rozsivka *Phaeodactylum tricornutum*, patřící stejně jako *Nannochloropsis oceanica* do skupiny Stramenopila. Narozdíl od *Nannochloropsis* má však nahnědlé zbarvení, které je způsobené vysokým obsahem karotenoidu fucoxanthinu v chloroplastech. Z fotosyntetických barviv obsahuje *Phaeodactylum* chlorofyl *a* a chlorofyl *c*, přičemž jsou v poměru 4:1 (a:c). Narozdíl od ostatních organismů použitých v této práci lze tedy rozsivku *Phaeodactylum* označit za opravdu typického zástupce superskupiny SAR, do níž patří všechny mnou zkoumané organismy. [Lee, 1999]

Nyní bych se na malý moment pozastavil u rozsivek obecně, jelikož hrají důležitou úlohu v ekologii naší planety. To, že rozsivky tvoří podstatnou část mořského planktonu, ví jistě každý. Méně známý už je ale fakt, že tyto mikroorganismy mají „na svědomí“ zhruba 40% primární produkce světových oceánů [Yool a Tyrrell, 2003]. Pro vysvětlení dodám, že primární produkcí se rozumí syntéza organických látek z atmosférického oxidu uhličitého, nebo CO<sub>2</sub> přítomného ve vodě - tzn. produkce biomasy. Druhou pro lidstvo podstatnou vlastností rozsivek je jejich křemičitá chránka, kterou si stavějí jako ochranu buňky. Po odumření rozsivky klesá tato křemičitá chránka ke dnu, kde dochází k sedimentaci a vzniká tzv. křemelina. V dnešní době se průmyslově těží křemelina vzniklá sedimentací druhohorních a třetihorních rozsivek (v České republice oblast Františkových Lázní a Borovan u Českých Budějovic) a je využívána při výrobě filtrů, izolačních materiálů, skla, či k leštění optických čoček. [Jelínek, 2014] Druh *P. tricornutum* je běžný v chladných mořích severozápadu Evropy, např. při pobřeží Velké Británie.

O chování buněk *P. tricornutum* při osvětlení jsem se již částečně zmínil v kapitole 1.4.3. Jak již bylo řečeno, *Phaeodactylum* disponuje velice silným a účinným xantofylovým cyklem, nicméně je zde problém ze zpáteční přeměnou diatoxanthinu na prvotní barvivo diadinoxanthin. K této přeměně je potřeba NADPH, které ovšem není schopno *Phaeodactylum* tvořit, pokud není osvětleno. Díky tomu se nefotochemické zhášení po zhasnutí světla deaktivuje jen velmi pomalu. [Grouneva; 2009]

### 3.3 *Chromera velia*

Dalším použitým druhem byla *Chromera velia* patřící do skupiny Alveolata. Konkrétněji se jedná o mořského autotrofa, jehož výskyt je znám v oblasti Velké útesové bariéry ( Austrálie) a jenž je blízce příbuzný parazitickým výtrusovcům. Základním pigmentem fotosyntetického systému je chlorofyl *a*, dále *Chromera velia* obsahuje  $\beta$ -caroten, violaxanthin a isofucoxanthin. Zajímavostí je, že fotosyntetický aparát neobsahuje chlorofyl *c*. V dnešní době není zcela jasné, od koho přejal druh *Chromera* schopnost fotosyntézy. Existuje názor, podle něhož získala *Chromera* svůj chloroplast

díky terciální endosymbióze. Tuto hypotézu podporuje počet membrán obalujících chloroplast. Neobvyklá struktura genomu obsaženého v plastidech pak naznačuje možné pohlcení obrněnky, která dříve prodělala sekundární endosymbiózu. Obrněnky ovšem nejsou jediní kandidáti, od nichž by mohl chloroplast *Chromery* pocházet. Z hlediska pigmentového složení připadá také v úvahu některý ze zástupců skupiny Eustigmatophyta. [Oborník a Lukeš, 2013]

O druhu *Chromera velia* je známo, že vykazuje velmi vysoké hodnoty NPQ - dokáže přesánout i hranici 3, přičemž takto vysoké NPQ není u řas vůbec obvyklé. NPQ také vykazuje velice rychlý nárůst, jenž je způsoben rychle pracující violaxanthin deepoxidázou. Ovšem po zhasnutí světla vykazuje jen pomalou relaxaci, obdobně jako je tomu u rozsivek, avšak jeho xantofylový cyklus je stejně jako u rostlin založen na violaxanthinu. [Kotabová; 2011]

### 3.4 *Emiliana huxleyi*

Posledním mnou použitým druhem je kokolítka *Emiliana huxleyi*. Systematické zařazení tohoto organismu není zatím zcela vyřešeno. Je možné, že se jedná o zástupce skupiny Rhizaria, či se jedná o samostatnou větev eukaryotického života. Z hlediska pigmentů je *Emiliana huxleyi* podobná rozsivkám z rodu *Phaeodactylum*, shodují se v obsahu chlorofylu *a* a *c*, z karotenoidů pak mají společný fucoxanthin a diadinoxanthin. V *Emilianie* lze navíc nalézt také derivát fucoxanthinu 19'-hexanoyloxyfucoxanthin. [Lee, 1999]

Jak jsem již zmínil na počátku předchozího odstavce, *Emiliana huxleyi* je zástupcem z řad řas kokolitek, jež se vyznačují tvorbou tzv. kokolitů. Kokolity jsou vápnité destičky, z nichž jsou tvořené buněčné stěny řas ze skupiny kokolitek. Tyto destičky neustále odpadávají a jsou nahrazovány nově tvořenými. Odpadlé destičky sedimentují na dně moří, kde se takto vytváří vrstvy křídly. Vzhledem ke značné mocnosti takto vzniklých vrstev křídly hrají kokolity významnou úlohu ve fixaci uhlíku na zemi a to jak dnes, tak i v geologické minulosti. [Read et al., 2013] Jako ostatní kokolity i *Emiliana* je planktonní druh chladných moří a vytváří mohutné vodní květy viditelné díky odrazu světla kokolity i z vesmíru.

O buňkách *Emiliana huxleyi* je sice známo, že obsahují diadinoxanthin a na něm založený xantofylový cyklus (přeměna diadinoxanthinu na daitoxanthin). Nicméně detaily vývoje relaxace NPQ u této řasy nejsou dosud příliš známé. [Harris et al.; 2014]

## 4 Výsledky měření

Doposud jsem se věnoval pouze popisu faktů potřebných pro pochopení mého výzkumu, respektivu významu grafů, jež jsou tak říkajíc „plodem“ mé práce. A tedy nyní, když je vše potřebné již konečně řečeno, se mohu přesunout k onomu „těžišti“ mé práce - popisu jednotlivých pokusů a interpretaci výsledků měření. Začnu se srovnáním různých druhů fotosyntetizujících organismů popsaných v 3. kapitole (Biologický materiál). Posléze se budu zabývat rozdíly v NPQ křivkách buněk pěstovaných na nízké intenzitě světla ( $15\mu\text{E}$ ) a vysoké intenzitě ( $300\mu\text{E}$ ), tedy vlivem rozdílných pěstovacích podmínek na vývoj fotosyntetického aparátu konkrétní kultury buněk. Poté bude následovat, dalo by se říci, „hlavní měření“ celé práce ve kterém pomocí porovnání hodnot NPQ se zjištěnou fluorescencí odhadnu procesy probíhající uvnitř chloroplastů buněk druhu *Nannochloropsis oceanica* při vystavení fotosynteticky aktivnímu záření. Na závěr této kapitoly ještě přidám výsledky měření NPQ a fluorescence buněk, na něž byl aplikován inhibitor DCMU. Pro korektnost práce dodám, že pokud není napsáno jinak, byl při všech experimentech popisovaných v této kapitole (4 Výsledky měření) použit totožný protokol, popsaný výše v kapitole 2.3.

### 4.1 Srovnání NPQ křivek různých druhů

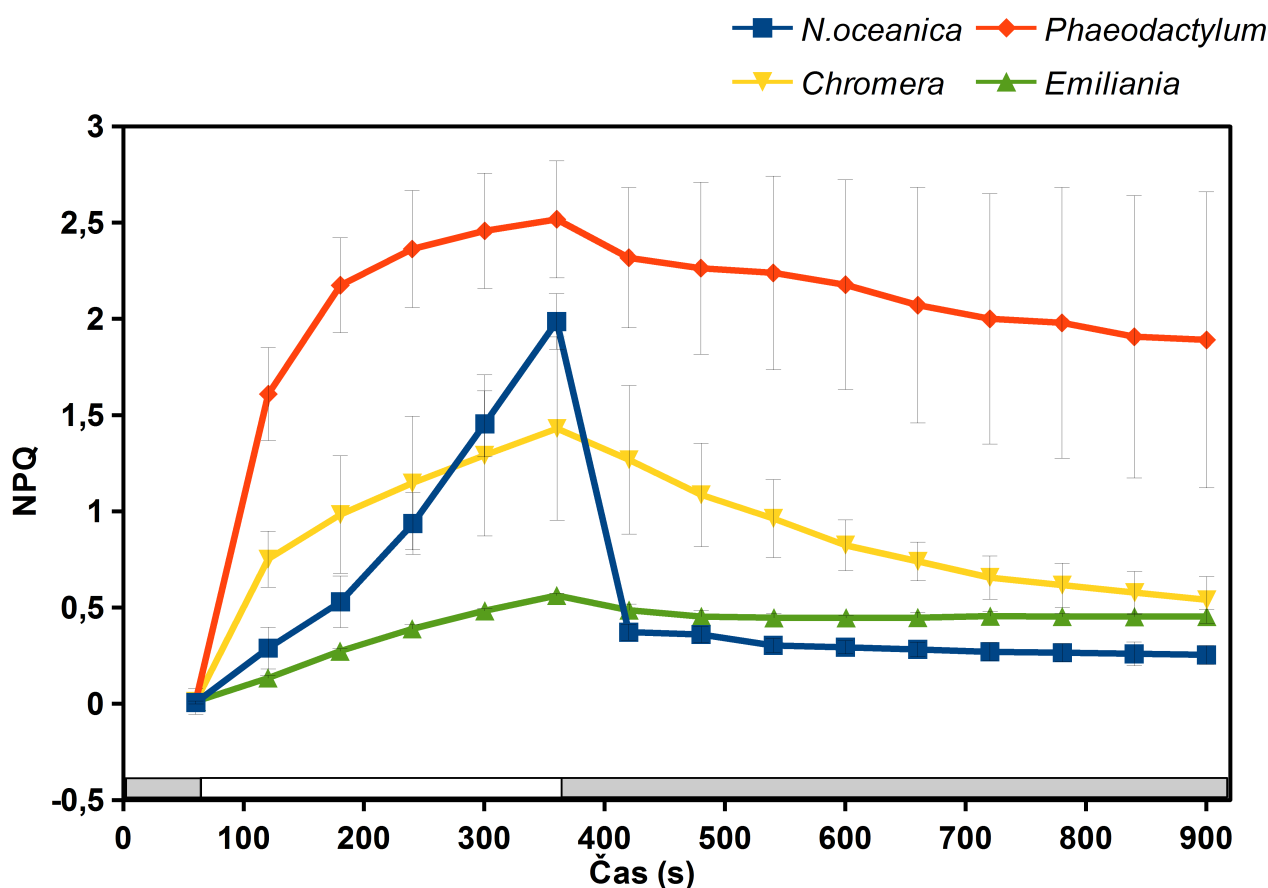
V prvním ze svých pěti experimentů jsem porovnával hodnoty parametru NPQ zjištěné u čtyř různých druhů autotrofů - *Nannochloropsis oceanica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chromera velia* a *Emiliania huxleyi*. Všechny čtyři použité kultury buněk byly pěstovány na nízkém světle (LL) a jako intenzita aktinického světla pro měření bylo zvoleno  $1000\mu\text{E}$ , tedy asi polovina maximální intenzity slunečního světla na Zemi. Pro jeden každý ze čtyř druhů jsem provedl vždy tři na sobě nezávislá měření, získaná data jsem později zprůměroval a ze zjištěných průměrných hodnot sestavil níže uvedený graf 4.1(1) (chybové úsečky představují směrodatnou odchylku). Nyní se budu postupně věnovat popisu významu tvaru jednotlivých NPQ křivek, přičemž na konci této kapitoly shrnu jednotlivé popisy a porovnáám navzájem různé druhy použitých autotrofů z hlediska funkčnosti a typu fotoochranných mechanismů.

Modrá křivka přísluší druhu *Nannochloropsis oceanica*. O něm bude ještě mnoho řečeno v dalších kapitolách této práce a proto se mu nyní budu věnovat pouze krátce, dokonce si dovolím přeskočit popis části grafu při osvětlení (60-360s od počátku protokolu). Přesunu se rovnou o něco dále. Již na první pohled je patrné, že křivka náležící druhu *Nannochloropsis* se od ostatních nejvíce liší v časovém úseku 360-420s. Zatímco ostatní mnou měřené druhy vykazují pozvolné snížení NPQ, *Nannochloropsis oceanica* je druh typický prudkým snížením NPQ a tedy rychlým „vypnutím“ fotoochranných mechanismů. V další části grafu (420-900s) se již chování buněk *N. oceanica* nijak výrazně neodlišuje od ostatních křivek. Dochází k pomalému navrácení NPQ zpět k nulové hodnotě. Důvodem, proč se NPQ nenavrátil zpět na opravdu nulovou hodnotu je pravděpodobně pouze krátký čas měřícího protokolu. Při delším měření by NPQ jistě kleslo až na nulu.

Zcela jiné chování než *N. oceanica* vykazuje rozsivka *Phaeodactylum tricornutum*, v grafu 4.1(1) představované oranžovou křivkou. Ze všech použitých organismů vykazuje *Phaeodactylum* nejrychlejší spuštění fotoochranných mechanismů - NPQ křivka bezprostředně po rozsvícení aktinického světa v čase 60s „vylétává“ do velmi vysokých hodnot. Poté hodnoty NPQ už stoupají pouze pomalu až do zhasnutí aktinického světla. V tomto bodě se křivka láme a NPQ začíná velice pomalu klesat. Vysoká hodnota NPQ ukazuje, že *Phaeodactylum* disponuje oproti ostatním druhům

velice účinnými fotochrannými mechanismy. Na druhou stranu je očividné, že tento druh rozsivky nedokáže úspěšně fotosyntetizovat za zvýšené intenzity světla a musí chránit svůj fotosyntetický aparát před poškozením vlivem nadměrném množství excitační energie ve světslosběrných systémech. Také z těchto získaných dat není zcela patrné, zda došlo k trvalé fotoinhibici, či nikoliv. Vzhledem k rozptylu naměřených dat je možné, že u některého z měřených vzorků skutečně k poškození reakčních center PSII došlo. Obecně však lze ustanovit spíše závěr podobný tomu u řas rodu *Nannochloropsis* - k trvalé fotoinhibici pravděpodobně nedošlo a při dostatečně dlouhé době relaxace by se hodnoty NPQ vrátily zpět k nule.

Třetím měřeným druhem byla *Chromera velia*, tedy mořský autotrof původem z Velké útesové bariéry. V grafu 4.1(1) znázorněn jako žlutá křivka. Pozornější pozorovatel si jistě v části grafu s aktinickým světlem povšimne nápadné podobnosti mezi NPQ křivkou *Chromery* a *Phaedodactyla*. Obě tyto křivky vykazují v prvních 60s po rozsvícení aktinického světla prudší nárůst NPQ, který se později zbrzdí a NPQ křivka se ztáčí do obloukovitého tvaru. Po vypnutí aktinického světla se hodnoty NPQ začínají snižovat a směřují lehce prohlou křivkou k nule. Obdobně jako u předchozích dvou druhů, ani u *Chromery* se NPQ nepropadne až na nulovou hodnotu. A stejně jako u předchozích měření, při delším měření relaxace buněk po aktinickém světle by se jistě k nule dostalo. Nelze tedy mluvit o příliš velké míře fotoinhibice a je dobře patrné, že druh *Chromera velia* je schopen provádět fotosyntézu i při intenzitě světla  $1000\mu\text{E}$ , i když je nucen aktivovat své fotochranné mechanismy.



Graf 4.1(1): Srovnání NPQ různých druhů řas pěstovaných na nízkém světle (LL) pro intenzitu aktinického světla  $1000\mu\text{E}$ . Pruh ve spodní části grafu ukazuje, kdy jsou buňky osvětleny. V šedých oblastech bylo svíceno pouze měřícím světlem, v bílé oblasti bylo zapnuto i aktinické světlo.

Poslední zbývající NPQ křivka v grafu 4.1(1), jež je značena zelenou barvou, patří kokolitce druhu *Emiliana huxleyi*. Již na prvním pohled jsou patrné velice nízké hodnoty NPQ po celou dobu měření. V porovnání s ostatními druhy, dosahuje *Emiliana* pouze zlomku hodnot NPQ. Tento fakt by se dal interpretovat jako schopnost *Emiliane* využít většinu přijaté excitační energie pro proces fotosyntézy. Fotoochrannými mechanismy by tedy byla odváděna pouze malá část přijaté excitační energie, a sice ta jež by přebývala. V druhé části grafu (360-900s) se sice NPQ nijak nesnižuje, což by mohlo poukazovat na fotoinhibici, ale tuto možnost lze vyloučit při nahlédnutí k již dříve zjištěným faktům - je známo, že *Emiliana huxleyi* disponuje silným xantofylovým cyklem. Ovšem po vypnutí aktického světla není schopna zpět epoxidovat daitoxanthin kvůli nedostatku NADPH (viz kap. 1.4.3). Hodnota NPQ se tedy nemůže snižovat. Obecně je také známo, že kokolítka *E. huxleyi* jsou adaptované pro růst na vyšších intenzitách světla, než oněch 15 $\mu$ E, při kterých byly pěstovány pro mé experimenty. V buňkách *E. huxleyi* tedy růstové světlo nevytvořilo adekvátní aklimaci, díky čemuž u nich nevznikla příliš silná odezva na aktinické světlo vysoké intenzity.

Chování jednotlivých druhů jsem již popsal a nyní tedy provedu krátké shrnutí výsledků. Jediným druhem pro který se ukázala intenzita aktinického světla 1000 $\mu$ E jako nebezpečně vysoká byla kokolítka *Emiliana huxleyi*, u níž došlo vlivem takto silného světla k trvalé fotoinhibici PSII. Všechny tři ostatní druhy „přežily“ osvětlení daným aktinickým světlem bez poškození fotosystémů. Druhy *Phaeodactylum tricorutum* a *Chromera velia* vykazovaly podobný tvar NPQ křivek, pouze hodnoty příslušící druhu *P. tricorutum* byla násobně vyšší než hodnoty změřené pro *C. velia*. Oba druhy bezprostředně po zapnutí aktinického světla rychle reagovaly nastartováním fotoochranných mechanismů. Tento prudký růst hodnot NPQ se však po prvních 60s aktinického světla začal značně zbrzdňovat. Nicméně až do vypnutí světla NPQ stále pomalu rostlo. Po zhasnutí aktinického světla začaly hodnoty NPQ u obou druhů pozvolna klesat k nule. Fotoochranné mechanismy se tedy u *C. velia* a *P. tricorutum* deaktivují postupně, pomalu a mají pravděpodobně obdobný mechanismus. A právě v tomto bodě spočívá hlavní rozdíl v chování jmenovaných dvou druhů od druhu *Nannochloropsis oceanica*. Buňky *N.oceanica* totiž nevykazují pomalý „ústup“ fotoochranných mechanismů, ale jak je z grafu dobře patrné, velice razantní a rychlé prvotní snížení hodnoty NPQ (čas 360-420s od počátku protokolu). Další odlišnost od výše zmíněné dvojice autotrofů lze nalézt v první části grafu. *Nannochloropsis oceanica* se na rozdíl od *Phaeodactyla* a *Chromery* nevyznačuje rychlým nástupem fotoochranných mechanismů, ale spíše lineárně rostoucí hodnotou NPQ. Z těchto dvou odlišností plyne důležitý závěr - buňky druhů *Phaeodactylum tricorutum* a *Chromera velia* disponují alespoň částečně jinými fotoochrannými mechanismy, než ty kterými jsou vybaveny buňky řas *Nannochloropsis oceanica*.

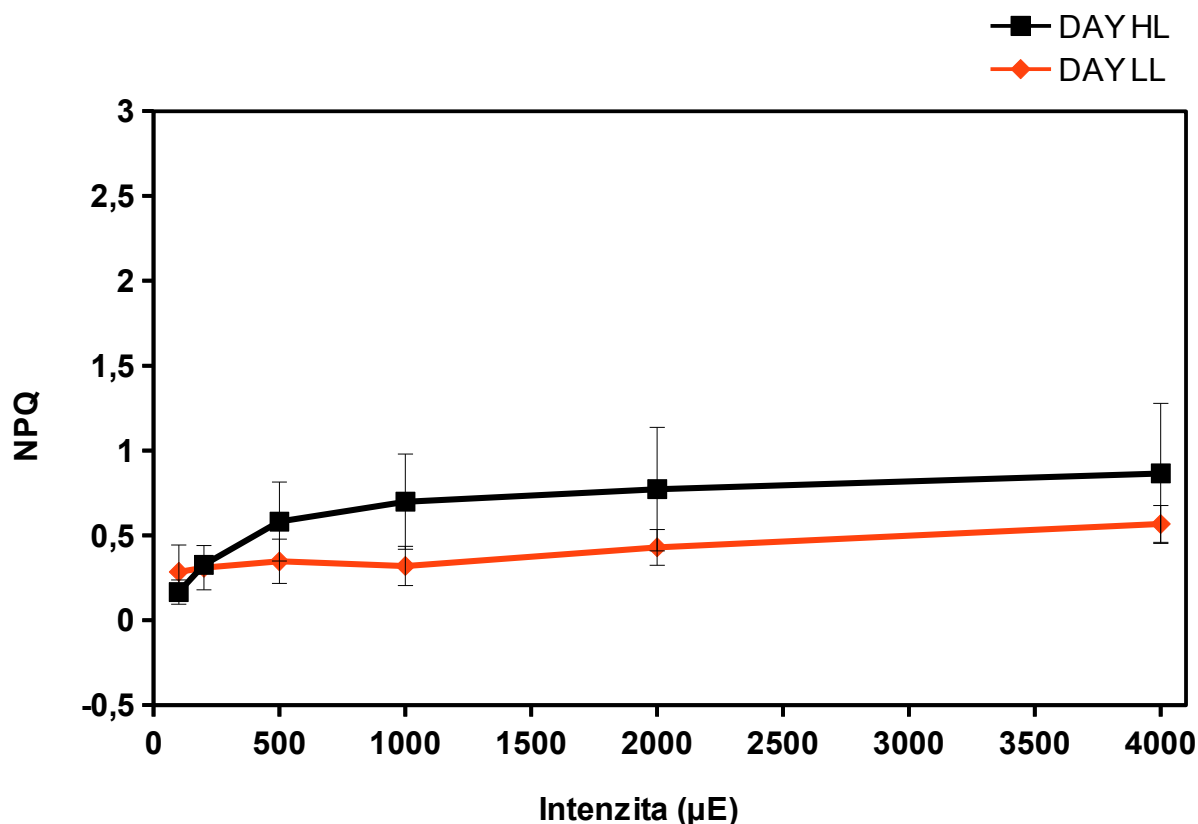
## 4.2 Porovnání NPQ křivek buněk pěstovaných na nízké a vysoké intenzitě světla

Výrazný faktor při růstu jakéhokoliv organismu tvoří jeho okolní prostředí. Abych zjistil vliv intenzity záření, použité při pěstování kultur, na účinnost fotoochranných mechanismů provedl jsem dvě různá sledování hodnot parametru NPQ na fotosyntetické eukaryotě ze skupiny SAR - *Nannochloropsis oceanica*. Při pěstování bylo využíváno dvou intenzit světla. Jedna sada buněk byla vystavena světlu o intenzitě 15 $\mu$ E, tyto buňky dále pod zkratkou LL (z angl. *low light*). Na druhou kulturu buněk působilo při pěstování světlo s intenzitou 300 $\mu$ E, dále pod označením HL (z angl. *high light*).

#### 4.2.1 Samostatné měření hodnot NPQ při spuštění aktinického světla a při jeho vypnutí

V první sadě měření jsem se zaměřil na hodnoty NPQ pouze ve dvou časech - 60s a 300s (počítáno od začátku osvětlení vzorku aktinickým světlem). Pro připomenutí uvádím, že dle protokolu měření v čase 60s došlo k ozáření vzorku saturačním světlem, přičemž vzorek byl již 60 sekund vystaven aktinickému světlu. Druhé měření (v čase 300s) dokumentuje hodnotu NPQ po 300 sekundách ozařování vzorku aktinickým světlem. Stejně jako v případě prvního měření i zde je vzorek ve chvíli sběru dat ozářen saturačním pulzem. Experiment byl prováděn pro šest rozdílných intenzit aktinického světla, přičemž pro každou intenzitu vždy třikrát opakovan a výsledný bod je průměrem všech tří měření. U každého bodu je vynesena také chybová úsečka znázorňující směrodatnou odchylku. Oproti datům v čase 300s se v 60s ve větší míře objevil rozptyl naměřených hodnot. Tento rozdíl je patrný zejména pro HL, nicméně lze ho v menším měřítku pozorovat i u LL buněk.

I přes značný rozptyl dat je z grafu 4.2.1(1) patrný výrazný rozdíl v trendu růstu naměřených hodnot NPQ, mezi HL a LL kulturami. Zatímco zaznamenané hodnoty NPQ dosažené po 60 sekundovém osvětlení aktinickým světlem pro LL s růstem intenzity aktinického světla nepatrně rostou (100 $\mu$ E - 0,285; 200 $\mu$ E - 0,309; 500 $\mu$ E - 0,422), což poukazuje na jistou „absenci“ fotoochranných mechanismů, jenž by byly schopny výrazně reagovat na přemíru světla již po 60 sekundách osvětlení. Naproti tomu data naměřená na HL buňkách zprvu ukazují rychlý nárůst NPQ a až při vysokých intenzitách aktinického světla se růst hodnot NPQ zastavuje - za 60s nejsou buňky schopny vytvořit vyšší NPQ, i přes stále se zvyšující intenzitu osvětlení.

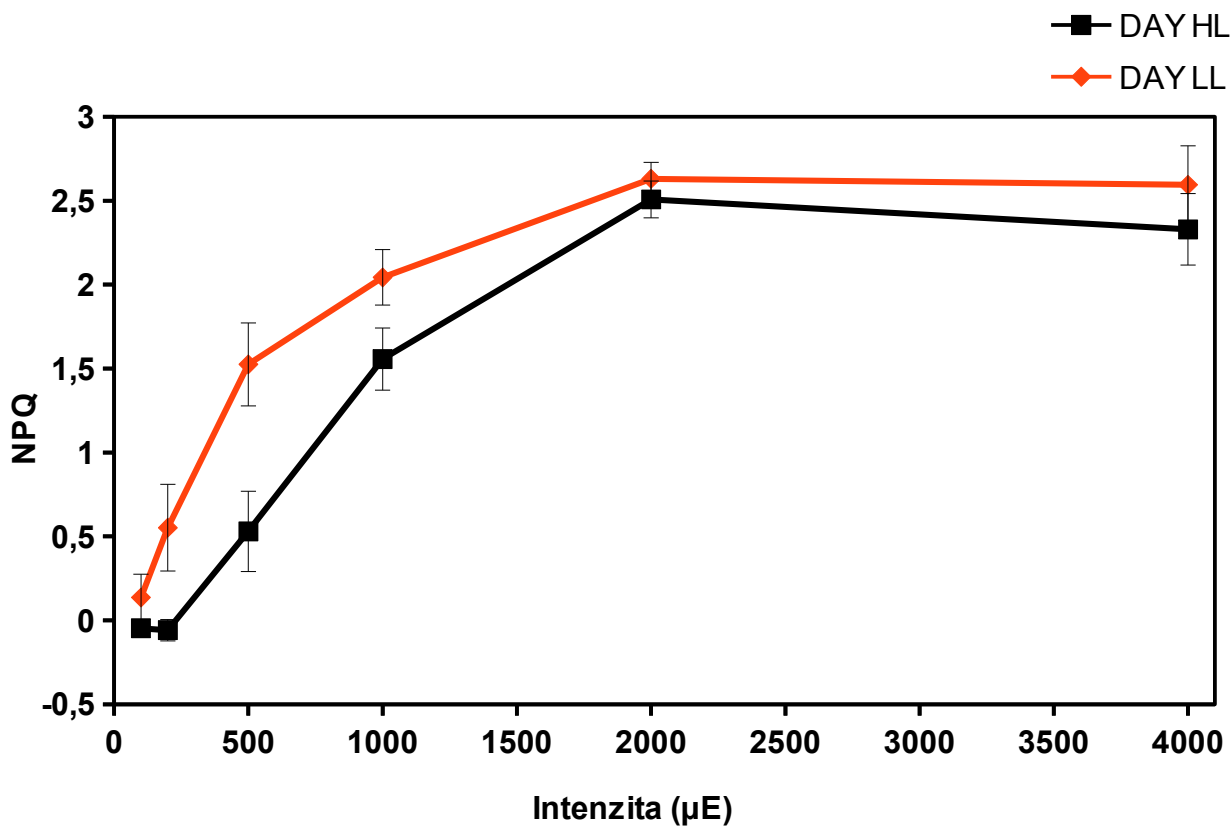


Graf 4.2.1(1): Srovnání hodnot NPQ pro *Nannochloropsis oceanica* LL a HL. Měřeno v čase 60s od počátku osvětlení, pro různé intenzity aktinického světla.



Vysvětlení rozložení naměřených hodnot NPQ pro LL je vcelku prosté. Již první použitá intenzita aktinického světla ( $100\mu\text{E}$ ) téměř sedmkrát přesahuje hodnotu  $15\mu\text{E}$ , při níž byly LL buňky kultivovány. Dochází tedy pravděpodobně k zahlcení světlosběrných antén přebytečnou energií, ovšem nepozorujeme žádný výrazný nárůst hodnot NPQ, z čehož vyplývá, že LL buňky nemají schopnost přizpůsobení se vyšším hodnotám ozáření (v prvních 60s od počátku osvětlení). Jejich fotoochranné mechanismy, jež by bránily poškození PSII přemírou excitační energie, nejsou dostatečně vyvinuty. Důvodem je právě nepotřeba chránit se proti nadměrnému ozáření při růstu buněk na nízkém světle. Naproti tomu buňky HL byly kultivovány na poměrně intenzivním světle ( $300\mu\text{E}$ ). Mají tedy přirozeně vyšší schopnost okamžité adaptace na intenzivní ozáření, což se projevuje výrazným růstem křivky vzniklé po spojení naměřených hodnot NPQ. Přesněji řečeno tvar paraboly si „křivka“ drží pouze do určité hodnoty aktinického světla. Po ozáření vzorku světlem silnějším než  $1000\mu\text{E}$  již ani HL buňky nejsou schopny výrazně zvyšovat účinnost svých fotoochranných mechanismů a i u nich dochází k saturaci.

Již při prvním pohledu je patrný zcela odlišný tvar grafu 4.2.1(1) oproti dalšímu grafu 4.2.1(2). Zatímco v prvním z uvedených se hodnota NPQ změřená pro LL buňky drží pod hodnotou příslušející HL, v níže uvedeném grafu je tomu právě naopak. Důvodem této odlišnosti jsou opět rozdílné intenzity světla použité při kultivaci buněk. Je důležité si uvědomit, že graf 4.2.1(2) se týká NPQ hodnot měřených po 300 sekund trvajícím aktinickém světle, tedy světle vhodném pro rozběhnutí fotosyntetických procesů. U LL se hodnota NPQ již od nižších intenzit aktinického světla drží poměrně vysoko, což naznačuje neschopnost LL buněk zvyšovat podíl přijaté excitační energie, která je posléze využita pro fotosyntézu. Důvod této neschopnosti je na snadě - LL buňky obsahují díky pěstování na slabém světle více světlosběrných antén než HL buňky. Díky tomu mají LL buňky za vysoké intenzity aktinického světla zahlceny fotosystémy excitační energií. Buňky z



Graf 4.2.1(2): Srovnání hodnot NPQ pro *N. oceanica* LL a HL. Měřeno v čase 300s od počátku osvětlení, pro různé intenzity aktinického světla.

nízkého světla jsou tedy nuceny aktivovat více zhášecích mechanismů než HL buňky. Také je vhodné poznamenat, že na rozdíl od předešlého experimentu, zde již LL buňky mají dostatek času (300s) na aktivaci více fotoochranných mechanismů.

Naproti tomu první dvě hodnoty NPQ pro HL buňky, které odpovídají intenzitám aktinického světla  $100\mu\text{E}$  a  $200\mu\text{E}$ , se téměř blíží nule. Což znamená, že v průběhu aktinického světla se v HL buňkách rozběhl proces fotosyntézy, který začal využívat téměř veškerou energii pohlcenou fotosběrnými systémy. Toto zjištění ovšem není nijak překvapivé, vezmeme-li v úvahu intenzitu světla na níž byly HL buňky pěstovány -  $300\mu\text{E}$ . Při zesílení aktinického světla na  $500\mu\text{E}$  již i u HL buněk vzrůstá hodnota NPQ, která značí aktivaci fotoochranných mechanismů. Při dalším zvýšení intenzity aktinického světla, tentokrát na  $1000\mu\text{E}$ , se již rozdíl mezi LL a HL buňkami začíná pomalu stírat a pro intenzity světla vyšší než  $1000\mu\text{E}$  jsou patrné již jen menší rozdíly, prakticky v rámci experimentální chyby. Ani HL buňky tedy nejsou za daných podmínek schopny účinně zpracovávat takto velké množství přijímané excitační energie pro procesy fotosyntézy, což může být zapříčiněno několika faktory. Jednou možností je dosažení biologického limitu *Nannochloropsis oceanica*. V tom případě by tento druh nebyl schopen vykazovat větší NPQ než 2,6 (s odchylkou měření 0,1). Další variantu představuje nedostatek času pro rozeběhnutí všech fotoochranných mechanismů, jimiž HL buňky disponují. A třetí možností vysvětlení zastavení růstu hodnot NPQ mezi intenzitami světla  $2000\mu\text{E}$  a  $4000\mu\text{E}$  je „prostá“ chyba měření - pro ověření by bylo potřebné provedení více měření. Při uvažování všech těchto tří možných variant bychom také měli brát na vědomí, že osvětlení  $4000\mu\text{E}$  se v přírodě běžně nevyskytuje a jedná se o extrémní, nefyziologickou intenzitu ozáření.

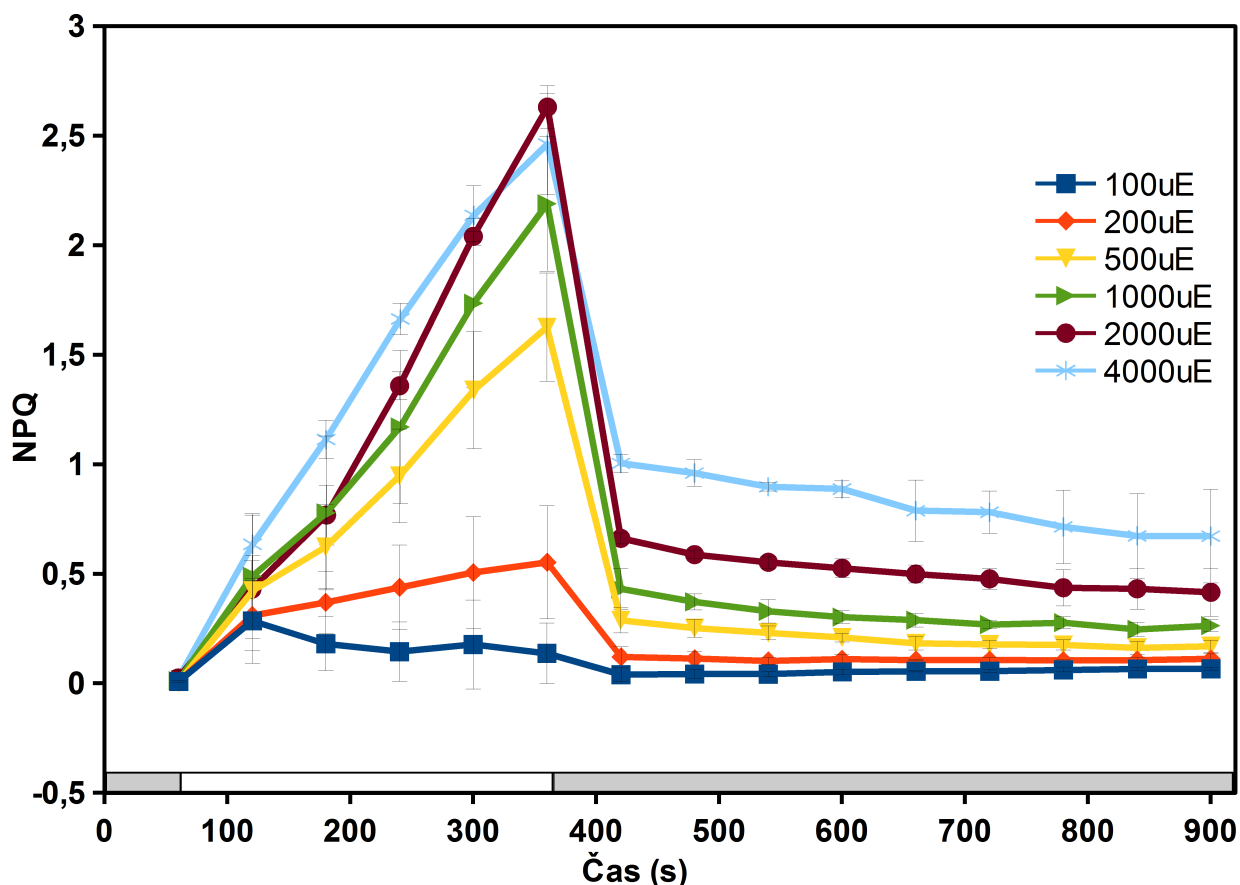
#### 4.2.2 Kontinuální měření hodnot NPQ

Na rozdíl od předchozího měření, kde byly hodnoty NPQ zaznamenávány pouze ve dvou časech, v následujícím měření jsem se zaměřil na trend vývoje NPQ v celém průběhu osvětlení. Data byla sbírána pravidelně každých 60 sekund, přičemž první měření bylo provedeno v čase 60 sekund od počátku protokolu, kdy bylo společně se saturačním pulzem zapnuto aktinické světlo. Poslední zaznamenaná hodnota je z času 900 sekund od počátku měření, tedy 9 minut po vypnutí aktinického světla. Čas je v grafech vynesena na vodorovné ose, zatímco svislá osa představuje hodnoty NPQ a různé intenzity aktinického světla jsou poté znázorněny odlišným typem a barvou čáry, která vždy představuje průměr tří měření opakovaných pro danou intenzitu. Chybové úsečky v grafech představují směrodatnou odchylku.

Nejprve věnujme pozornost datům naměřeným u LL buněk, tedy níže uvedenému grafu 4.2.2(1). Hned na první pohled je zde patrná odlišnost tvaru NPQ křivky pro intenzitu aktinického světla  $100\mu\text{E}$  a ostatní intenzity. Hodnoty NPQ pro aktinické světlo  $100\mu\text{E}$  dosahují vrcholu v čase 120s a posléze volně klesají až do vypnutí aktinického světla (v čase 360s). Tento pokles je pravděpodobně způsoben nastartováním fotochemických procesů, které začínají excitační energii přijatou světlosběrnými anténami využívat pro fotosyntézu, díky čemuž se snižuje riziko poškození PSII nadměrnou excitační energií ve světlosběrném komplexu. A buňky již nejsou nuceny odvádět přebytečnou energii skrze fotoochranné mechanismy - klesá hodnota NPQ. Naproti tomu, při intenzitě aktinického světla  $200\mu\text{E}$ , hodnota NPQ zvolna roste až do vypnutí aktinického světla v čase 360s. Toto chování ukazuje neschopnost fotosyntetických procesů uvnitř buněk zpracovat část přijaté excitační energie a buňka je nucena zbavovat se přebytečné energie jiným způsobem, například díky xantofylovému cyklu nebo jiným mechanismům NPQ.

Obdobný trend jako křivka pro intenzitu aktinického světla  $200\mu\text{E}$  vykazují i data sebraná při vyšších intenzitách. Se zvyšující se intenzitou ozáření se zvyšuje jednak maximální zjištěná hodnota NPQ a jednak strmost stoupání NPQ křivky. Nicméně pro intenzity aktinického světla  $500\mu\text{E}$ ,  $1000\mu\text{E}$  a  $2000\mu\text{E}$  je patrná ještě jedna odlišnost od dat naměřených při  $4000\mu\text{E}$ . Zprvu není rychlost aktivace fotoochranných mechanismů tak vysoká. Až v čase 180s je patrný zlom ve tvaru NPQ křivky, jenž představuje zvýšení odvodu energie skrze nefotochemické procesy. Což ovšem neplatí pro hodnoty NPQ při světle  $4000\mu\text{E}$ , které je pro LL buňky opravdovým extrémem. Stálý růst NPQ křivky bez „zlomu“ je zde jistě způsoben neschopností buněk odvádět přebytečnou excitační energii z antén fotosyntetickými procesy, které jsou přemírou energie zablokovány. Dalším nápadným rysem je maximální hodnota NPQ, která se zde pohybuje o něco níže než nejvyšší hodnota zjištěná při aktinickém světle  $2000\mu\text{E}$ , což poukazuje na možnost trvalé fotoinhibice, tedy poškození PSII vlivem nadměrného množství excitační energie.

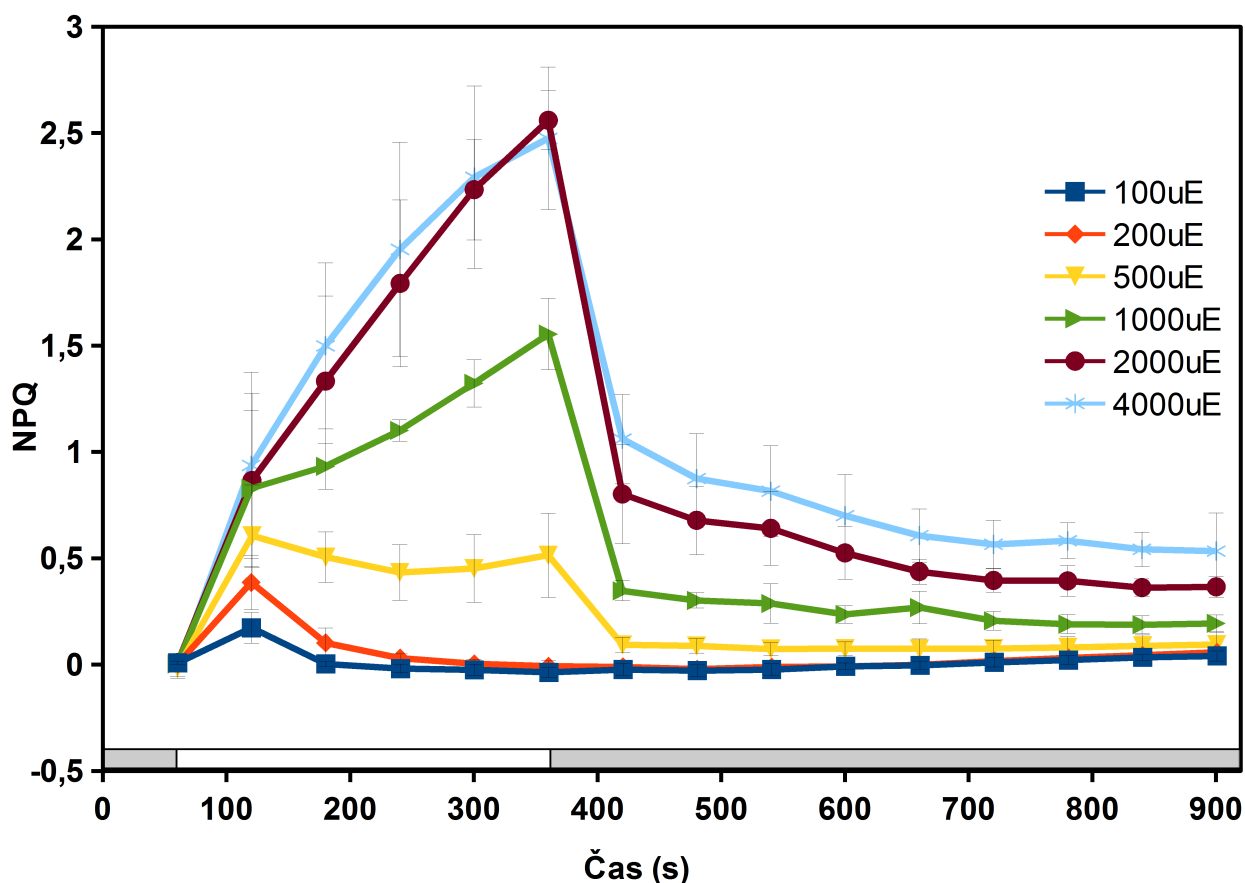
V „druhé“ části grafu 4.2.2(1), reprezentované časovým rozmezím 360s až 900s, je chování všech NPQ křivek velice podobné. Fotoochranné mechanismy v buňkách se deaktivují a NPQ se snižuje. Ačkoliv velká část NPQ se u většiny variant provedení experimentu snižuje velice rychle (pravděpodobně se jedná o „energetické zhášení“ fluorescence), mezi křivkami temnotní relaxace je přeci jen vidět rozdíl. Pro hodnoty aktinického světla  $100\mu\text{E}$ ,  $200\mu\text{E}$  a  $500\mu\text{E}$  dochází během 9 minut ke snížení NPQ až k nule, což vypovídá o nepoškozenosti fotosyntetického aparátu. Naproti tomu u ostatních intenzit aktinického světla je již patrná hodnota NPQ i na konci protokolu, která je způsobena trvalou fotoinhibicí některých PSII, nebo nedostatečnou délkou protokolu (při delším sledování by se hodnoty NPQ mohly k nule vrátit). U intenzity  $4000\mu\text{E}$  se bezprostředně po



Graf 4.2.2(1): Vývoj hodnot NPQ v čase a pro různé intenzity aktinického světla. Měřeno na *Nannochloropsis oceanica* LL (pěstován na světle  $15\mu\text{E}$ ). Pruh ve spodní části grafu ukazuje, kdy jsou buňky osvětleny. V šedých oblastech bylo svíceno pouze měřícím světlem, v bílé oblasti bylo zapnuto i aktinické světlo.

zhasnutí aktinického světla snižuje NPQ na zhruba 40% maximálního změřeného NPQ. Po devíti minutách temnotní relaxace se NPQ stále dosahuje relativně vysokých hodnot, což naznačuje, že mohlo dojít k trvalé fotoinhibici.

Nyní se přesunu k popisu grafu 4.2.2(2), jenž ukazuje průběh hodnot NPQ měřených na buňkách pěstovaných na vysokém světle ( $300\mu\text{E}$ ). Při aktinickém světle  $100\mu\text{E}$  a  $200\mu\text{E}$  (tedy intenzitách nižších, než byly růstové) je sice vidět reakce fotoochranných mechanismů na zvýšené množství dopadajícího světla, ale hodnoty NPQ se rychle vrací zpět k nule. Buňky tedy veškerou energii přijatou z fotonů využívají pro proces fotosyntézy, což se dalo vzhledem k intenzitě světla při pěstování předpokládat. Během 2 minut tedy došlo k rozeběhnutí kompletního procesu fotosyntézy. Trochu jinak celá situace vypadá při osvětlení  $500\mu\text{E}$ . Při detailním prozkoumání grafu je patrné drobné prohnutí NPQ křivky v časovém úseku od 120s do 360s, které lze interpretovat jako ustanovování rovnováhy mezi spotřebou energie fotochemickými procesy a jejím odvodem nefotochemickou cestou. Intenzita FAR  $500\mu\text{E}$  se tedy pohybuje na hraně intenzity ideální pro fotosyntézu HL buněk. Další měření v pořadí představuje aktinické světlo o hodnotě  $1000\mu\text{E}$ . Zde již není pochyb, že takto vysokou intenzitu světla nedokážou HL buňky plně využít pro fotosyntetické procesy. Lze tak usuzovat ze stoupajícího trendu NPQ křivky v časovém rozmezí 60s až 360s. Nicméně to neznamena, že by HL buňky vystavené světlu  $1000\mu\text{E}$  byly neschopné jakékoliv fotosyntézy. Při bližším pohledu lze opět objevit mírné prohnutí NPQ křivky, jež je způsobeno postupnou aktivací fotochemických cest odvodu energie. Zprvu fotosyntetický aparát zpracovává značnou část excitační energie. Postupem času se ovšem jednotlivé PSII zahlcují



Graf 4.2.2(2): Vývoj hodnot NPQ v čase a pro různé intenzity aktinického světla. Měřeno na *Nannochloropsis oceanica* HL (pěstován na světle  $300\mu\text{E}$ ). Pruh ve spodní části grafu ukazuje, kdy jsou buňky osvětleny. V šedých oblastech bylo svíceno pouze měřícím světlem, v bílé oblasti bylo zapnuto i aktinické světlo.

přemírou energie a ke slovu se dostávají nefotochemické procesy, jež ochraňují fotosystémy před poškozením.

Obdobná situace jako při intenzitě  $1000\mu\text{E}$  panuje i při  $2000\mu\text{E}$ . Jeden rozdíl však zde patrný je - křivka již postrádá jakýkoliv náznak prohnutí, což dává tušit zahlcení fotosystémů excitony a značná část energie je disipována díky nefotochemickým procesům. Obdobná situace panuje v případě osvětlení aktinickým světlem s intenzitou  $4000\mu\text{E}$ . Můžete si povšimnout, že prvotní reakce (tedy data v čase 120s) je jak pro  $2000\mu\text{E}$ , tak pro  $4000\mu\text{E}$  shodná. V obou situacích buňky aktivují fotoochranné mechanismy stejně rychle jako buňky osvětlené intenzitou světla  $1000\mu\text{E}$ . V dalším průběhu se sice obě křivky poněkud rozcházejí, ovšem při přihlédnutí k chybovým úsečkám netvoří tento „rozchod“ zásadní rozdíl. Poslední měření v průběhu aktinického světla (360s od počátku protokolu) společně s celkovým tvarem NPQ křivky při osvitu  $4000\mu\text{E}$  naznačuje, že mohlo dojít k trvalé fotoinhibici. Zároveň je z grafu dobře patrné, že NPQ křivky ještě nedosáhly svého maxima a při delším osvitu by hodnoty NPQ pravděpodobně dále stoupaly.

Nyní něco málo k temnotní relaxaci NPQ v grafu 4.2.2(2) od času 360s až do jeho konce v čase 900s. Pro aktinické světlo  $100\mu\text{E}$ ,  $200\mu\text{E}$  a  $500\mu\text{E}$  se hodnota NPQ bezprostředně po vypnutí aktinického světla razatně snižuje a posléze dosahuje nuly (ostatně měřené hodnoty NPQ se pohybovaly stále blízko nule). Z čehož je patrné, že fotosyntetický aparát neutrpěl žádné poškození vlivem nadměrné ozáření. Obdobný trend vykazují i data změřená při aktinickém světle  $1000\mu\text{E}$ . Výraznější hodnota NPQ se ke konci měření objevuje pouze u intenzit  $2000\mu\text{E}$  a  $4000\mu\text{E}$ , což je ale pravděpodobně způsobeno pouze příliš krátkou dobou měření. Po delší době by se i tyto hodnoty NPQ pravděpodobně srovnaly s nulou.

Na závěr kapitoly bych rád upozornil na jeden zajímavý fakt. Jak LL, tak HL buňky dosáhly prakticky shodné maximální hodnoty NPQ (zhruba 2,6). Tuto hodnotu NPQ lze tedy interpretovat jako limit biologického druhu za daných pěstebních podmínek (kultivační teplota, použité médium atd.). Obě kultury tedy dosáhly stejného maxima NPQ, ovšem každá jiným způsobem. Zatímco LL buňky vykazovaly lineární nárůst NPQ po celou dobu aktinického světla, u HL buněk se zpočátku objevil rychlý růst NPQ, který se však postupně zpomaloval. U obou kultur si však lze povšimnout, že nárůst NPQ do 60s od zapnutí aktinického světla byl vždy rychlejší než následný (po 60s aktinického světla). Z toho lze vyvodit, že toto prvotní zhášení není pravděpodobně způsobeno pomalými enzymatickými reakcemi, ale jde o tzv. „energetické“ zhášení.

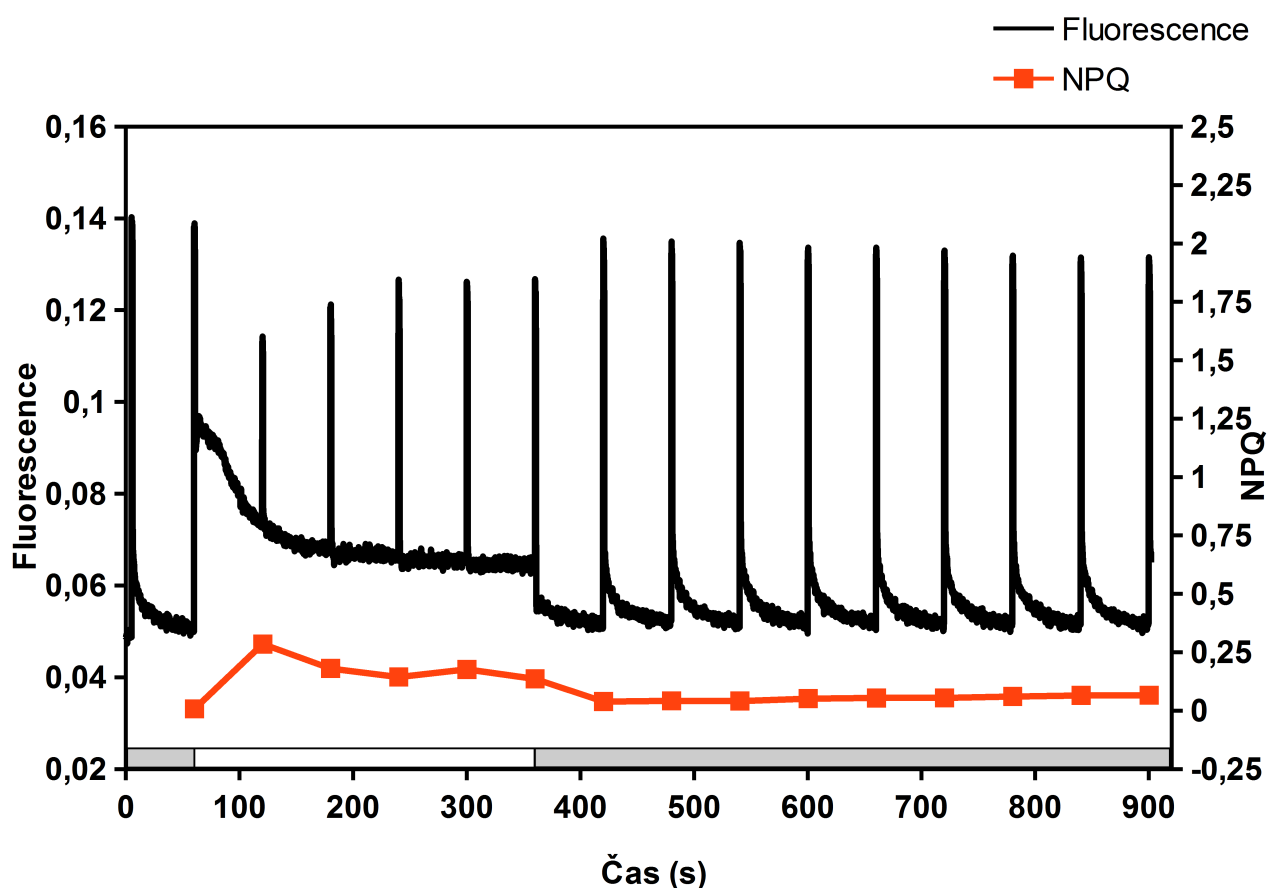
### 4.3 Vztah vývoje výtěžku fluorescence a NPQ

V předchozích grafech jsem se věnoval pouze sledování parametru NPQ, který vyjadřuje součet všech fotochranných mechanismů a vyzářeného tepla (viz kapitola 2.1). Sledování vývoje tohoto parametru poskytuje dobrou představu o procesech probíhajících uvnitř fotosyntetického aparátu, nicméně jisté domněnky nelze potvrdit pouze sledováním parametru NPQ. Z tohoto důvodu jsem se rozhodl do následujících grafů vynést naproti parametru NPQ i hodnotu samotné naměřené fluorescence, díky čemuž si lze udělat lepší představu o situaci panující v daném čase ve fotosyntetické membráně. Parametr NPQ již tedy není vyneseno na levé svislé ose jako u předchozích grafů, ale je přesunut na pravou svislou osu. Jeho místo na levé svislé ose zabral výtěžek fluorescence. Na vodorovné ose je pak zaznamenán čas od počátku měření.

Měření výtěžku fluorescence a zároveň výpočtu parametru NPQ jsem prováděl na buňkách eustigmatophytnej řasy *Nannochloropsis oceanica* (viz kapitola 3.1), která byla pěstována na slabém

světla (zkratka LL z angl. *low light*) o intenzitě  $15\mu\text{E}$ . Experiment byl prováděn při dvou intenzitách aktinického světla -  $100\mu\text{E}$  a  $1000\mu\text{E}$ . Pro obě tyto intenzity jsem měření třikrát opakoval a výsledná data zanesená v grafu představují průměr těchto tří měření. Při měření byl použit standardní protokol měření popsany v kapitole 2.3.

Jako první budu věnovat pozornost grafu s aktinickým světlem o intenzitě  $100\mu\text{E}$  (Graf 4.3(1)). Hned na počátku úvah o významu tohoto grafu je nutné si uvědomit, že intenzita aktinického světla  $100\mu\text{E}$  ač není nijak závratná, je přeci jen téměř sedmkrát větší než pěstovací intenzita LL buněk ( $15\mu\text{E}$ ). Dalo by se tedy očekávat, že LL buňky budou takto „silné“ světlo špatně snášet. Výsledky měření však poukazují spíše na opačný závěr. Nízké hodnoty NPQ naměřené po celou dobu zapnutí aktinického světla značí pouze částečnou aktivaci fotoochranných mechanismů. Excitační energie kumulující se ve fotosběrných systémech je tedy odváděna fotochemickou cestou - v buňkách probíhá proces fotosyntézy. O stejném závěru svědčí i záznam fluorescence. Z grafu je dobře patrné, že i v době ozáření vzorku aktinickým světlem (60 až 360s) dosahují saturační peaky hodnot přes 0,12 a variabilní fluorescence hodnot okolo 0,073 (pro přesnost uvádím, že  $F_{\text{max}} = 0,1403$  a  $F_{\text{min}} = 0,0473$ ), přičemž změřená hodnota maximální variabilní fluorescence ( $F_v = F_M - F_0$ ) byla 0,93. Jednoduchým počtem lze tedy dospět k závěru, že i v době ozáření buněk intenzitou  $100\mu\text{E}$  dosahovala variabilní fluorescence 80% maximální  $F_v$ , což dokazuje aktivaci pouze některých fotoochranných mechanismů a využití většiny excitační energie zachycené světlosběrnými systémy pro proces fotosyntézy.



Graf 4.3(1): Srovnání vývoje fluorescence a parametru NPQ u buněk *Nannochloropsis oceanica* DAY LL při ozáření aktinickým světlem  $100\mu\text{E}$ . Pruh ve spodní části grafu ukazuje, kdy jsou buňky osvíceny. V šedých oblastech bylo svíceno pouze měřicím světlem, v bílé oblasti bylo zapnuto i aktinické světlo.

Hlavní informace z grafu představují zvýšené hodnoty NPQ v čase 120s (60s od rozsvícení aktinického světla), jež poté rychle klesá a v čase 180s je již téměř na hodnotě, která se udržuje po zbytek aktinického světla. Tento malý „výmol“ v NPQ křivce představuje dobu potřebnou ke zpuštění všech fotosyntetických procesů. Na začátku měření jsou buňky adaptovány na tmu a proto je pochopitelné, že bezprostředně po náhlém ozáření aktinickým světlem se ihned neaktivují veškeré fotochemické procesy. Aktivace některých z nich vyžaduje určitý časový úsek, který lze díky změně výtěžku fluorescence a hodnot NPQ velice přibližně určit na dvě minuty. Po této době je v chloroplastech ustanovena rovnováha mezi fotochemickou cestou odvodu excitační energie a nefotochemickými mechanismy.

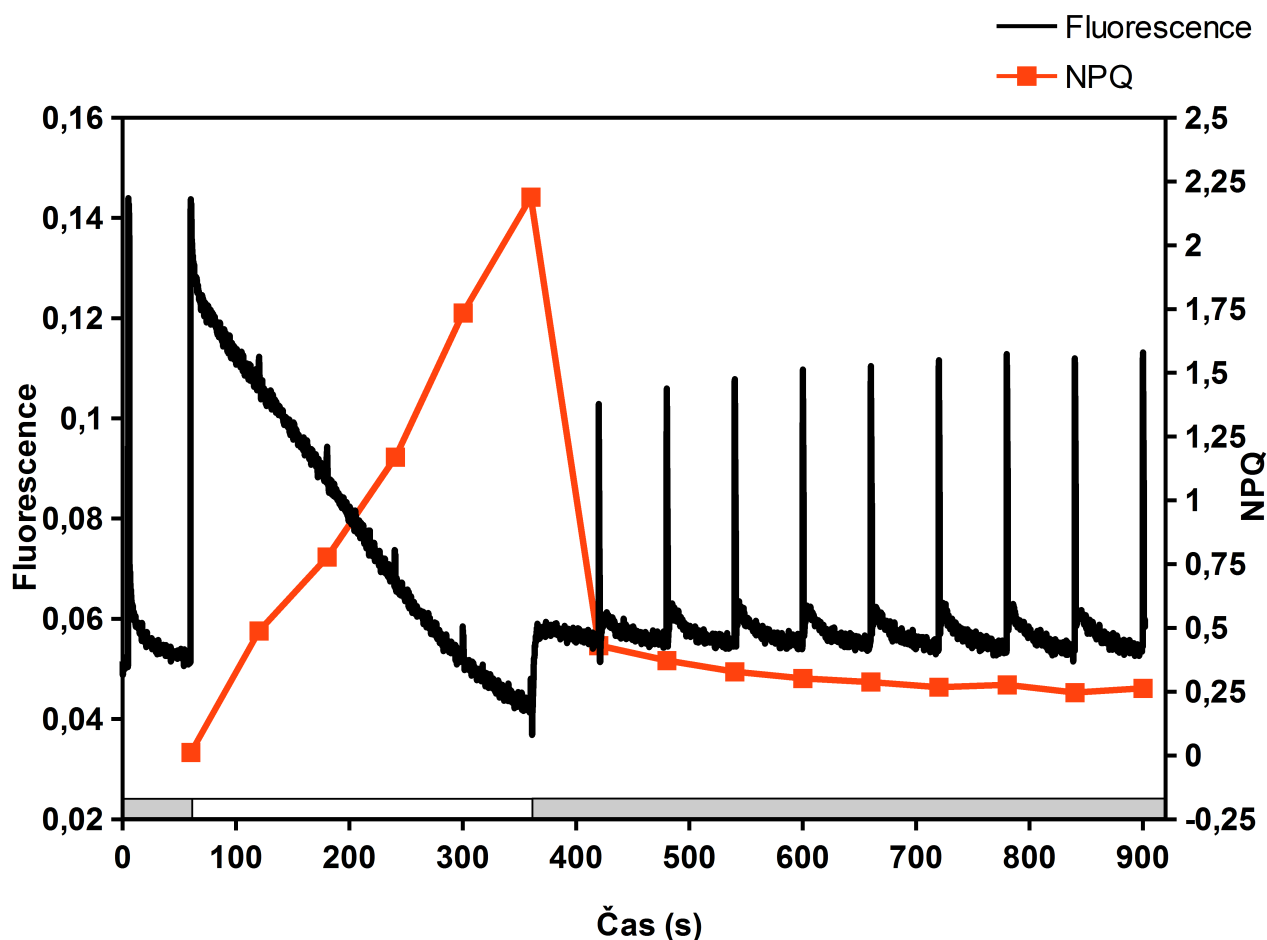
V části grafu znázorňující situaci po vypnutí aktinického světla (360 až 900s) je dobře patrné navrácení hodnot NPQ zpět k nule a výtěžku fluorescence k hodnotě  $F_0$  změřené na počátku experimentu. Návrat obou těchto parametrů ke svým počátečním hodnotám poukazuje na nepoškozenost fotosyntetického aparátu. Také ukazuje nepřítomnost trvalé fotoinhibice zapříčiněné působením aktinického světla o intenzitě  $100\mu\text{E}$ . Navzdory možným očekáváním je patrné, že pro LL buňky nepředstavuje světlo o sedminásobku pěstovací intenzity problém a jsou schopny úspěšně provádět fotosyntézu bez rizika poškození fotosyntetického aparátu vlivem nadměrného množství excitační energie pohlcené světlosběrnými systémy spřaženými s reakčním centrem PSII.

Nyní se přesunu k druhému grafu (Graf 4.3(2)), který zachycuje chování LL buněk při aktinickém světle o intenzitě  $1000\mu\text{E}$ . Již při prvním pohledu jsou patrné rozdíly mezi tímto a předchozím grafem (Graf 4.3(1)). Nejvýraznějším z těchto rozdílů je bezesporu chování NPQ křivky a hodnot výtěžku fluorescence v části grafu s aktinickým světlem (60 až 360s). Zatímco v předešlém grafu 4.3(1) si jsou tvary fluorescenční a NPQ křivky podobné, v grafu 4.3(2) by se dal vztah těchto dvou křivek jednoduše vyjádřit jako nepřímá úměra. Se zvyšující se hodnotou NPQ klesá výtěžek fluorescence - fotoochranné mechanismy odvádí přebytečnou excitační energii ze světlosběrných systémů, díky čemuž se snižuje výtěžek fluorescence.

Na grafu je nápadný také velmi vysoký výtěžek fluorescence bezprostředně po zapnutí aktinického světla, který naznačuje, že došlo k saturaci velkého procenta fotosystémů II. To není překvapivé zjištění, pokud vezmeme v úvahu předešlé zatemnění vzorku a pěstovací intenzitu pro LL buňky -  $15\mu\text{E}$ . Obdobné zvýšení fluorescence, i když v mnohem menším měřítku, si je možné povšimnout i na předešlém grafu s aktinickým světlem  $100\mu\text{E}$  (viz popis výše). Najde se zde však jeden podstatný rozdíl. V předcházejícím grafu se po zhruba 120s aktinického světla ustanoví rovnováha mezi fotochemickou a nefotochemickou cestou odvodu excitační energie a pokles výtěžku fluorescence se zastaví. U grafu 4.3(2) tomu ovšem tak není. Výtěžek fluorescence klesá po celou dobu zapnutí aktinického světla. V čase, přibližně určeném na, 280s od počátku protokolu výtěžek fluorescence dokonce klesá pod změřenou hodnotu  $F_0$ , která by měla představovat minimální fluorescenci způsobovanou měřícím světlem. Je tedy vidět, jak účinné jsou fotoochranné mechanismy uvnitř buněk. Naproti klesající fluorescenci se vzhůru „šplhají“ hodnoty parametru NPQ. Vzhledem k velice vysokým hodnotám NPQ a téměř dokonalé nepřímé úměře panující mezi fluorescenční a NPQ křivkou je patrné, že došlo k výrazné aktivaci fotoochranných procesů a energie zachycená světlosběrnými systémy byla ve velké míře odváděna nefotochemickou cestou.

V druhé části grafu, kterou rozumím časové rozmezí 360-900s od počátku protokolu, je situace již obdobná jako v předchozím grafu 4.3(1). NPQ křivka pozvolna klesá k nule. Hodnoty fluorescence jsou konstantní a odpovídají hodnotám z předešlého grafu. Toto tvrzení ovšem není zcela pravdivé. Hodnoty fluorescence mezi grafy si odpovídají jenom v časech mezi saturačními pulzy, v jejich průběh se hodnoty fluorescence liší. Při nižším aktinickém světle ( $100\mu\text{E}$ ) se vrcholy saturačních peaků blížily k přibližné hodnotě 0,135, kdežto nyní při  $1000\mu\text{E}$  dosahují pouze lehce

nad hranici 0,11. Analogicky hodnoty NPQ neklesnou zpět zcela k nule. Čím je způsoben tento rozdíl? Nabízí se odpověď svalující „vinu“ za snížení saturačních peaků na fotoochranné mechanismy, jenž jsou i po vypnutí aktinického světla stále částečně aktivní. Na druhou stranu, pokud by byl úbytek fluorescence způsoben odvodem excitační energie fotoochrannými mechanismy, měla by se tato skutečnost pravděpodobně projevit zvyšováním saturačních peaků s tím, jak jsou tyto mechanismy postupně deaktivovány. Takové chování však fluorescence v grafu nevykazuje. Přichází tedy na scénu druhá možnost - fotoinhibice. Ta by uspokojivě vysvětlovala, proč se hodnota saturačních peaků po vypnutí světla nijak výrazně nezvedá s ohledem na klesání NPQ a také by odpovídala konstantní hodnotě fluorescence mezi saturačními peaky, jenž je stejná jako v měření pro aktinické světlo 100 $\mu$ E. Pro možnost fotoinhibice také nahrává intenzita aktinického světla, tedy 1000 $\mu$ E, která je téměř 67x vyšší než pěstovací intenzita 15 $\mu$ E. Při uvážení tohoto faktu by nebylo překvapivé, že u LL buněk došlo k fotoinhibici.



Graf 4.3(2): Srovnání vývoje fluorescence a parametru NPQ u buněk *Nannochloropsis oceanica* DAY LL při ozáření aktinickým světlem 1000 $\mu$ E. Pruh ve spodní části grafu ukazuje, kdy jsou buňky osvětleny. V šedých oblastech bylo svíceno pouze měřícím světlem, v bílé oblasti bylo zapnuto i aktinické světlo.

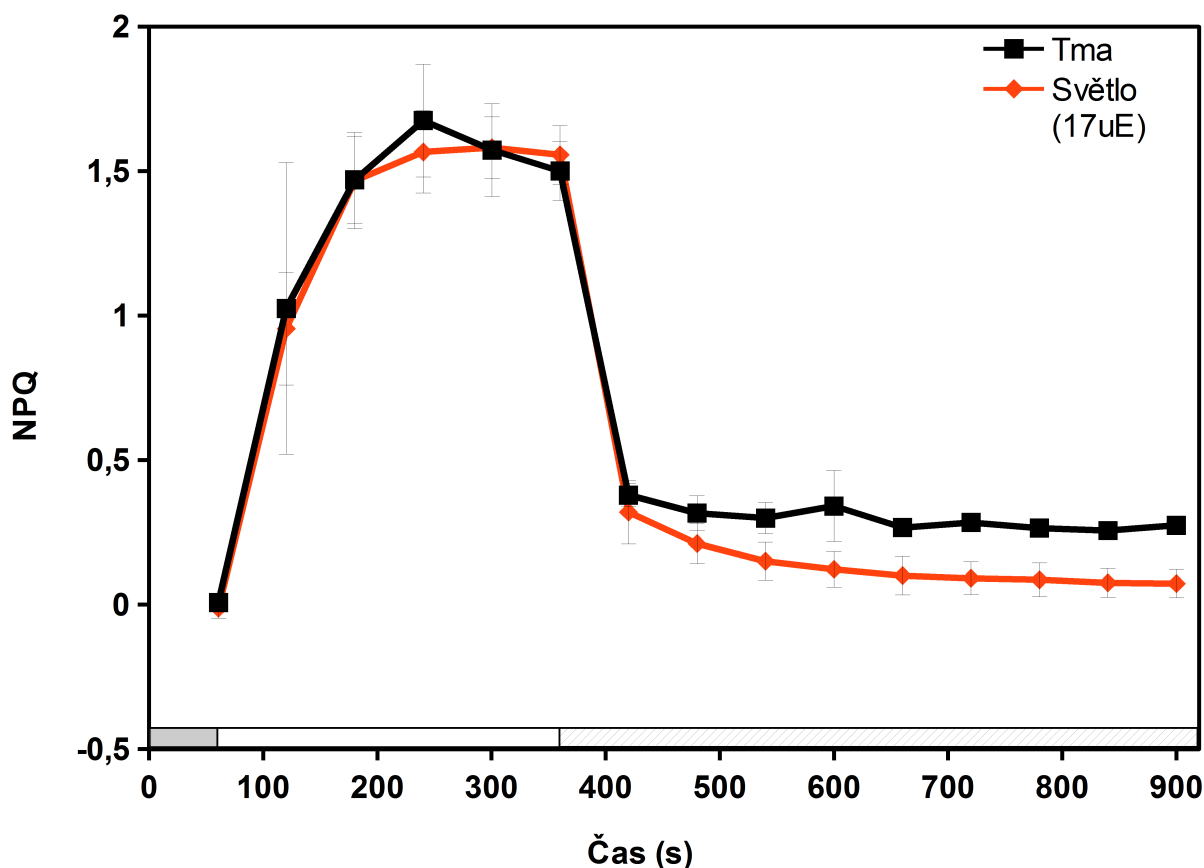
#### 4.4 Vliv slabého světla na relaxaci zhášení buněk *N. oceanica*

V této kapitole se nebudu držet dříve daného pořádku - vynechám popis tvaru NPQ křivek v průběhu osvětlení aktinickým světlem, které jsem již popsal v přechodím textu (viz. kapitola 4.3,



popis grafu 4.3(2)). Přejdu rovnou k popisu časového úseku 360-900s (od počátku protokolu). A podívám se na srovnání chování buněk vystavených při relaxaci (tzn. v temnostní fázi po aktinickém světle) vlivu slabého světla ( $17\mu\text{E}$ ) a buněk ponechaných ve tmě, tak jak tomu bylo u všech předchozích experimentů. Dále by se slušilo říci, že křivky NPQ obou typů vzorků jsou v první části grafu (do 360s po začátku měření) srovnatelné s přihlédnutím k chybovým úsečkám. Zpět ale k této kapitole. Pro měření jsem vybral buňky *Nannochloropsis oceanica* DAYHL a intenzitu aktinického světla  $1000\mu\text{E}$ . Pro obě varianty experimentu (se slabým světlem a bez něho) jsem provedly vždy tři měření, která jsem poté zprůměroval a hodnoty vynesl do níže uvedeného grafu 4.4(1). Chybové úsečky poté představují směrodatnou odchylku.

Teď již k samotnému popisu části grafu 4.4(1) od 360-900s od počátku měření. Křivka kontrolního experimentu (bez slabého světla, v grafu znázorněna černě) po zhasnutí aktinického světla prudce spadne o přibližně 74% a dále již výrazně neklesá. Křivka NPQ buněk vystavených během temnostní relaxace slabému světlu (v grafu značena oranžově) se značně odlišuje. Již na prvním měřeném bodě (420s) je vidět drobný rozdíl mezi NPQ křivkou pro buňky bez slabého světla (v grafu značena černě) a se slabým světlem o intenzitě  $17\mu\text{E}$  (v grafu značeno oranžovou barvou). Nicméně je pravdou, že tato data jsou od sebe vzdálena v rámci experimentální chyby a v tomto bodě tedy nelze ještě vyvozovat žádné směrodatné závěry. Obdobná situace panuje i v čase 480s, kdy již jsou od sebe obě křivky vzdáleny více, ale stále platí, že při přihlédnutí k chybovým úsečkám by se teoreticky mohly překrývat. Konečně od třetí dvojice hodnot sebrané po vypnutí aktinického světla (v čase 540s po začátku protokolu) je již jasně vidět průběh oranžové křivky



Graf 4.4(1): Srovnání NPQ křivky pro buňky *Nannochloropsis oceanica* DAYHL bez a ze slabým ozářením ( $17\mu\text{E}$ ) při relaxaci, pro aktinické světlo  $1000\mu\text{E}$ . Pruh ve spodí části grafu ukazuje, kdy byly buňky osvětleny. V šedé oblasti bylo svíceno pouze měřícím světlem, v bílé oblasti bylo zapnuto i aktinické světlo. Ve šrafovaném úseku byla jedna sada buněk zatemněna (černá křivka) a druhá vystavena slabému světlu ( $17\mu\text{E}$ ).

(slabě osvětlené buňky) pod průběhem černé (neosvětlené buňky). S postupem času je také patrné prohlubování rozdílu hodnot NPQ mezi těmito dvěma křivkami. Zatímco neosvětlené buňky vykazují velice pomalé klesání NPQ, hodnoty NPQ změřené u slabě osvětlených buněk vykazují jednoznačnou klesající tendenci. Po devíti minutách slabého osvětlení klesá NPQ na velmi nízkou hodnotu (zhruba 3% maximálního změřeného NPQ), přičemž buňky z kontrolního experimentu stále vykazují 17% maximálního změřeného NPQ. Tento rozdíl mezi buňkami bez a se slabým světlem tedy ukazuje, že nepoklesnutí NPQ na nulu u kontrolního vzorku není způsobeno trvalou fotoinhibicí a je možné NPQ téměř zcela vrátit zpět. „Zodpovědnost“ za tento jev nese tedy nějaký fotochranný mechanismus, jenž se aktivoval v době osvětlení vzorku aktinickým světlem a jehož deaktivaci pomáhá mírné ozáření vzorku. Tomuto popisu přesně odpovídá xantofylový cyklus (viz. kapitola 1.4.1). Podobný jev, který jsem popsal zde, byl již dříve zmapován u rozsivky *Phaeodactylum tricornutum* a byl přisouzen tomu, že buňkám ponechaným v naprosté tmě brzy dojde NAPH<sup>+</sup>, které je potřebné pro funkci zpětné reakce xantofylového cyklu. Naproti tomu u buňek ozářených slabým světlem dochází k mírné fotosyntetické aktivitě, jež je dostačující k syntéze potřebného množství NADPH. [Grouneva et al.; 2009]

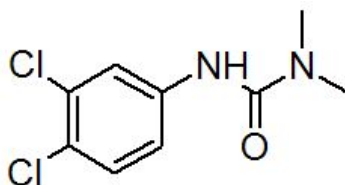
Na závěr dodám, že jak jsem již zmínil na počátku této kapitoly, všechna měření jsem prováděl na buňkách pocházejících z jednoho konkrétního odběru z pěstované kultury a všechna měření jsem stihl v jeden den. Díky tomu lze tvrdit, že buňky používané v obou typech experimentu jsou naprosto shodné. Samozřejmě vyjma mírného zkreslení dat vlivem denního cyklu buněk, které jsem ovšem eliminoval díky rozvržení doby měření různých vzorků (vždy nejprve jeden vzorek bez slabého světla a poté jeden se slabým světlem) a díky konečnému zprůměrování zjištěných hodnot. Fakta zjištěná pro buňky s mírným světlem by tedy měla platit pro druh *N. oceanica* obecně. Ovšem pro definitivní potvrzení této teze, že „pomalá“ část NPQ pozorované u *N. oceanica* je způsobena xantofylovým cyklem, by bylo nutné provést experimenty s vyhodnocením zastoupení jednotlivých karotenoidů. To by ovšem značně přesahovalo rámec této mé práce. Závěrem této kapitoly je tedy hypotéza, že u HL buněk *N. oceanica* se při aktinickém světle 1000 $\mu$ E fotoinhibice téměř nevyskytuje a NPQ u tohoto druhu řas tvoří nejméně dvě složky - rychlé „energetické“ zhášení a pomalé zhášení způsobené pravděpodobně xantofylovým cyklem.

#### 4.5 Měření s přidaným inhibitorem DCMU

Dostávám se k poslednímu experimentu, jež má práce obsahuje. Jedná se o srovnání dvou typů měření buněk *Nannochloropsis oceanica* DAYHL při aktinickém světle 1000 $\mu$ E. První skupina vzorků byla měřena standardně, bez jakékoliv změny, ovšem do druhého typu vzorků jsem aplikoval inhibitor DCMU a to na konci fáze zatemnění, těsně před začátkem osvětlení aktinickým světlem (cca 45s po začátku protokolu). DCMU jsem přidával tak, aby výsledná koncentrace v kyvetě byla cca 250 $\mu$ M. Pro první typ experimentu, tedy vzorky bez DCMU, jsem provedl celkem tři měření a výsledná data v grafu představují průměr těchto tří měření. Druhý typ vzorku, s přidaným inhibitorem DCMU, jsem však měřil pouze jednou. Oba typy experimentu jsem měřil podle standardního měřicího protokolu popsaného v kapitole 2.4.

Dříve, než se vrhnu na popis a výklad významu obou dále uvedených grafů, měl bych objasnit, co že je to DCMU vlastně zač. Pod zkratkou DCMU se ukrývá sloučenina 3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylkarbonyldiamid (viz Obrázek 4.5(1)). Za běžných podmínek se jedná o bílou krystalickou látku, jež je schopna rozpouštět se ve vybraných organických rozpouštědlech. V současné době nachází DCMU své uplatnění v zemědělství, kde je využíváno jako neselektivní herbicid, jenž je rostlinami vstřebáván skrze kořenový systém. Princip jeho působení na rostliny spočívá v inhibici

Hillovy reakce, tedy štěpení vody při fotosyntéze. Jak je popsáno v kapitole 1.3.2, zdrojem elektronů potřebných k přenášení energie při fotochemických procesech je právě oxidace vody, čili Hillova reakce. Právě tu ovšem DCMU blokuje, díky čemuž není dostatek volných elektronů, které



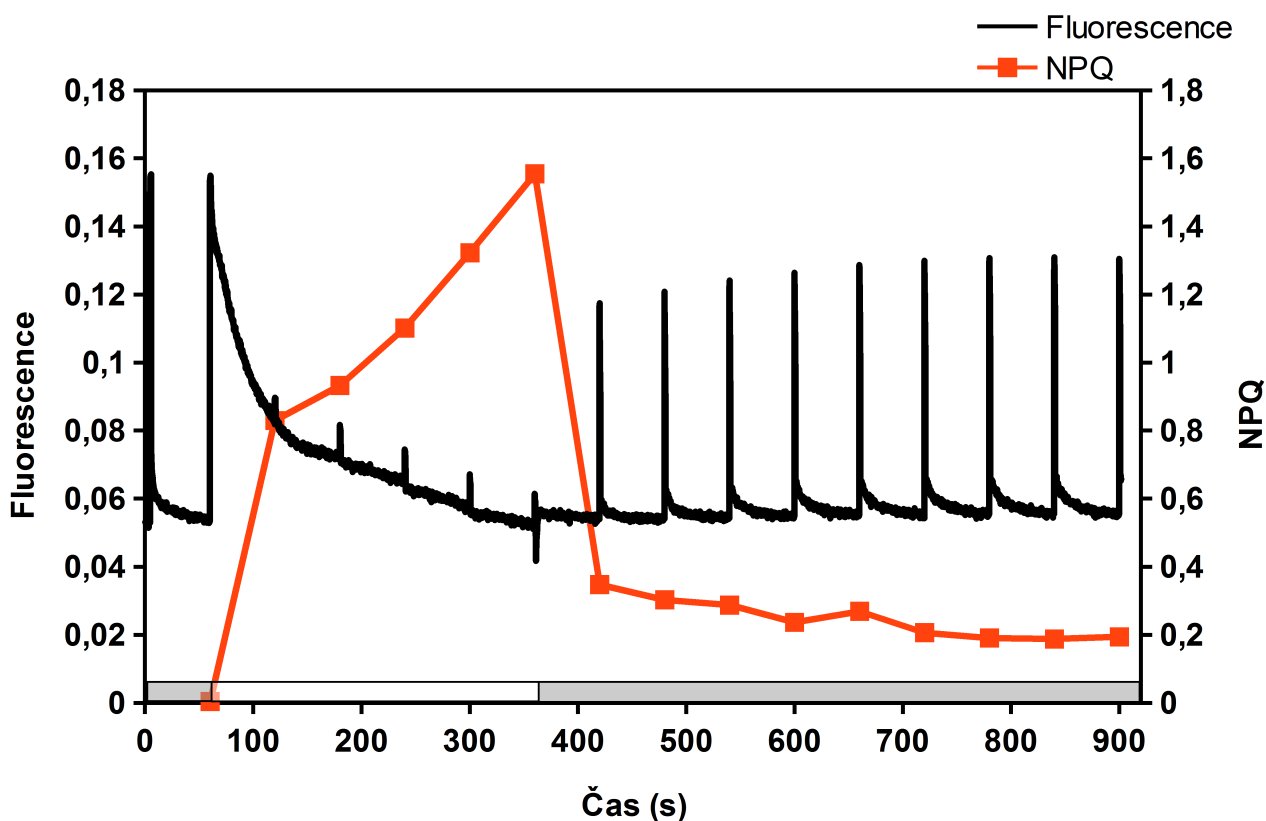
Obrázek 4.5(1): Chemická struktura inhibitoru DCMU.

by mohl fotosyntetický aparát využít a proces fotosyntézy sezastavuje. Kromě inhibice Hillovy reakce se DCMU také váže přímo na  $Q_B$  kapsu fotosystému II a brání zde přenosu elektronů, čímž ještě více znemožňuje průběh fotochemických procesů. [Integrovaný registr znečišťování; Ministerstvo životního prostředí České republiky; sekce Infromace o látkách ohlašovaných do IRZ - seznam látek]

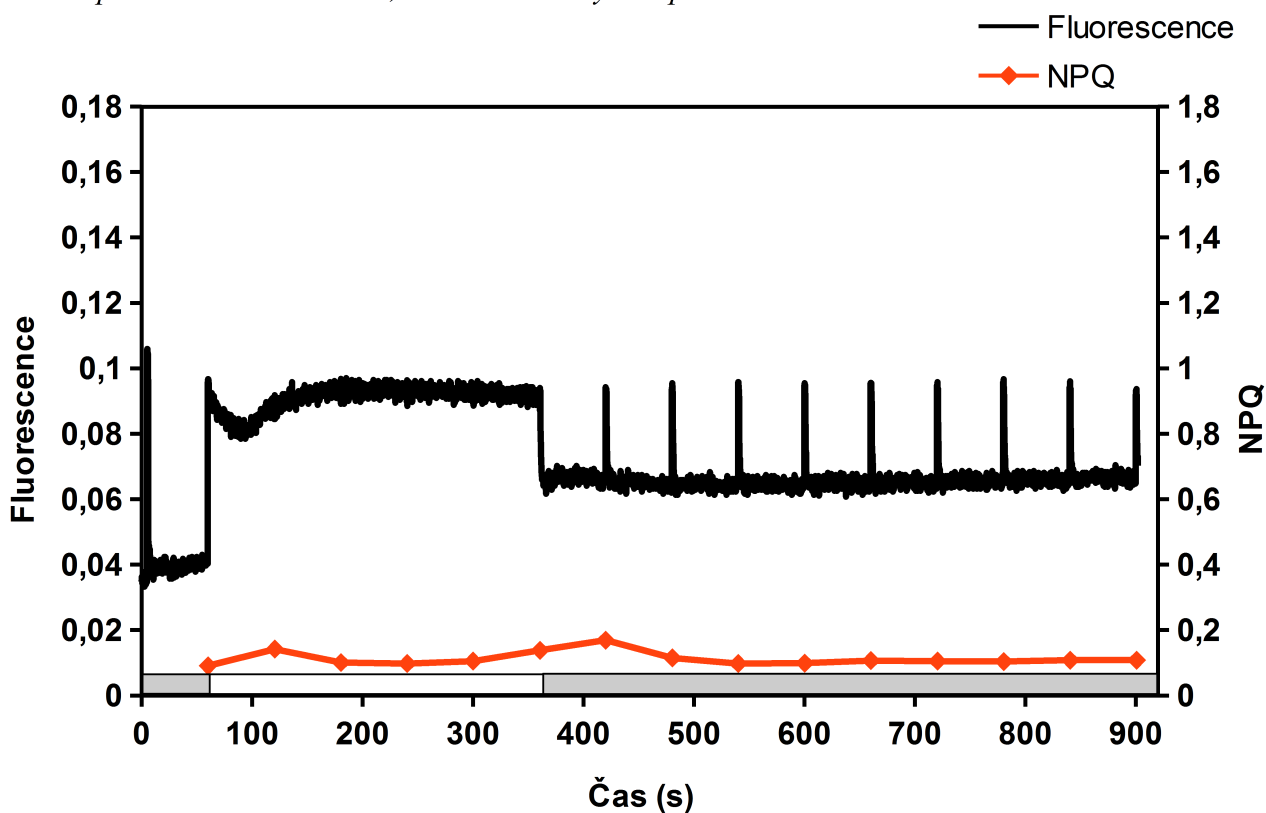
Inhibitor DCMU však ještě na chvíli „odložím stranou“ a začnu popisem grafu 4.5(2), tedy vzorku buněk bez přidaného DCMU. Bezprotředně po rozsvícení aktinického světla (60-120s od začátku protokolu) je vidět rychlý nárůst hodnoty NPQ, „proti“ němuž se zároveň rychle snižuje výtěžek fluorescence. Posléze se růst NPQ i snižování fluorescence značně zpomalí, ovšem pokračují až do konce aktinického světla. V intervalu 360-420s, tedy po zhasnutí aktinického světla, spadává hodnota NPQ prudce dolů, poté hodnota NPQ pomalu klesá až do konce protokolu. Dále se již nebudu rozbořem grafu 4.5(2) zabývat, protože obdobný graf (pouze s LL buňkami namísto HL) je popsán v kapitole 4.3 (viz graf 4.3(2)).

Nyní upřu svou pozornost ke kýženému grafu 4.5(3), který zobrazuje situaci po přidání DCMU. Již z letmého pohledu je vidět, že grafy 4.5(2) a 4.5(3) jsou naprosto rozdílné. V průběhu aktinického světla v grafu 4.5(3) výtěžek fluorescence nejprve v 60-120s mírně klesne, ovšem poté se opět zvýší a ustálí se těsně pod hodnotou 0,1. Této hodnoty pak také dosahují i všechny saturační peaky v časovém rozmezí 360-900s. V tomto ohledu se oba dva grafy také liší. Nemluvě o značném rozdílu dosahovaných hodnot variabilní fluorescence, v grafu 4.5(2) je patrné drobné zvedání saturačních peaků v době temnostní relaxace, v druhém grafu 4.5(3) si ovšem udržují konstantní výšku. Markantní rozdíly však nepanují jen u výtěžku fluorescence, ale i u parametru NPQ. Zatímco u kontrolního vzorku hodnota NPQ v průběhu aktinického světla roste a po zhasnutí opět klesá, vzorek s přidaným DCMU tuto charakteristiku téměř nevykazuje, patrné je pouze velmi drobné zvýšení hodnot NPQ v průběhu aktinického světla. Ostatně po celou dobu trvání protokolu se NPQ buněk ošetřených DCMU drží na zlomku hodnot zjištěných u zdravých, neovlivněných buněk.

Po porovnání obou grafů (4.5(2) a 4.5(3)) jistě není pochyb o vlivu inhibitoru DCMU na buňky řasy druhu *Nannochloropsis oceanica*. Zablokování PSII znemožní vytvoření gradientu protonů na thylakoidní membráně a tedy i nefukčnost většiny fotoohranných mechanismů a neschopnost buněk fotosyntetizovat. Toto vše dokazuje „úspěšné“ působení inhibitoru DCMU, který zabránil přenosu energie mezi jednotlivými fotochemickými procesy a zároveň i jejímu odvodu pomocí většiny fotoohranných mechanismů. Experiment ukazuje, že většina naměřené fluorescence a jejích změn je tvořena a řízena funkcí PSII. V praxi se pak používají i jiné inhibitory, které např. odstraní protonový gradient nebo zablokují funkci violaxanthin deepoxidázy. S jejich pomocí by bylo možné přesněji popsat, jak fotoohranné mechanismy fungují.



Graf 4.5(2): Vývoj fluorescence a NPQ u buněk *Nannochloropsis oceanica* při aktinickém světle  $1000\mu E$ . Pruh ve spodní části grafu ukazuje, kdy jsou buňky osvětleny. V šedých oblastech bylo svíceno pouze měřicím světlem, v bílé oblasti bylo zapnuto i aktinické světlo.



Graf 4.5(3): Vývoj fluorescence a NPQ u buněk *Nannochloropsis oceanica* s přidáním inhibitory DCMU do vzorku (ve 45s měření). Pruh ve spodní části grafu ukazuje, kdy jsou buňky osvětleny. V šedých oblastech bylo svíceno pouze měřicím světlem, v bílé oblasti bylo zapnuto i aktinické světlo.

## Závěr

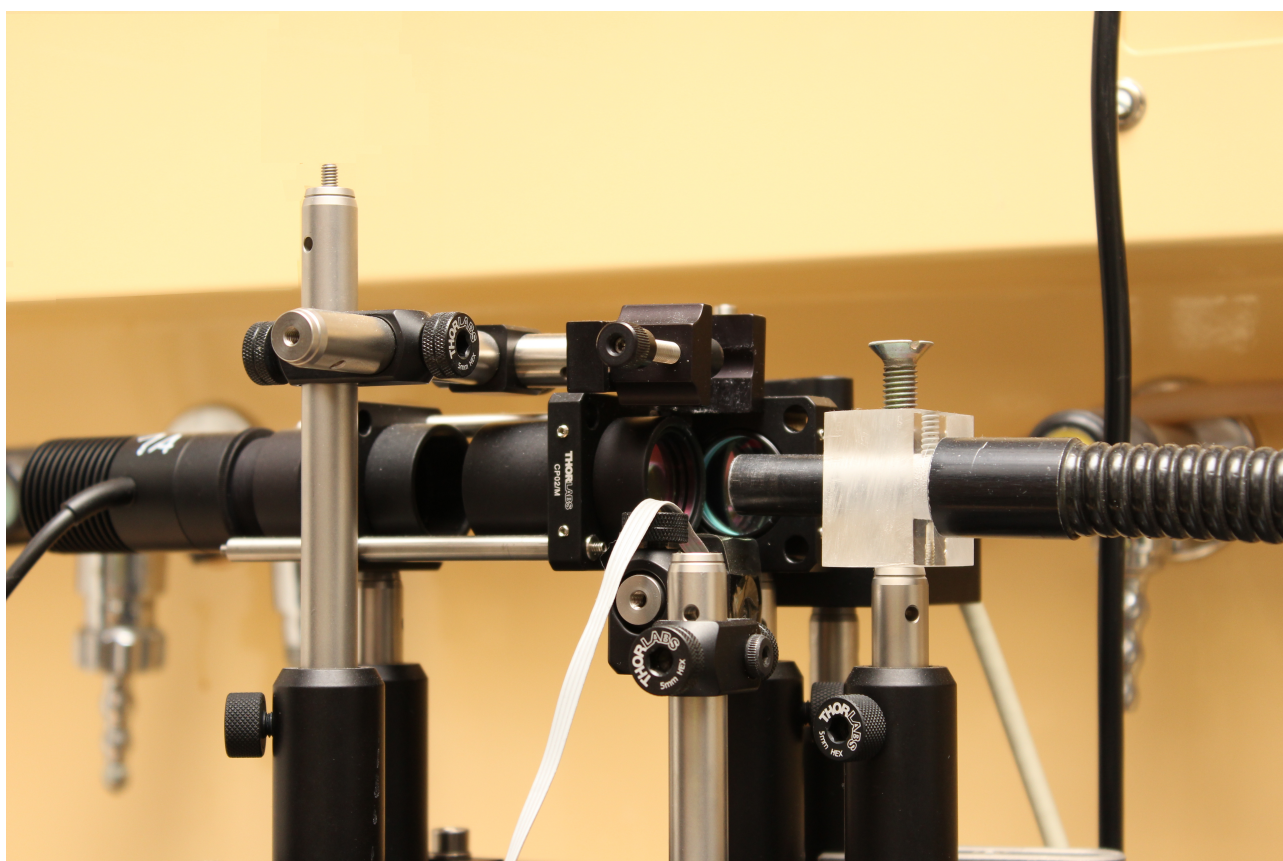
Po provedení všech experimentů a vyhodnocení výše uvedených grafů jsem dospěl k několika závěrům. Buňky *Nannochloropsis oceanica* skutečně vykazují relativně vysoké NPQ (jak je posáno v článku Cao et al., 2013) a jedná se o tzv. *energy-dependent quenching* (energetické zhášení), které je závislé na vytvoření protonového gradientu na thylakoidní membráně. Vzhledem k chování NPQ po zhasnutí aktinického světla, jež po prvotním rychlém pádu klesá už pouze pomalu, je pravděpodobné, že v buňkách proběhl i xantofylový cyklus založený na violaxanthinu - přítomnost violaxanthinu v buňkách *N. oceanica* je známa. Další důkaz svědčící pro přítomnost xantofylového cyklu u *N. oceanica* představuje chování relaxace NPQ při osvětlení vzorku slabým světlem v době temnostní relaxace. Oproti vzorku buněk, jež nebyl vystaven slabému světlu, vykazuje osvětlený vzorek značně zrychlené klesání hodnot NPQ. Díky slabému světlu dochází v buňkách k rozběhnutí některých fotosyntetických procesů a vyrábí se NADPH. A právě tuto sloučeninu potřebuje enzym epoxidáza, aby mohl provést epoxidaci zeaxanthinu přes antheraxanthin až na violaxanthin. Společně se snižováním množství zeaxanthinu ve vzorku se pochopitelně snižuje i hodnota NPQ. U neosvětlených buněk tento proces probíhá jen velice omezeně, jelikož není dostatek NADPH, které by mohla epoxidáza využít. I přes všechny uvedené argumenty však myšlenku xantofylového cyklu nelze plně potvrdit bez pigmentové analýzy. Ta by ovšem přesahovala rámec této práce, a proto nemohu o podílu xantofylového cyklu na zhášení fluorescence mluvit se stoprocentní jistotou. Nicméně tato myšlenka se jeví jako velice pravděpodobná.

Co se týče ostatních zkoumaných druhů - *Phaeodactylum tricornutum*, *Emiliana huxleyi* a *Chromera velia*, můj experiment potvrdil některá dříve zjištěná fakta. *P. tricornutum* vykazuje velice silné zhášení vlivem xantofylového cyklu, ovšem po zhasnutí aktinického světla nedokáže zajistit zpětnou epoxidaci diatoxanthinu na diadinoxanthin, díky čemuž probíhá relaxace NPQ jen velice pomalu. Naproti „pozitivnímu“ výsledku u *P. tricornutum*, hodnoty NPQ zjištěné u *C. velia* se jeví jako značně neuspokojivé. Za normálních podmínek vykazuje tento druh velice vysoké NPQ, přesahující hodnotu 3. V mém pokusu však nedosáhla ani poloviční hodnoty. Důvodem byla zřejmě nízká teplota, při níž byla kultura buněk *C. velia* kultivována a z ní pramenící špatný stav buněk. Poslední druh - *E. huxleyi*, jež je také známý silným NPQ, v mých měřeních vykazovala velmi malou odezvu NPQ. Vyvětlením je snad příliš nízká intenzita růstového osvětlení, neboť jde o druh adaptovaný na intenzivní světlo. Má měření tedy ukázala, že *N. oceanica* disponuje odlišným mechanismem nefotochemického zhášení fluorescence ve srovnání s dalšími druhy řas ze skupiny SAR.

## Příloha



*Ilustrace (1): Horní ze tří řídicích jednotek je FL200/PS, kterou jsem využíval pro svá měření.*



*Ilustrace (2): Vlevo saturační světlo s nasazeným filtrem. Vpravo světlovodič vedoucí aktinické a měřicí světlo. V pozadí dva za sebou nasazené filtry, za nimiž byl umístěn detektor. V horní části se nachází prostor pro kyvetu se vzorkem.*

## Seznam použitých zkratk

**ATP** - adenosintrifosfát

**ADP** - adenosindifosfát

**DCMU** - 3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylkarbonyldiamid; inhibitor

**HL** buňky - buňky pěstované na vysokém světla ( $300 \mu\text{mol fotonů.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )

**LHCI** - anténní (světlosběrný) systém připojený k reakčnímu centru PSI

**LHCII** - anténní (světlosběrný) systém připojený k reakčnímu centru PSII

**LL** buňky - buňky pěstované na nízkém světle ( $15 \mu\text{mol fotonů.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )

**NADPH** - nikotinamidadeninindinukleotidfosfát

**NPQ** - nefotochemické zhášení fluorescence

**Q<sub>A</sub>** - plastochinon A

**Q<sub>B</sub>** - plastochinon B

**PQ** - platochinon

**PSI** - fotosystém I

**PSII** - fotosystém II

**P680** - reakční centrum fotosystému II

## Seznam literatury

- Campbell** N. A., Reece J. B.; Biologie; COMPUTER PRESS; Brno; 2006; 70 - 71
- Cao** S., et al.; A transthylakoid proton gradient and inhibitors induce a non-photochemical fluorescence quenching in unicellular algae *Nannochloropsis* sp.; FEBS Letters; 2013; 587, 1310 - 1315
- Figueroa** F. L., Jiménez C., Lubián L. M., Montero O., Lebert M. & Häder; D.-P. Effects of high irradiance and temperature on photosynthesis and photoinhibition in *Nannochloropsis gaditana* Lubián (Eustigmatophyceae); Journal of Plant Physiology; 1997; 151, 6 - 15
- Grouneva** I., Jakob T., Wilhelm C. a Goss R.; The regulation of xanthophyll cycle activity and of non-photochemical fluorescence quenching by two alternative electron flows in the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Cyclotella meneghiniana*; Biochimica et Biophysica Acta; 2009; 1787, 929 - 938
- Halliday** D., Resnick R., Walker J.; Fyzika 2; Nakladatelství VUTIUM; Brno; 2013; druhé přepracované vydání
- Harris** G. N., Scanlan D. J. a Geider R. J.; Responses of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) to step changes in photon flux density; European Journal of Phycology; 2014; 44(1), 31 - 48
- Horák** Z. a **Krupka** F.; Fyzika; SNTL - Nakladatelství technické literatury; Bratislava; 1981
- Jelínek** J. a **Zicháček** V., et al.; Biologie pro gymnázia; NAKLADATELSTVÍ OLOMOUC; Olomouc; 2014
- Lee** R. E.; Phycology; University Press; Cambridge; 1999
- Kandilian** R., Lee E., Pilon L.; Radion and optical properties of *Nannochloropsis oculata* grown under different irradiances and spectra; Bioresource Technology; 2013; 137, 63 - 73
- Koberg** M., Cohen M., Ben-Amotz A., Gedanken A.; Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation; Bioresource Technology; 2011; 102, 4265 - 4269
- Kodíček** M. a **Karpenko** V.; Biofyzikální chemie; Academia; Praha; 2000; 2. vydání
- Kotabová** E., et al.; Non-photochemical fluorescence quenching in *Chromera velia* is enabled by fast violaxanthin de-epoxidation; FEBS Letters; 2011; 585, 1941 - 1945
- Misra** A. N., Misra M. a Singh R.; Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology; Biophysics; 2012; 171 - 192
- Oborník** M. a **Lukeš** J.; Cell Biology of Chromerids: Autotrophic Relatives to Apicomplexan Parasites; International Review of Cell and Molecular Biology; 2013; 306, 333 - 369
- Pavlová** L.; Fyziologie rostlin; Karolinum; Praha; 2005



**Procházka S.**, et al.; Fyziologie rostlin; Academica; Praha; 1998

**Read B. A.**, et al.; Pan genome of the phytoplankton *Emiliania* underpins its global distribution; Nature; 2013; 499, 209 - 213

**Rodolfi L.**, et al.; Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor; Biotechnol Bioeng; 2008; 102, 100 - 112

**Soukupová J. a Roháček K.**; Fluorescence, fotosyntéza a stress: Jak to spolu souvisí?; 2005

**Štroch M.**, Špunda V. a Kurasová I.; Non-radiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants; Photosynthetica; 2004; 42, 323 - 337

**Yool A. a Tyrrel T.**; Role of diatoms in regulating the ocean's silicon cycle; Global biogeochemical cycles; 2003; 17, 1103 - 1124