

ВИСША АТЕСТАЦИОННА КОМИСИЯ
СНС ПО МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ, БИОФИЗИКА И БИОХИМИЯ

Петър Харалампиев Ламбрев

ПРИЛОЖЕНИЕ НА БЪРЗАТА И ЗАБАВЕНАТА ХЛОРОФИЛНА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ
ЗА АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЕТО НА ФОТОСИНТЕТИЧНИ ХЕРБИЦИДИ
В ИНТАКТНИ ЛИСТА И ТИЛАКОИДНИ МЕМБРАНИ ОТ ГРАХ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация
за присъждане на научната и образователна степен „доктор“

Научен ръководител
доц. д-р Василий Гольцев

Рецензенти
ст. н.с. I ст. Лозанка Попова, дбн
ст. н.с. II ст. д-р Мая Величкова

Научна специалност
01.06.08 – биофизика

София, 2004 г.

Използвани съкращения

АТФ	аденозинтрифосфат
АЦП	аналогово-цифров преобразувател
БФ	бърза флуоресценция
ЕТ	електронен транспорт
ЗФ	забавена флуоресценция
ИК	индукционна крива
КОС	кислородотделяща система
НАДФ	никотинамиддинуклеотидфосфат
ПХ	пластохинон
РЦ	реакционен център
ССК2	светлосъбиращ комплекс на фотосистема 2
ТМ	тилакоидна мембрана
ФС1	фотосистема 1
ФС2	фотосистема 2
ФФ	феофитин

УВОД

За изучаването на фотосинтезата е важно развитието на чувствителни методи, които носят информация за функционирането на фотосинтетичния апарат в нативно състояние. Луминесцентните методи, в т.ч. индукцията на флуоресценцията и забавената флуоресценция на ФС2, имат необходимите качества, за да бъдат прилагани за изследване на фотосинтезата *in vivo*. Те са недеструктивни, основават се на собственото излъчване на хлорофилите и не изискват употребата на флуоресцентни сонди или маркери, имат висока чувствителност и информативност по отношение на фотосинтетичните реакции. Пълноценното прилагане на подобни методи обаче изисква стабилна теория, с която да могат да се интерпретират получените данни.

Част от сегашните схващания за механизмите на луминесцентното излъчване на фотосинтезиращите организми са получени въз основа на експерименти с фотосинтетично активни хербициди. Първичното място на действие на фотосинтетичните хербициди е добре известно, затова тези вещества са широко използвани като специфични инхибитори на ЕТ, преди всичко в изолирани тилакоидни мембрани. В такива модели обаче характеристиките на флуоресценцията и забавената флуоресценция доста се различават в сравнение с нативните обекти, които излъчват по-богат и информативен сигнал, но по-трудно се поддават на аналитична обработка с химични агенти.

От друга страна, фотосинтетичните инхибитори съставят една от най-масово прилаганите в практиката групи търговски хербициди. Хербицидите са неотменна част от съвременното земеделие и, поне в обозримо бъдеще, тяхната употреба ще продължи. За сметка на това се търсят и разработват нови съединения с по-голяма активност, позволяващи по-ефективно отстраняване на резистентните биотипове и същевременно минимално химично натоварване на околната среда.

В тази насока има място развитието на бърз и достъпен количествен тест за определяне на хербицидният ефект *in vivo*, който би намерил приложение както в изучаването на механизмите на фотосинтезата и луминесценцията, така и за оценка на хербицидната чувствителност на различни растения или за проверка на инхибиращата активност на нови съединения. От съществено значение е да се познава взаимодействието на конкретните хербициди с растението мишена, което започва с поглъщане на хербицидните молекули, транспортиране до фотосинтетичните тъкани, свързване с тилакоидните мембрани и реализация на хербицидният ефект. Класическите радиоизотопни методи за проследяване на поглъщането и транспорта на хербицидите от целите растения са изключително трудоемки, скъпо струващи и често недостъпни. Индукционните флуоресцентни методи и флуоресцентните образи могат да се окажат перспективна алтернатива.

В настоящата работа е анализирано действието на три хербицида, инхибитори на фотосинтеза – диурон, атразин и диносеб, които са представители на две групи – урея/триазинови и фенолни хербициди, върху характеристиките на бързата и забавената флуоресценция на листа от грах. Сравнени са три метода за въвеждане на агентите в листа или цели растения и е изследвано влиянието на окръжаващата среда върху хербицидния ефект.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

В лабораторната практика хербицидите могат да се използват в експерименти от два типа – в единия се цели максимално инхибиране на пробата с цел да се изследват нейните свойства при прекъснат ЕТ. В другия случай се прилага точно определена доза хербицид и се определя нейният ефект върху пробата. Когато изследваният обект е интактен лист или цяло растение, ефективната концентрация на хербицида в тилакоидните мембрани може много да се различава от тази в разтвора за третиране, в зависимост от това каква част от разтвора е достигнала до хлоропластите. Затова наблюдаваният ефект може да се влияе от начина на прилагане на хербицида и условията на третиране. Това е и една от основните трудности при определянето на хербицидната активност *in vivo*.

Основната цел на дисертационната работа беше да се изследва действието на хербицидите на ФС2 атразин, диурон и диносеб в интактни листа и изолирани тилакоидни мембрани от грах върху параметрите на бързата и забавената флуоресценция при различни условия на третиране и регистрация.

Следните експериментални задачи бяха поставени за реализирането на посочената цел:

1. Да се анализира механизмът на действие на фотосинтетичните хербициди върху луминесцентните характеристики: ИК на БФ и ЗФ, измерени с FL-2006; ОЛР криви, измерени с HandyPEA; параметри на затихването на ЗФ; зависимостта на ЗФ и БФ от луминесцентния потенциал. Да се определят параметри за количествена оценка на хербицидния ефект в интактни листа.

2. Да се направи сравнително изследване на различни методи за обработка на листа с хербициди, с оглед да се избере най-подходящият метод за третиране и определяне на хербицидния ефект с помощта на луминесцентните методи. Да се сравнят ефектите на атразин, диурон и диносеб, приложени чрез различните методи.

3. Да се изследва значението на различни фактори (светлина, продължителност на третирането, етажност на листата), които могат да повлияят върху отчет-

тената хербицидна активност и да се специфицира протокол за третиране с оптимизирани условия.

4. Да се проследи динамиката на хербицидният ефект чрез регистриране на ИК и видеозаписи на флуоресцентни образи.

5. Да се изследва влиянието на температурата по време на регистрация върху луминесцентните характеристики в контролни и третирани растения и зависимостта на хербицидният ефект от температурата.

6. Да се изследва влиянието на рН на суспензионната среда в изолирани тилакоидни мембрани върху ефектите на диурон, атразин и диносеб.

7. Да се разработи компютърна програма, автоматизираща цифровата обработка и анализ на ИК на БФ и ЗФ, регистрирани с флуориметъра FL-2006.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

РАСТИТЕЛЕН МАТЕРИАЛ

Отглеждане на грахови растения

Грахови растения (*Pisum sativum*, L.), сорт „Ран-1“, са отглеждани като водна култура в хранителна среда, съдържаща 6,1 mM Ca(NO₃)₂, 1,8 mM KН₂РO₄, 2,1 mM MgSO₄, 1,7 mM KCl и следи от FeCl₃. Условията на отглеждане са следните: интензитет на светлината 60 μmol.m⁻².s⁻¹, фотопериод 12/12 h, температура 23–25 °C, относителна влажност на въздуха 50–65%. В експериментите са използвани 14-дневни растения, които имат 5 развити листа. Ако не е отбелязано друго, измерванията са правени върху 3-ти лист.

Изолиране на тилакоидни мембрани

Тилакоидни мембрани са изолирани по метода на Whatley и Arnon (1963) с модификации. Откъснатите листа се хомогенизират в среда за изолиране с рН 7,8, съдържаща калиево-натриев фосфатен буфер (1/15 M Na₂НРO₄, 1/15 M KН₂РO₄), 330 mM Sorbitol и 5 mM MgCl₂. Хомогенатът се центрофугира в хладилна центрофуга К-23 (Janetzki, Германия) при 200 ×g за 1 min. Супернатантата се центрофугира при 1000 ×g за 7 min. Утайката се промива двукратно с буфера за изолиране при 1000 ×g за 7 min.

Концентрацията на хлорофила в получената хлоропластна суспензия, определена по Lichtenthaler (1987), е 3 mg.ml⁻¹. Суспензията се замразява и съхранява в течен азот, като предварително към нея е добавен глицерол до концентрация 10% (Гольдфелд и съавт., 1980).

ОБРАБОТКА С ХЕРБИЦИДИ

Използвани са следните хербициди: диурон (3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилурея), атразин (2-етиламино-4-хлоро-6-изопропиламино-1,3,5-триазин), диносеб (6-(*втор*-бутил)-2,4-динитрофенол). От сухите вещества са приготвяни изходни разтвори в 95% етанол до концентрация 3 mM. За крайните концентрации изходните разтвори са разреждани с дестилирана вода.

Хербицидите са въвеждани в листата по три различни метода, наречени за удобство *листна дифузия*, *инфилтрация* и *стъблен транспорт*.

Листна дифузия

Откъснати листа се поставят между два слоя филтърна хартия и се потапят в разтвор на хербицид. Листата се инкубират в продължение на два часа при непрекъснато осветяване и след това един час на тъмно. По време на осветяването се поддържа температура 25 °C и интензитет на светлината $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Инфилтрация

Вакуумно инфилтриране на откъснати листа с хербициден разтвор е извършвано с помощта на пластмасова спринцовка по процедура, описана от Malkin и съавт. (1992). Инфилтрираните листа престояват един час на тъмно, потопени в разтвора за третиране.

Стъблен транспорт

Стъблата на растенията се прерязват в основата под вода и корените се отстраняват. Стъблата се потапят в чаши с хербициден разтвор. Третирането продължава 20 h, като в първите 12 h растенията престояват на тъмно, а през следващите 8 h те се осветяват с интензитет $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Преди измерване третираните растения престояват един час на тъмно.

Третиране на тилакоидни мембрани с хербициди

Ефектите на хербицидите и зависимостта на ефектите от pH са изследвани в изолирани тилакоидни мембрани. Преди измерването размразената хлоропластна суспензия се разрежда в буферирана среда с определена стойност на pH, съдържаща 25 mM буфер и 5 mM MgCl_2 . За pH в интервала 5,5–6,3 буферът е 2-(N-морфолино)-етансулфонова киселина (MES), а за pH 7,0–8,0 – N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфонова киселина (HEPES). Крайната концентрация на хлорофила в кюветите е $30 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Хербицидите атразин и диурон са добавяни до концентрация 1 μM , а диносеб до 10 μM . Тилакоидните мембрани престояват в средата с хербицидите в продължение на 3 min.

ОТЧИТАНЕ НА ЕФЕКТИТЕ

Едновременна регистрация на ИК на БФ и ЗФ

ИК на БФ и ЗФ, тъмнинното затихване на ЗФ и термограми на стационарната БФ и ЗФ са регистрирани с флуориметъра FL-2006 (Тест, Русия). Източник на действащата светлина е халогенна лампа. Фокусираният сноп на повърхността на пробата е с интензитет $1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. БФ и ЗФ се регистрират с два фотоумножителя тип ФЕУ-79. БФ се разделя от възбуждащата светлина чрез кръстосани светофилтри: синьозелен с $\lambda \leq 660 \text{ nm}$, поставен между лампата и обекта, и червен с $\lambda \geq 680 \text{ nm}$, между обекта и фотодетекторите.

Регистрацията на ЗФ става с бекерелов тип дисков фосфороскоп, който механично разделя във времето осветяването на пробата и отчитането на излъчената ЗФ. Цикълът на фосфороскопа е около 11 ms. В един цикъл има период на осветяване 5,15 ms, през който се регистрира БФ. В следващите 0,35 ms осветяването спира и се отваря прозорецът пред втория фотоумножител, който в продължение на 5,15 ms регистрира експоненциалния тъмнинен спад на ЗФ. След 0,35 ms тъмнинен интервал започва следващият цикъл. Сигналите от двата фотоумножителя се усилват и се отчитат от двуканален 10-битов АЦП на всеки 40 μs .

Преди измерването адаптираните на тъмно откъснати листа престояват 1 min в камерата на фосфороскопа. В експериментите с различни температури листата престояват 3 min в камерата при съответната температура на измерването. ИК на БФ и ЗФ се регистрират за 1 min. За всяко измерване са правени 5–6 повторения с различни листа (обикновено по 2 листа от три растения).

За измерването на температурните криви на стационарната БФ и ЗФ се използва режим на температурно сканиране. При тези експерименти листата престояват 3 min в камерата с включена действаща светлина и още няколко минути до понижаване на температурата до 5 °C, след което започва постепенно нагряване на пробата до 60 °C със скорост 3 °C/min, като стационарната стойност на БФ, ЗФ и тъмнинният спад на ЗФ се отчитат през 1 °C.

Регистрация на ОЖР криви с флуориметър HandyPEA

В допълнение към измерванията на ИК, правени с FL-2006, фотоиндуцираният преход на БФ О–J–I–Р в интактни листа е проследяван с микросекундна времева разделителна способност с помощта на портативен флуориметър HandyPEA (Hansatech Instruments, Великобритания). Флуориметърът работи с непрекъсната възбуждаща светлина получена от три светодиода ($\lambda = 650 \text{ nm}$). Интензитетът на повърхността на изследвания лист е около $3000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. БФ се разделя от действащата светлина с инфрачервен филтър ($\lambda \geq 700 \text{ nm}$). Минималното време между отчитанията е 10 μs , като първата точка се записва 20 μs след началото на осветяването.

След едночасова тъмнинна адаптация на листата се измерват ИК с продължителност 1 s. Всички криви се регистрират от различни листа, като за всяка експериментална група се правят поне по 6 повторения.

Флуоресцентни образи

Видеозаписи на флуоресцентните образи бяха правени с помощта на модифицирана версия на апарата FluorCam M690 (Photon System Instruments, Чехия). Възбуждащата светлина с $\lambda = 635 \text{ nm}$ се излъчва от светодиоди, като максималният интензитет е $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Флуоресценцията се разделя от възбуждащата светлина с помощта интерференчен филтър с $\lambda_{\text{max}} = 700 \text{ nm}$ и червен филтър RG697. Преминалата флуоресценция се отчита от CCD-камера, която генерира цифрови изображения с размер 320×240 пиксела и 8-битово кодиране (256 нива на сивото).

За визуализиране на хербицидния транспорт растенията се фиксират върху стъклена подложка и стъблата се потапят в разтвор за третиране. Растенията престояват 24 часа в камерата на флуориметъра, като се заснемат образи на флуоресценцията на всеки 3 min.

СОФТУЕР ЗА ОБРАБОТКА НА ДАННИТЕ

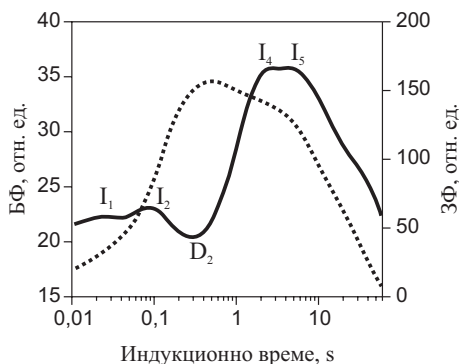
За обработване на ИК на БФ и ЗФ беше създадена програма Indwin за Microsoft Windows. Програмата разчита двоичните файлове, съдържащи записаните от флуориметъра FL-2006 ИК или температурни криви (термограми) на БФ и ЗФ. ИК от всеки отворен файл се нормализират спрямо усилването на апарата и се изглаждат чрез осредняване в няколко интервала. Позициите на максимумите на БФ и ЗФ не са фиксирани, а се използва алгоритъм за откриване на екстремуми или инфлексни точки. Кривите и позициите на установените максимуми се изобразяват на екрана за преглед и ръчно настройване на позициите на максимумите, ако е необходимо.

Параметрите на БФ и ЗФ – амплитудите и времената на пиковите и различни отношения между тях – се изчисляват от всяка крива поотделно и записват в таблица за последващо осредняване и обработка. Изгладените ИК от всяка експериментална група се осредняват за графично представяне.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При стайна температура БФ и ЗФ се излъчват от най-ниското синглетно възбудено ниво на антенните хлорофили на ФС2 (Веселовский, Веселова, 1990; Govindjee, 1995). Затова двата вида луминесценция имат еднакви спектрални характеристики, но БФ затихва за няколко ns, докато ЗФ продължава секунди и минути. За излъчване на квант ЗФ е необходимо връщане на електрон назад в електронтранспортната верига, рекомбинация на зарядите в РЦ на ФС2 и вторично възбуждане на хлорофила (Jursinic, 1986).

Промените на БФ и ЗФ при осветяване на тъмнинно адаптирана фотосинтезираща проба, записани като функция от времето, представляват ИК. На фиг. 1 е показан характерният ход на ИК на БФ и ЗФ, регистрирани от листа в нормално физиологично състояние с помощта на флуориметъра FL-2006. Тъй като в началните периоди след включване на действащата светлина промените в луминесценцията са много по-бързи и с времето се забавят, ИК е удобно да се визуализират в логаритмичен времеви мащаб. Преходите в първата секунда се означават като бърза фаза на индукцията, а след това – бавна фаза на индукцията.



Фиг. 1.

ИК на БФ (точки) и ЗФ (плътна линия), регистрирани едновременно с флуориметър FL-2006 в лист от грах, откъснат след едночасова тъмнинна адаптация. Измерването е направено при 20 °С и интензитет на възбуждащата светлина около 1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. ИК са показани в логаритмичен времеви мащаб. С буквите I₁, I₂, D₂, I₄ и I₅ са означени характеристичните точки в ИК на ЗФ.

Бърза фаза на индукцията

В съответствие с хипотезата на Duysens и Sweers (1963) интензитетът на **бързата флуоресценция** е нисък, когато РЦ са отворени, т.е. първичният хинов акцептор Q_A е окислен, и висок, когато РЦ са затворени (Q_A е редуциран). Бързата фаза на ИК отразява фотоиндуцираното затваряне на РЦ, които са били отворени на тъмно. Флуоресценцията от отворени РЦ се отбелязва с F₀, а в максимума – с F_p. Ако интензитетът на действащата светлина е насищаш, то F_p = F_m, като F_m е флуоресценцията от затворени РЦ. Разликата F_v = F_m - F₀ се нарича максимална вариабилна флуоресценция. Квантовият добив на БФ от отворени реакционни центрове може да се изрази по следния начин:

$$\varphi_{F_0} = \frac{k_f}{k_f + k_p + k_d}, \quad (1)$$

където k_f е скоростната константа на флуоресценцията, k_p – на фотохимичната реакция, а k_d сумира скоростите на безизлъчвателните пътища за дезактивация на възбуденото състояние.

В затворени РЦ реалната ефективност на фотохимичната реакция е 0, тогава квантовият добив на флуоресценцията е

$$\varphi_{F_m} = \frac{k_f}{k_f + k_d}. \quad (2)$$

Максималната фотохимична ефективност на ФС2 (в отворени РЦ) е

$$\varphi_{P_0} = \frac{k_p}{k_f + k_p + k_d} = 1 - \frac{\varphi_{F_0}}{\varphi_{F_m}} = 1 - \frac{F_0}{F_m} = \frac{F_v}{F_m}. \quad (3)$$

Отношението F_v/F_m е силно консервативно (Björkman, Demmig, 1987) и е един от най-често използваните флуоресцентни параметри за оценка на фотосинтезата.

Възбуждащата светлина на флуориметъра FL-2006 е по-ниска от насищаща, затова от ИК може да се изчисли F_v/F_p . Взаимозаменяемост между F_v/F_p и F_v/F_m е показана от Ögren (1988). От друга страна, скоростта на отварянето на блендата във флуориметъра FL-2006 не позволява да се отчете истинската стойност на F_0 , а вместо това се използва първата измерена точка след около 1 ms – F_1 . Затова измерената вариабилна флуоресценция ще зависи от ефективността както на фотохимичната реакция, така и на електронния пренос.

Промените на **забавената флуоресценция** по време на индукцията се контролират от два фактора – отвореността на РЦ на ФС2 и трансмембрания електрoхимичен потенциал (Malkin et al., 1994). Влиянието на първия фактор обаче е сложно поради това, че и отворените, и затворените РЦ могат да излъчват ЗФ. При фосфороскопския начин на регистрация излъчването, затихващо в милисекундната област, е пропорционално на количеството отворени РЦ (Веселовский, Веселова, 1990). ЗФ от затворени РЦ има принос в бавните (секундни) компоненти на кинетиката на затихване.

В бързата фаза на индукцията флуориметърът FL-2006 позволява да се разграничат два максимума на ЗФ – I_1 и I_2 . Показано е, че максимумът I_2 е чувствителен спрямо агенти, влияещи върху окислително-редукционното състояние на ФС2 (Goltsev, Yordanov, 1997). Изкуствени електронни акцептори, които окисляват ПХ пула, повишават нивото на максимума, докато инхибитори на ЕТ като диурон го премахват. Спадът I_2 - D_2 отразява редуцирането на пластохиноновия пул и затварянето на РЦ (Гаевский, Моргун, 1993).

Бавна фаза на индукцията

Промените на луминесценцията в бавната фаза на индукцията се контролират от няколко процеса – формиране на протонен градиент, активиране на елек-

тронния транспорт през ФС1 и на АТФ-синтезния комплекс, акумулиране на НАДФ.Н₂ и АТФ, активиране на цикъла на Калвин – Бенсон.

Спадането на БФ след максимума отразява както реокисляване на Q_A след активиране на ЕТ през ФС1 (фотохимично гасене), така и нефотохимично гасене, главно енергозависимо (Krause, Weis, 1991). При използването на силна действаща светлина се очаква да преобладава нефотохимичното гасене на БФ (Schreiber et al., 1986).

Приема се, че нарастването на ЗФ при прехода D₂–I₄ отразява генерирането на трансмембранен електрохимичен градиент (Wraight, Crofts, 1971). Основният максимум в бавната фаза е съставен от поне два компонента, I₄ и I₅, които обикновено не са разграничени като отделни пикове (фиг. 1). Тяхната природа досега не е изяснена със сигурност. Подобно на БФ, ЗФ спада след максимума, отразявайки вероятно тъмнинните реакции – акумулиране на НАДФ.Н₂ и АТФ, активиране на ензимите от цикъла на Калвин – Бенсон, а също и нефотохимичното гасене на флуоресценцията.

Връзка между БФ и ЗФ - луминесцентен потенциал

Едновременното регистриране на БФ и ЗФ в една и съща проба позволява да се разкрие връзката между двата типа излъчване. Тъй като БФ и ЗФ се контролират от едни и същи процеси при адаптирането на фотосинтетичния апарат от тъмно към светло, корелацията между тях може да се анализира теоретично.

За интензитета на ЗФ, L , може да се запише

$$L = \text{const} \cdot \varphi_{\text{F}_0} \cdot r^* \cdot (1-B) \cdot I_a \cdot \varphi_{\text{P}_0}, \quad (4)$$

където B е относителният дял на затворените РЦ, r^* е квантовият добив на излъчвателната рекомбинация, I_a е скоростта на поглъщане на светлина от антената на ФС2, φ_{F_0} е квантовият добив на флуоресценцията от отворени РЦ, а φ_{P_0} е добивът на първичната фотохимична реакция. За варибилната флуоресценция се получава изразът

$$F_v = B \cdot I_a \cdot \varphi_{\text{P}_0} \cdot \varphi_{\text{F}_m} \quad (5)$$

Като разделим (4) на (5) се получава

$$L/F_v = \text{const} \cdot r^* \cdot (1-B)/B \cdot \varphi_{\text{F}_0}/\varphi_{\text{F}_m} \quad (6)$$

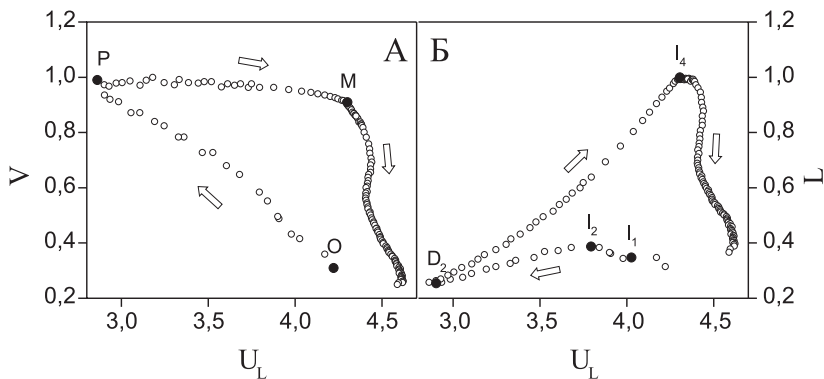
Или, отношението между ЗФ и БФ е пропорционално на отношението на концентрацията на отворените към затворените РЦ. От друга страна добивът на излъчвателната рекомбинация зависи от трансмембрания потенциал:

$$r^* = r_0^* \cdot e^{-\frac{E_a - F \Delta \psi + 2.3 \cdot RT \Delta \text{pH}}{kT}} \quad (7)$$

След логаритмуване на уравнение (6) и отпадане на всички константи се получава изразът

$$U_L = E^1 + \Delta \mu \text{H}^+ \sim \ln(L/F_v), \quad (8)$$

или величината U_L , изразяваща сумата от окислително-редукционния потенциал на Q_A (E^1) и трансмембрания потенциал, е пропорционална на логаритъма от отношението между ЗФ и БФ. Понеже U_L представлява сума от потенциали,



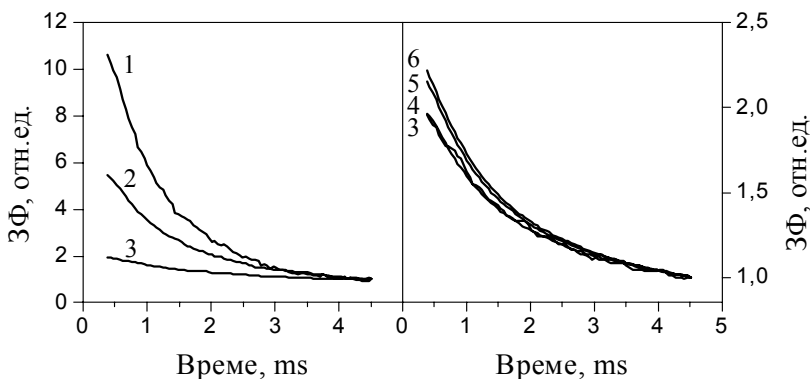
Фиг. 2. Ход на промените на относителната вариабилна флуоресценция, V (А) и ЗФ, нормирана спрямо I_4 , L (Б) в зависимост от луминесцентния потенциал $U_L = \ln L/F_v$ в контролни листа от грах. Плътните символи и буквите до тях отговарят на характеристикните точки в ИК. Стрелките указват посоката на фазовата траектория във времето. V , L и U_L са представени в относителни единици.

движещи ЗФ, можем да наречем тази величина *луминесцентен потенциал*. Едновременната регистрация на БФ и ЗФ дава възможност теоретично получената величина да бъде изчислена от експерименталните резултати.

На фиг. 2 е илюстриран ходът на БФ и ЗФ в зависимост от луминесцентния потенциал, изчислен от ИК на контролни листа. В началото на индукционния период U_L монотонно намалява до максимума на БФ – P , съответно минимума D_2 на ЗФ. След P потенциалът отново се увеличава, като в условно означената точка M (около 5 s) възвръща първоначалната си стойност. В края на индукционния период U_L слабо се отклонява в едната или в другата посока. Линейните участъци на фазовите траектории подсказват, че в тези периоди само единият компонент на U_L определя светенето.

В участъка $O-P$ с намаляване на U_L нараства БФ, което съответства на общоприетото виждане, че в началото на индукцията се редуцира Q_A (намалява E'). След максимума на БФ обаче U_L отново нараства, а БФ едва забележимо спада, т.е. наклонът на зависимостта $F_v(U_L)$ е различен в участъка $P-M$. Това вероятно означава, че U_L не нараства за сметка на увеличаване на E' . В същия период ЗФ нараства експоненциално от U_L (участъка I_2-D_4), каквато е зависимостта на ЗФ от ΔpH . Това потвърждава, че максимумът в бавната фаза на ИК (I_4) отразява формирането на трансмембранен градиент (Wright, Crofts, 1971). Друг извод е, че протонният градиент не влияе върху БФ в значителна степен, т.е. наличието на ΔpH само по себе си не е достатъчно, за да се индуцира q_E .

В края на индукционния период паралелният спад на БФ и ЗФ протича без значителни изменения на U_L . Може да се допусне, че гасенето както на БФ, така и на ЗФ, се определя предимно от намаляване на квантовия добив на флуоресценцията (енергозависимо гасене), което не влияе върху U_L .



Фиг. 3. Криви на тъмнинния спад на ЗФ на контролен грахов лист, регистрирани в един цикъл на фосфороскопа в различни моменти от индукционния период, съответстващи на характеристичните точки на ИК на ЗФ - I_1 (1), I_2 (2), D_2 (3), I_4 (4), I_5 (5) и D_5 (6). Стойностите са нормирани спрямо крайната точка на спада (4,5 ms) за всяка крива съответно.

Кинетика на затихването на ЗФ

По време на индукционния период съотношението между бързите и бавните компоненти на кинетиката на затихване на ЗФ се изменя (Itoh, Murata, 1973; Mag et al., 1975). Анализирването на релаксационната кинетика би могло да разкрие допълнителна информация за процесите, протичащи по време на индукционния период и за природата на индукционните максимуми.

Криви на затихването на ЗФ, регистрирани в различни моменти от индукцията, съответстващи по време на характерните точки в ИК на ЗФ (I_1 , I_2 , D_2 , I_4 , I_5 , D_5), са представени на фиг. 3. За да се покаже само изменението във формата на кривите, всяка е нормирана спрямо крайната точка от спада. В бързата фаза на индукцията намалява приносът на бързите компоненти за сметка на бавните компоненти последователно в точките I_1 , I_2 и D_2 . Намаляването на бързите компоненти за сметка на бавните, според Mag и съавт. (1975), отразява затварянето на РЦ. Причина за това е, че в милисекундното светене участват отворени РЦ, а за секундните компоненти са отговорни затворените.

В бавната фаза на индукцията до края на периода на измерване кинетиката на тъмнинния спад остава почти постоянна, въпреки че в този период (D_2 - I_4 - D_5) са най-големите изменения в интензитета на ЗФ. Резултатите са доказателство, че след първоначалното редуциране на ПХ РЦ на ФС2 остават предимно в затворено състояние в рамките на първата минута от индукционния период, а промените в БФ и ЗФ се дължат на трансмембрания потенциал и нефотохимично гасене. Все пак известно реокисляване на РЦ се отчита във време 6-8 s, което съответства на максимума I_5 . Това е възможно обяснение за наличието на двуфазност в максимума в бавната фаза на ИК на ЗФ.

По-детайлна представа за съотношението между компонентите на ЗФ се дава чрез регресионен анализ на кривите на затихване, които се апроксимират към двуксponentialен спад

$$L = L_1.e^{-t/\tau_1} + L_2.e^{-t/\tau_2} + L_3, \quad (9)$$

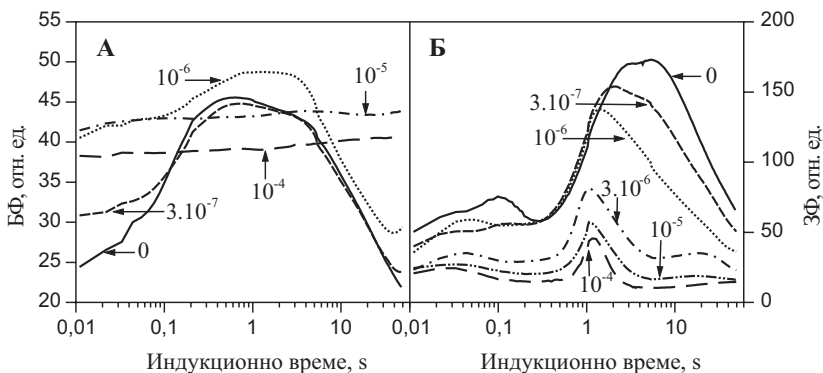
където L_1 и L_2 са амплитудите на експоненциалните компоненти, τ_1 и τ_2 са характеристичните времена, а L_3 включва бавните компоненти с характеристично време > 10 ms. Първият компонент има характеристично време $\tau_1 < 1$ ms (субмилисекунден), а вторият компонент е в границите $\tau_2 = 1,5 \div 3,5$ ms (милисекунден). Двата компонента могат да се свържат с рекомбинацията на определени “светещи състояния” на ФС2 ($Z^+P680Q_A^-$). Вероятно предшественици на светещите състояния, излъчващи в субмилисекундната област, са формите $Q_A Q_B^-$, а на светещите състояния на милисекундния компонент – $Q_A Q_B^{2-}$ (Zaharieva et al., 2001; Zaharieva, Goltsev, 2003). Амплитудите ще са пропорционални на концентрациите на съответните предшественици, а характеристичните времена ще зависят от скоростта на изчезването на светещите състояния на тъмно.

В дисертацията са представени индукционни криви на амплитудите и характеристичните времена, получени чрез апроксимиране на кривите на затихване, регистрирани в различни моменти от индукцията. Показано е, че бързият максимум в ИК на ЗФ се дължи изцяло на бързите компоненти (субмилисекундния и милисекундния), а в бавния максимум участва L_3 . Паралелно с понижаването на амплитудата на милисекундния компонент, L_2 в първата секунда от индукционния период нараства неговото характеристично време, τ_2 . И двата ефекта могат да се свържат с редуцирането на ПХ пула. Амплитудата намалява, защото със затварянето на РЦ изчезват предшествениците на светещите състояния, а характеристичното време нараства, защото Q_B^{2-} не може да се реокислява от ПХ пула, а само чрез обратен пренос към Q_A .

ЕФЕКТИ НА ХЕРБИЦИДИТЕ ВЪРХУ БФ И ЗФ

Влияние на хербицидите върху ИК на БФ и ЗФ

Най-характерният признак за действието на хербицидите в ИК на БФ е повишаване на относителния интензитет на началната флуоресценция, в сравнение с максималния интензитет (фиг. 4А). Когато електронният пренос след Q_A е прекъснат, за затваряне на РЦ е достатъчно поглъщането на един светлинен квант. При високи инхибиторни концентрации, когато всички РЦ са блокирани, пълно затваряне на РЦ става в рамките на първия цикъл на осветяване на фосфороскопа. В такъв случай началното ниво е почти равно на максималното и регистрираната ИК представлява приблизително права хоризонтална линия (вж. 10^{-5} и 10^{-4} М на фиг. 4). При по-ниски концентрации степента на нарастването на F_1 ще се определя от относителния дял на блокираните РЦ.

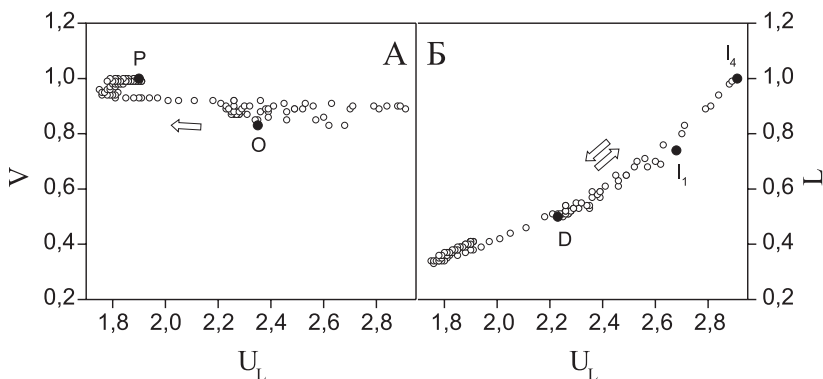


Фиг. 4. Индукционни криви на БФ (А) и ЗФ (Б) от листа от грах, третирани с различни концентрации атразин чрез стъблен транспорт. Концентрациите в М са означени срещу съответните криви.

Действието на хербицидите атразин, диурон и диносеб се изразява в намаляване интензитета на **ЗФ** в целия индукционен период. За разлика от БФ, ЗФ намалява монотонно с увеличаване на хербицидната концентрация, така че ефектът на инхибиторите може да се оцени по абсолютната стойност на ЗФ. Наред с общото понижаване на ЗФ се установяват характерни изменения във формата на ИК, най-вече в съотношението между амплитудата на отделните фази (максимуми).

Бързата фаза на ИК (I_1 – I_2 – D_2) се редуцира по-слабо от хербицидите в сравнение с бавната (I_4 – I_5). Както е показано за изолирани тилакоидни мембрани, инхибирането на ЕТ води до много по-силно намаляване на I_2 отколкото на I_1 , така че съотношението между I_1 и I_2 се изменя в полза на I_1 (Goltsev, Yordanov, 1997; Goltsev et al., 1998). В инхибираните РЦ не могат да се генерират състояния $Q_A Q_B^-$ и $Q_A Q_B^{2-}$, които вероятно формират основна част от излъчването в I_2 , и този пик намалява. Паралелно с I_2 намалява дълбочината на спада I_2 – D_2 , който в контролните листа отразява редуцирането на ПХ.

Амплитудата на ЗФ в бавната фаза на ИК е още по-чувствителна към присъствието на инхибитори. С нарастване на хербицидната концентрация над определен минимален праг амплитудата намалява практически монотонно, което потенциално я прави количествен показател за инхибиращия ефект на приложени агент. Отношението на максималния интензитет на ЗФ в бавната фаза (I_4) към този в бързата фаза (I_1 или I_2) за контролни листа е около 2, докато при най-високите използвани концентрации на хербицидите то спада до приблизително 1. Силното инхибиране на бавната фаза може да се отдаде на изчезването на трансмембрания електрохимичен градиент, като се има предвид, че интензитетът на излъчената ЗФ зависи експоненциално от величината на трансмембрания потенциал (Wraight, Crofts, 1971).



Фиг. 5. Ход на промените на относителната вариабилна флуоресценция, V (А) и ЗФ, нормирана спрямо I_4 , L (Б) в зависимост от луминесцентния потенциал $U_L = \ln L/F_v$ в листа, третиран чрез стъблен транспорт с 10^{-5} М атразин. Плътните символи и знаците до тях отговарят на характеристикните точки в ИК. Стрелките указват посоката на развитие на фазовата траектория във времето. V , L и U_L са представени в относителни единици.

Двата компонента на бавния максимум – I_4 и I_5 – проявяват различна чувствителност спрямо действието на инхибиторите. С нарастване на концентрацията I_5 намалява значително по-бързо отколкото I_4 . Над определена концентрация ($3 \cdot 10^{-6}$ М на фиг. 4) ЗФ в бавната фаза на ИК нараства изключително за сметка на I_4 . Този пик не изчезва и при най-високите концентрации. Допускаме, че при тези условия ЗФ в I_4 се стимулира от протонен градиент, генериран от ФС1, най-вероятно чрез цикличен ЕТ.

Ход на луминесцентния потенциал в третиран лист

Известният ефект на хербицидите върху ЕТ, съответно редокс състоянието на РЦ, може да се използва като проверка за верността на интерпретацията на взаимоотношенията между луминесцентния потенциал и излъчването на БФ и ЗФ по време на индукционния период.

В растенията, третиран с 10^{-5} М атразин, ЕТ е блокиран практически изцяло и РЦ се затварят още в първия светлинен цикъл. Отношението $(1-V)/V$ остава постоянно по време на измерването, следователно приемаме, че промените на U_L са зависими единствено от трансмембрания потенциал. Фиг. 5 показва, че, независимо в каква посока се изменя U_L , ходът на БФ и ЗФ описва една и съща траектория – БФ практически не се изменя, а ходът на ЗФ описва експоненциална функция. Всички фази от ИК на БФ в инхибирани листа са резултат от промени в трансмембрания електричен или протонен градиент. Както беше показано, максимумите, които не изчезват дори и при пълно подтискане на ЕТ, са I_1 и I_4 . Предполагаме, че първият е свързан с електричния потенциал, генериран от движението на разделените заряди, а вторият отразява протонен градиент, индуциран от ФС1.

Влияние на хербицидите върху кинетиката на затихване на ЗФ

С увеличаване на хербицидната концентрация намаляват амплитудите L_1 , L_2 и L_3 , но L_3 е най-слабо чувствителна и нейният дял в общото светене се увеличава. Освен това нараства характеристичното време τ_2 в началото на индукцията, така че големината на прехода му намалява. По амплитудата на прехода може да се съди за дела на инхибираните центрове, т.е. за хербицидния ефект.

В листа, третирани с насищащи концентрации хербициди, отношението между началната и крайната точка в измерената крива на затихването се понижава до 1,5 и практически не се изменя по време на индукционния период, което потвърждава, че то може да служи като показател за отвореността на РЦ.

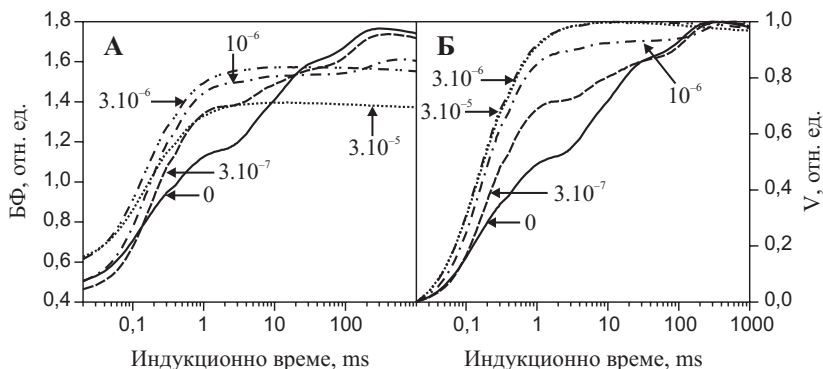
ОЈР криви

Използването на силен интензитет на действащата светлина за регистрация на ИК на БФ и микросекундна разделителна способност позволява да се разграничат две междинни нива в бързата фаза О–Р, отбелязани като I_1 и I_2 (Schreiber, Neubauer, 1987; Neubauer, Schreiber, 1987) или J и I (Strasser et al., 1995). Предполага се, че О–J фазата е свързана с редуциране на Q_A . Преходите О–J–I–Р сме измервали с флуориметъра HandyPEA. Първата стабилна стойност, отчетена 20 μ s след включване на осветяването, е близка до истинското ниво F_0 .

Действието на хербицидите се изразява главно в покачване на флуоресценцията в нивото J, регистрирано във време 2 ms (Stirbet, Strasser, 1995; Ruth, 1996). При пълно инхибиране на РЦ максималната флуоресценция се достига още в J, както е показано от Strasser и съавт. (Strasser et al., 1995; Guisse et al., 1995). Относителната вариабилна флуоресценция в J: $V_J = (F_J - F_0)/(F_m - F_0)$, е използвана като показател за хербицидния ефект (Klem et al., 2002). За удобство може да се използва и величината $\psi_0 = 1 - V_J$, изведена от Strasser и съавт. (2000) като ефективността на ЕТ между Q_A и Q_B .

Концентрационни криви на параметрите на ИК на БФ и ЗФ

Количествена оценка на хербицидния ефект, получен в третираните листа, може да се даде от параметрите на БФ и ЗФ. За да определим кои параметри са подходящи да бъдат използвани като мярка за степента на инхибиране, ние изследвахме тяхната зависимост от приложената концентрация на хербицидите. Търсехме параметри на ИК, които да могат точно да се изчисляват от ИК, да имат стабилни стойности в нетретираните листа, да бъдат чувствителни спрямо действието на хербицидите и ефектът на хербицидите да има едностранно влияние върху тях. Предвид поставените условия избрахме следните параметри: за ИК, регистрирани с FL-2006 – височината на максимумите на ЗФ I_1 и I_4 ; отношението $F_v/F_p = (F_p - F_1)/F_p$; за ОЈР кривите, регистрирани с HandyPEA – параметъра $\psi_0 = 1 - V_J$. Зависимостта на тези параметри от логаритъма на хербицидната концентрация е сигмоидална (фиг. 7, фиг. 8) и може да се изрази с болцманова функция:



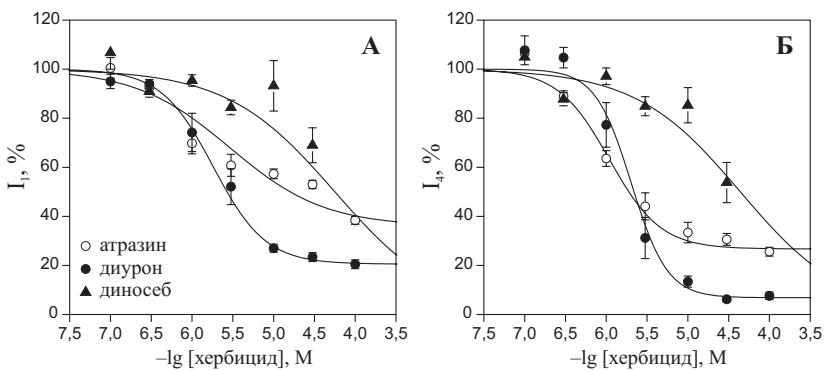
Фиг. 6. OJIP криви, регистрирани с флуориметър HandyPEA от листа, третирани чрез стъблен транспорт с различни концентрации атразин. Концентрациите в М са дадени на графиката срещу съответните криви (означени със стрелки). Б. Криви на относителната вариабилна флуоресценция $V = (F - F_0)/(F_m - F_t)$.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2. \quad (10)$$

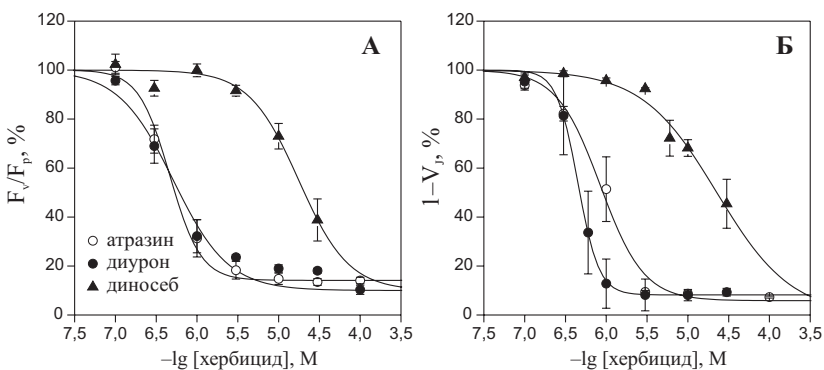
От числените стойности на модела, получени чрез регресия по метода на най-малките квадрати, се изчислява концентрацията на полуинхибиране или индексът на полуинхибиране PI_{50} , който представлява отрицателен десетичен логаритъм от концентрацията. Получената стойност за PI_{50} позволява да се сравни ефективността на отделните хербициди или методи на третиране.

В табл. 1 са обобщени индексите на полуинхибиране на избраните параметри на БФ и ЗФ за трите хербицида и метода за третиране. Сравнение на стойностите за трите хербицида показва, че тяхната активност намалява в реда диурон > атразин > диносеб. Тази подредба е установена и от параметрите на БФ и ЗФ в тилакоидни мембрани от грах (Goltsev et al., 1998) и съответства на измерените константи на свързване на трите съединения в тилакоидни мембрани и интактни зелени водорасли (Laasch et al., 1981).

Първият метод – листна дифузия – се оказва най-слабо ефективен от трите. Анализът на кривите „доза-отговор“ е по-неточен, когато инхибирането на изследвания параметър не се насища при максималните концентрации. По-високи индекси на полуинхибиране се получават с инфилтрация на листата. Трябва да се отбележи обаче, че при този метод статистическите отклонения са много големи и възпроизводимостта е по-лоша. Друг недостатък на метода е, че самата процедура представлява механичен стрес и може да повлияе отрицателно върху фотосинтетичните показатели, както беше показано при ИК. За достоверно определяне на полуинхибиращата концентрация са необходими повече повторения.



Фиг. 7. Концентрационни зависимости на максимумите I_1 (А) и I_4 (Б) на ИК на листа от растения, третираны с диурон, атразин или диносеб чрез стъблен транспорт. Символите представят осреднени експериментални стойности на параметрите, нормирани спрямо контролата, вертикалните черти - стандартна грешка, а кривите са получени чрез апроксимиране към сигмоидална зависимост.



Фиг. 8. Концентрационни криви на параметрите на БФ F_v/F_p (А) и $1-V_j$ (Б) за растения, третираны с диурон, атразин или диносеб чрез стъблен транспорт. Символите представят осреднени експериментални стойности на параметрите, нормирани спрямо контролата, вертикалните черти - стандартна грешка, а кривите са получени чрез апроксимиране към сигмоидална зависимост.

Методът, с който се постига най-ефективно инхибиране от диурон и атразин, е стъбленият транспорт. Друго негово предимство е, че вариацията на данните е най-ниска и получените резултати са най-достоверни. Освен това, в сравнение с останалите процедури, третирането на цели растения е свързано с най-малки отклонения от нормалното физиологично състояние на листата. Ето защо, за по-нататъшните изследвания с атразин и диурон сме избрали третирането на листа чрез стъблен транспорт. Този метод обаче е слабо ефикасен по отношение на фенолни хербициди като диносеб, които се транспортират лошо през стъблата.

Табл. 1. Индекси на полуинхибиране pl_{50} на параметрите на ЗФ и БФ I_1 , I_4 , F_v/F_p и $1-V_j$ за атразин, диурон и диносеб, приложени чрез листна дифузия, инфилтрация и стъблен транспорт

Метод	Параметър	Атразин	Δ	Диурон	Δ	Диносеб	Δ
Листна дифузия	I_1	4,38	0,15	5,42	0,09	4,44	0,03
	I_4	4,38	0,03	5,35	0,09	4,45	0,03
	F_v/F_p	4,55		5,60	0,20	4,44	0,08
	$1-V_j$			5,25	0,01		
Инфилтрация	I_1	5,28	0,10	5,73	0,10		
	I_4	5,17	0,08	5,58	0,07		
	F_v/F_p	5,27	0,07	6,00	0,09		
	$1-V_j$	5,37	0,07	5,66	0,16	5,32	0,19
Стъблен транспорт	I_1	5,60	0,10	5,95	0,08	4,40	0,20
	I_4	5,87	0,06	6,12	0,04	4,38	0,13
	F_v/F_p	6,36	0,06	6,35	0,05	4,66	0,07
	$1-V_j$	6,23	0,05	6,35	0,05	4,48	0,05

ФАКТОРИ, ВЛИЯЕЩИ ВЪРХУ ХЕРБИЦИДНАТА АКТИВНОСТ

Светлината по време на третиране чрез листна дифузия

За да покажем влиянието на светлината върху проникването на хербицидите през листната повърхност, направихме опитна постановка, в която паничките с потопените листа се осветяват от шрайбпроектор. За да се избегне нагряването от лампата, на пътя на светлината се поставя прозрачен съд с 10 cm воден стълб. Температурата на разтвора в паничките не надвишава 25 °C. Както в останалите експерименти, след двучасовото инкубиране при описаните условия, листата се оставят на тъмно за още 1 h.

В табл. 2 са дадени стойностите на параметрите I_4 и $1-V_j$, изчислени от ИК на БФ и ЗФ на листа инкубирани 2 h във вода или в 0,6 μ M диурон на тъмно или при осветяване с два светлинни интензитета. Ефектът на диурона подчертано зависи от условията на осветяване. Той е най-слаб в листата, инкубирани на тъмно, и се усилва с увеличаване на светлинния интензитет. Резултатите доказват, че проникването на хербицида през листната повърхност зависи от светлината. Вероятно при осветяване се отварят устицата и през тях хербицидът навлиза по-лесно в паренхимата.

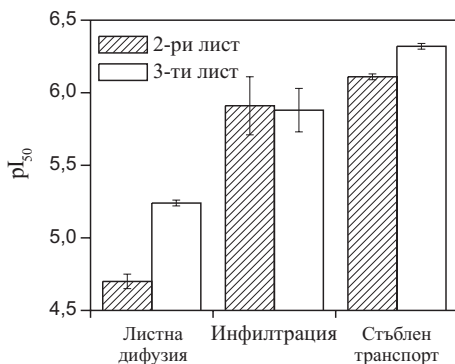
Табл. 2. Влияние на интензитета на светлината по време на инкубиране върху параметрите I_4 и $1-V_J$ в листа потопени във вода или в $0,6 \mu\text{M}$ диурон. Листата са осветявани 2 h, след което са адаптирани за 1 h на тъмно.

Интензитет $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	I_4		$1-V_J$	
	Контрола	Диурон	Контрола	Диурон
0	74 ± 5	70 ± 9	$0,449 \pm 0,004$	$0,448 \pm 0,010$
100	83 ± 2	71 ± 8	$0,506 \pm 0,005$	$0,395 \pm 0,042$
500	112 ± 14	83 ± 7	$0,457 \pm 0,013$	$0,258 \pm 0,058$

Възраст на листата

В хода на развитието както на целия растителен организъм, така и на отделните листа от едно растение, фотосинтетичната активност претърпява съществени промени (Sestak, 1977; Zima, Sestak, 1979). С развитието на фотосинтетичния апарат в младите листа скоростта и капацитетът на фотосинтезата постепенно нарастват, а при стареенето отново намаляват (Wilson et al., 2000). Може да се очаква, че тези фактори ще се отразят и върху чувствителността на листата към фотосинтетични хербициди.

Фиг. 9 показва, че възрастта на листата оказва влияние върху инхибиращата ефективност на диурон. По-младите листа (3-ти лист) са по-чувствителни в сравнение с по-старите (2-ри лист) когато хербицидът е приложен чрез листна дифузия или стъблен транспорт. В същото време не се установяват разлики между инфилтрираните с диурон листа. Подобно поведение беше установено и за останалите два хербицида.



Фиг. 9. Индекси на полуинхибиране PI_{50} на параметъра $1-V_J$, изчислен от OJIP криви за грахови листа от различен етаж, третирани с диурон чрез листна дифузия, инфилтрация или стъблен транспорт.

Скоростта на абсорбция и транспорт на триазинови хербициди е пропорционална на количеството абсорбирана вода или на скоростта на транспирацията (Lund-Noie, 1969; Vostral et al., 1970). Предполагаме, че тези процеси предопределят установените различия в хербицидният ефект в зависимост от възрастта на листата. Измервания на скоростта на фотосинтезата и транспирацията, правени съвместно с Мая Ламбрева и Сергей Иванов от Института по физиология на растенията, показаха по-голямата активност на младите листа в сравнение със

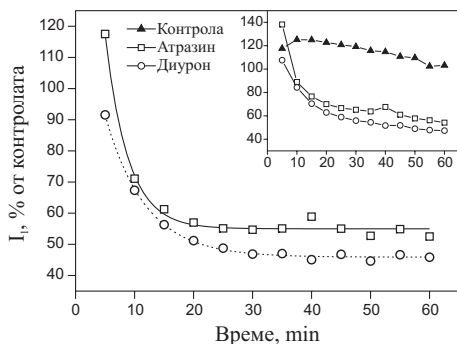
старите. По-високата скорост на транспирацията означава по-интензивно поглъщане на хербицида от младите листа, в резултат на което концентрациите около хербицидният участък ще бъдат по-високи и индексът на полуинхибиране – по-нисък.

С активността на фотосинтезата може да се обясни защо по-младите листа са по-възприемчиви към хербицидно третиране през стъблото, но не и към инфилтрация. Проникването на хербицидите чрез дифузия през листната повърхност също би могло да се улеснява с отварянето на устицата, което се демонстрира от светлинната зависимост на хербицидният ефект. В този случай обаче е възможно наблюдаваните ефекти да се обуславят и от възрастови различия в анатомията на листата, напр. дебелината на кутикулата.

Динамика на инхибирането след инфилтрация

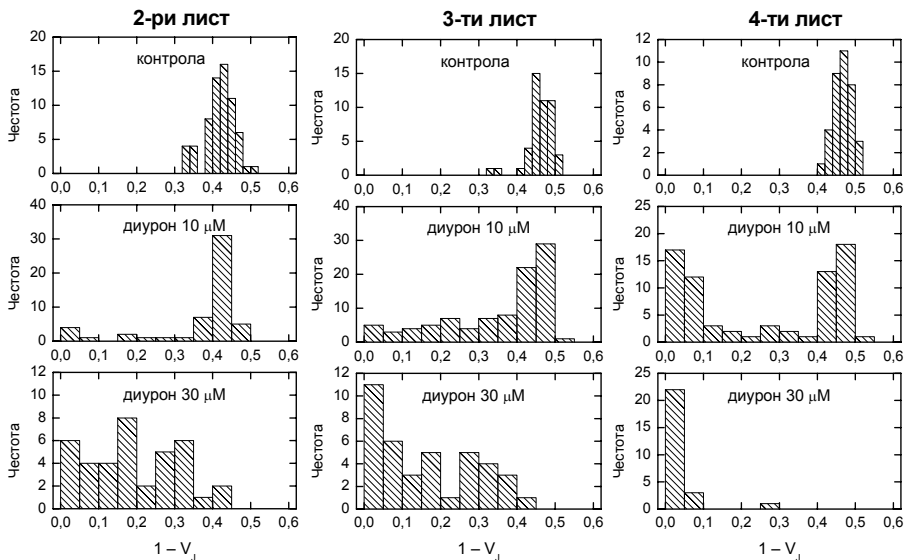
Предимство на инфилтрацията пред дифузионното прилагане на хербицидите е бързото изпълнение на процедурата. Самото инфилтриране обаче не гарантира, че молекулите на изследваното вещество са достигнали своята мишена на действие. Основните бариери – кутикулата и епидермисът – са преодоляни, но за дифузията на хербицида до тилакоидните мембрани през клетъчната стена, плазмалемата, външната хлоропластна мембрана, може да е необходимо още време.

За да определим необходимостта от допълнително време за уравнивяване на хербицидната концентрация в ТМ, проведохме следния експеримент. Един лист се инфилтрира с разтвор на хербицид с концентрация 10^{-5} М, съответно с вода за контрола. Непосредствено след инфилтрацията листът се поставя на тъмно в камерата на флуориметъра FL-2006. Апаратът се включва в режим на повтарящи се измервания на ИК на БФ и ЗФ – в продължение на 1 h на всеки 5 min се прави едно измерване за 5 s.



Фиг. 10.

Динамика на инхибирането на I_1 след инфилтриране на листа с 10^{-5} М диурон или атразин. След инфилтрирането листата са поставени в камерата на FL-2006 и са измервани ИК за интервал от 5 s на всеки 5 min. Стойностите са нормирани спрямо контролата. Кривите представят апроксимиране към експоненциален спад, $y = A \cdot e^{-x/t} + A_0$. На вмъкнатата графика са изходните стойности.



Фиг. 11. Хистограми на честотното разпределение на параметъра $1 - V_j$ на OJIP криви, регистрирани от листа, третираны чрез листна дифузия с диурон (10 и 30 μM). Трите колони сравняват разпределенията на параметъра във втори, трети и четвърти лист, съответно. Съответният разтвор за третиране е посочен на самите графики.

Кинетиката на инхибирането може да се проследи от зависимостта на максимума I_1 на ЗФ от времето (фиг. 10). Нормираните към контролата стойности за атразин и диурон са апроксимирани към експоненциална функция, $y = A \cdot e^{-x/t} + A_0$, където y е стойността на параметъра, а x – времето след инфилтрация. Характеристичното време на инхибиране на I_1 за диурон е 8 min, а за атразин – 4 min.

Резултатите са доказателство, че при самото инфилтриране на листата молекулите на хербицидите диурон и атразин не достигат до ТМ. За постигането на инхибиращ ефект са нужни поне няколко минути. Определеното характеристично време показва, че проницаемостта на скоростопределящата бариера (допускаме, че това е плазмалемата) е по-висока за атразин отколкото за диурон. Практическият извод от наблюдението е, че при инфилтрация на листа трябва да се предвидят поне 30 min допълнително инкубиране, за да се уравни концентрацията в хлоропластите и да се получи стабилен, възпроизводим ефект на хербицидите.

Статистическо разпределение на параметрите

Често флуоресцентните параметри се отклоняват от нормалното разпределение (Lazár, Nauš, 1998) и стандартните параметрични методи за статистически анализ са неподходящи. От друга страна, честотното разпределение на ефект

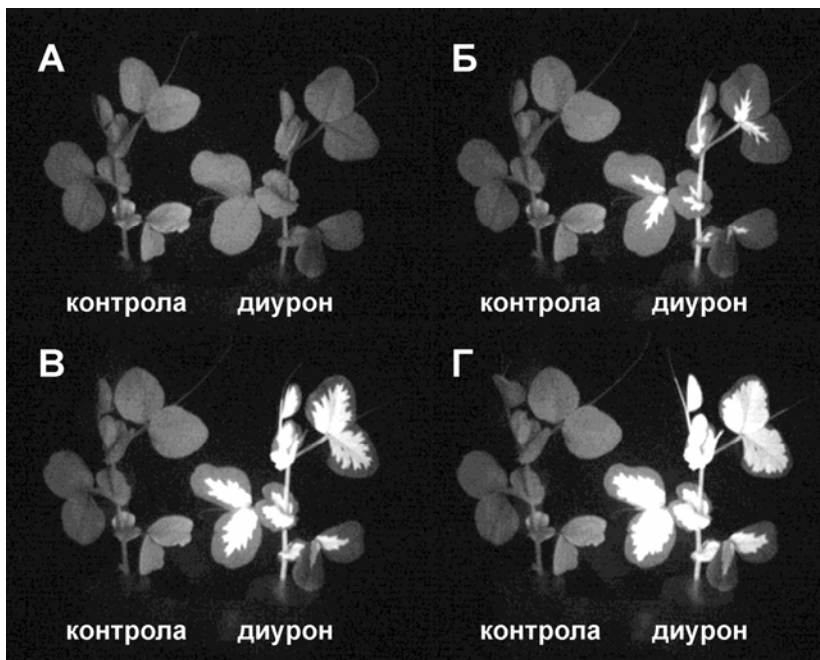
тите е потенциален източник на информация за отговора на индивидите към стресовия фактор (Burke et al., 1988).

Хистограмите на честотното разпределение на параметъра на БФ $1-V_j$ в контролни и третирани листа с различна възраст са представени на фиг. 11. Хистограмите на контролните листа показват нормално разпределение на параметъра. С добавянето на диурон разпределението силно се разширява, т.е. стандартното отклонение нараства неколкостранно. При това формата на разпределението чувствително се различава от нормалната (при всички третирани с диурон листа се установява достоверно отклонение според теста на Колмогоров – Смирнов). При концентрация $10 \mu\text{M}$ в 4-ти лист се вижда ясно, че разпределението е бимодално. Единият пик е практически при контролните стойности на параметъра. Това показва наличието на две субпопулации растения, различаващи се по тяхната възприемчивост към третирането. Една част от листата остават неповлияни и разпределението на $1-V_j$ в тях следва това в контролите. В другата субпопулация хербицидното действие се проявява и нейното честотно разпределение е отместено към средната стойност на $1-V_j$, съответстваща на инхибирани листа.

ФЛУОРЕСЦЕНТНИ ОБРАЗИ НА РАСТЕНИЯ, ТРЕТИРАНИ С ХЕРБИЦИДИ

Техниката на флуоресцентните образи беше използвана, за да се визуализира проникването на хербицидите в граховите растения и динамиката на инхибиране на фотосинтетичния ЕТ в листата от различни етажи. Експериментите осъществихме съвместно с проф. Рето Страсер и Роналд Малдонадо-Родригез с помощта на апаратура FluorCam в Лабораторията по биоенергетика към Женевския университет. За пръв път се проследява движението на хербициди в цели грахови растения чрез видеозапис на флуоресцентни образи.

На фиг. 12 са показани флуоресцентни образи на контролно и потопено в $6 \mu\text{M}$ диурон растение, заснети непосредствено след потапянето, 8 h, 16 h и 24 h по-късно. Флуоресценцията на контролното растение практически не се изменя за периода на измерването. Единствените видими разлики са в разлистването на най-младия, 4-ти лист. Растението, потопено в диурон, първоначално не се различава от контролното, но на втората снимка (фиг. 12Б) се виждат ясно инхибираните места, които се характеризират с по-интензивна флуоресценция (Fenton, Crofts, 1990; Genty, Meyer, 1994; Lichtenthaler et al., 1997). Диуронът се движи като фронт (Nedbal et al., 2000), в резултат на което се оформя пространствена хетерогенност, изразена в наличието на нормално функциониращи и инхибирани области с рязка граница между тях (Fenton, Crofts, 1990; Nedbal et al., 2000). Както се вижда от представените снимки, инхибирането на листата (и прилистниците) започва от централната жилка и напредва постепенно по страничните жилки и около тях (Genty, Meyer, 1994).



Фиг. 12. Флуоресцентни образи на грахови растения, потопени във вода или в $6 \mu\text{M}$ диурон. А - непосредствено след потапянето на растенията в разтвора; Б - след 8 h; В - след 16 h; Г - след 24 h. Образите са заснети с модифициран апарат FluorCam M690 (P.S. Instruments, Чехия). Флуоресценцията се възбужда с непрекъсната светлина с $\lambda = 635 \text{ nm}$ и след като премине през 700 nm интерференчен филтър се изобразява върху CCD камера, свързана с компютър.

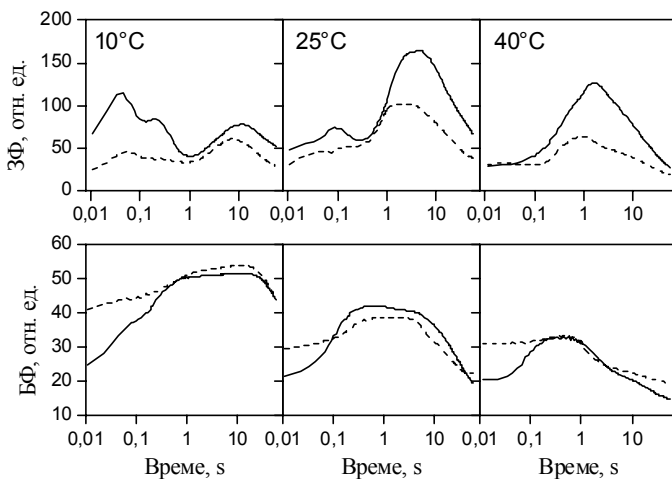
Съществена особеност е, че инхибирането на листата става в последователност отгоре надолу. Това е така, защото движението на диурона е толкова по-бързо, колкото по-високо се намират листата в растението, т.е. колкото по-млади са те. Тази зависимост ясно личи от снимки В и Г на фиг. 12 – относителната инхибирана площ намалява в реда 4-ти, 3-ти, 2-ри, 1-ви лист.

Флуоресцентните образи на растения, потопени в разтвор на атразин (не са показани) разкриха същите закономерности в движението на хербицида по стъблата и листата. Тези резултати се съгласуват с теорията за апопластен (ксилемен) транспорт на карбамидните и триазиновите хербициди. Двигател за поглъщането и разпространението на хербицидите е транспирационният ток и скоростта на поглъщане е пропорционална на скоростта на транспирация (Lund-Noie, 1969; Vostrál et al., 1970). За разлика от диурон и атразин, третирането с диносеб не доведе до видимо нарастване на флуоресценцията в листата.

ВЛИЯНИЕ НА НИСКИ И ВИСОКИ ТЕМПЕРАТУРИ ВЪРХУ ХЕРБИЦИДНИЯ ЕФЕКТ

ИК на БФ и ЗФ, регистрирани с FL-2006

Действието на температурата по време на регистрацията върху луминесцентните характеристики на листа от грах и хербицидния ефект беше изследвано чрез измерване на ИК на БФ и ЗФ при температури на листата от 5 до 40°C през интервал от 5°C. На фиг. 13 са представени ИК за контролни и обработени с 1 μM атразин листа при 5, 25 и 40°C. В необработени с хербициди листа се разкриват следните ефекти с увеличаване на температурата в интервала 5–30°C: 1) намалява амплитудата на бързата фаза (I_1 – I_2), а се увеличава амплитудата на бавната фаза (D_2 – I_4 – I_5); 2) съотношението между максимумите в бързата фаза I_1 и I_2 се измества полза на I_2 ; 3) максимумите на ЗФ постепенно се преместват напред във времето, особено в бавната фаза (от 10 s до 0,5 s за I_4). При нагряване до 40°C не се открива пикът I_2 и интензитетът на светенето в бавната фаза на ИК е намален. С повишаване на температурата намалява вариабилната флуоресценция. Формата на ИК на БФ се изменя главно заради по-бързото спадане на интензитета след максимума (по-ранно включване на процесите на гасене).



Фиг. 13. ИК на ЗФ (горе) и БФ (долу), регистрирани при температури 10, 25 и 40 °C от контролни листа (непрекъснати линии) или третирани с 1 μM атразин (пунктирни линии). Представени са средни криви от 6-10 повторения.

Нарастването на пика I_2 спрямо I_1 е резултат от ускоряването на ЕТ в акцепторната страна на ФС2 (Goltsev, Yordanov, 1997; Zaharieva et al., 2001). Максимумът в бавната фаза на ИК на ЗФ по всяка вероятност следва зависимостта на ΔpH от температурата (Marković et al., 1999). И двата показателя нарастват до 30°C, така че тази температура може да се счита като оптимална, при която скоростта на междусистемния ЕТ е най-висока. Подтискането на БФ и ЗФ над 35°C

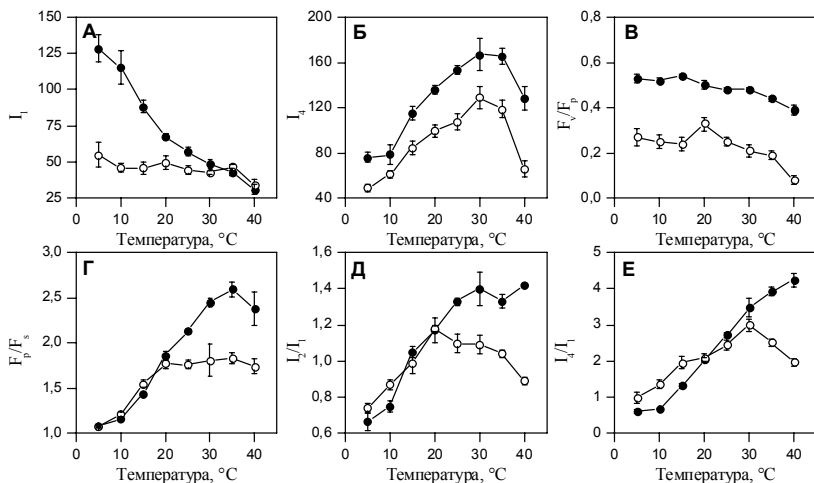
вероятно е свързано с нарушения в структурата на комплексите на ФС2, в резултат на които се инактивира тяхната функция. Аргументи за инактивирането на ФС2 са както намалената вариабилна флуоресценция, така и изчезването на пика I_2 . Прави впечатление, че в бавната фаза на ИК на ЗФ, регистрирана при 35°C и особено при 40°C, доминира пикът I_5 за сметка на I_4 . Този резултат може да бъде обяснен, ако се следва направеното по-рано предположение, че I_5 е свързан с отваряне на РЦ, а I_4 – с протонния градиент. Известно е, че при повишени температури енергетичният баланс между двете фотосистеми се измества към ФС1 (Weis, 1985), която е по-активна в такива условия (Ivanov, Velitchkova, 1990). Може да се допусне, че активирането на ФС1 води до окисляване на акцепторния пул на ФС2 и увеличава амплитудата на I_5 .

Интензитетът на ЗФ в присъствие на атразин е понижен в целия индукционен период; пикът I_2 е отслабен спрямо I_1 ; в бавната фаза на ИК се подтиква в по-голяма степен I_5 . Ефектът на хербицида върху ИК на БФ се изразява в покачване на началното ниво, съответно намаляване на вариабилната флуоресценция. Върху тези ефекти се наслаждава зависимостта на ИК от температурата, която не се различава качествено в контролните и инхибираните проби.

Въпреки общото впечатление за адитивност на ефектите на инхибитора и температурата върху ИК, комбинацията на двата фактора се характеризира с някоя особености. Най-очевидната е, че при ниски температури атразинът подтиква много по-силно бързата фаза на ИК на ЗФ, отколкото бавната. Обратно, над 30°C между контролните и третираните листа няма разлика в нивото I_1 , а само в I_4 – I_5 . Ако трябва да се разгледа влиянието на температурата върху ефекта на хербицида, може да се каже, че с увеличаване на температурата ефектът върху бързата фаза на ИК намалява, а върху бавната фаза (немонотонно) се увеличава.

Температурна зависимост на параметрите на БФ и ЗФ

По-детайлна представа за ефектите върху отделните фази на БФ и ЗФ може да се добие от температурните зависимости на индукционните параметри, представени на фиг. 14. Както се вижда от фигурата, температурата влияе различно върху параметрите на БФ и ЗФ в контролни листа. Максимумите I_1 (А) и I_4 (Б) имат противоположна зависимост от температурата в интервала 5–30°C. В резултат на това отношението I_4/I_1 (Е) монотонно нараства. Отношението I_2/I_1 , което е показател за скоростта на ЕТ в акцепторната страна на ФС2 (Goltsev et al., 1998), също нараства с температурата, но не в целия изследван диапазон. Постепенното намаляване на вариабилната флуоресценция (Б) в целия температурен интервал би могло да се дължи на по-голямата скорост на тъмнинните реакции, в резултат на което по-голям дял от Q_A^- се намира в окислено състояние (Janssen, van Hasselt, 1994).



Фиг. 14. Зависимост на параметрите на БФ и ЗФ, изчислени за контролни листа (●) и третиранни с 1 μM атразин чрез стъблен транспорт (○), от температурата на регистрация. А - I_1 ; Б - I_2 ; В - F_v/F_p ; Г - F_p/F_s ; Д - I_2/I_1 ; Е - I_4/I_1 . Представени са средни стойности от 6-10 повторения; вертикалните черти изобразяват стандартната грешка.

Луминесцентните параметри като цяло имат сходни температурни зависимости в контролните и третираните с хербицид растения, но се забелязват и някои съществени различия. Нарастването на I_1 с понижаване на температурата, което е добре изразено в контролата, почти отсъства в обработените листа. Възможно е във формирането на I_1 да участва повече от един процес, като единият е нечувствителен към хербицидното действие и температурата – напр. електричният градиент. В такъв случай при високите температури този компонент ще бъде определящ амплитудата на I_1 и в двете експериментални групи.

При останалите изследвани параметри относителният ефект на хербицидите се изменя немонотонно с температурата, но общо се наблюдава увеличаване на ефектите при температури над 20°C и намаляване при ниски температури. Макар и да няма решаващо значение за проявата на инхибиторния ефект на диурон и атразин, температурата в известна степен модифицира тяхната активност в третираните листа. Статистическата достоверност на взаимодействието между двата фактора е определена чрез вариационен анализ поотделно за индукционните параметри на БФ и ЗФ. За повечето параметри взаимодействието е достоверно при ниво на значимост $\alpha = 0,01$. Единствено за I_4 не се установява достоверно влияние на температурата върху ефекта на атразин при $\alpha = 0,05$, а влиянието върху ефекта на диурон е достоверно за всички параметри.

В дисертацията е представено също влиянието на температурата върху отделните кинетични компоненти на ЗФ, разделени чрез регресионен анализ на кривите на затихването на ЗФ. Температурните зависимости на амплитудите на

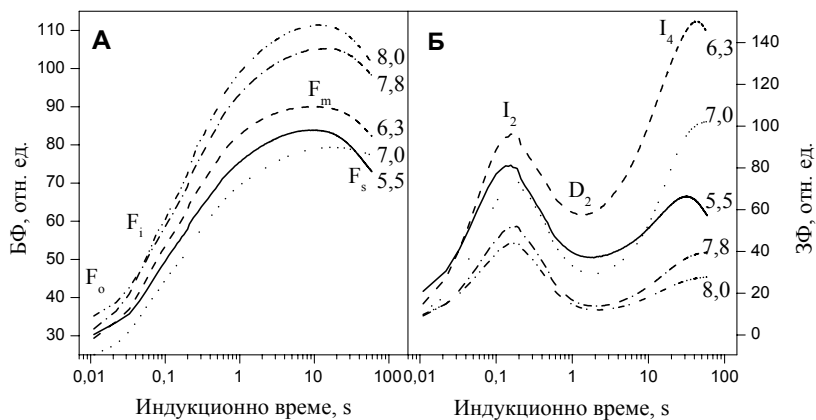
трите компонента по време на бързия максимум на ИК съществено се различават. Става ясно, че нарастването на ЗФ в бързата фаза на индукцията с понижаване на температурата е за сметка на милисекундния компонент, който е доминиращ в общото светене, регистрирано при 5–10°C. Показано е, че при ниски температури хербицидите подтискат силно милисекундния компонент. Точно тази е причината за изявения хербициден ефект върху бързата фаза (I₁) на ИК при температури под стайната.

Анализът на температурната зависимост на луминесцентните параметри в контролни и третирани с хербициди растения сочи, че моментната температура не е от критично значение за свързването на хербицидите с участъка, но има определено влияние върху инхибиторния ефект. Това би могло да означава, че действието на температурата не се ограничава само върху скоростта на окислително-редукционните реакции, но има и структуроопределяща роля за комплексите на ТМ. В интервала 20–30°C повишаването на температурата може би индуцира такива конформационни промени в хербицидното място на D₁ белтъка, които облекчават процеса на свързване на молекулите на диурон и атразин в него, или температурата прави сайта по-лабилен и с по-гъвкава конформация.

Влияние на рН върху хербицидния ефект

ИК на БФ и ЗФ на тилакоидни мембранни при различно рН

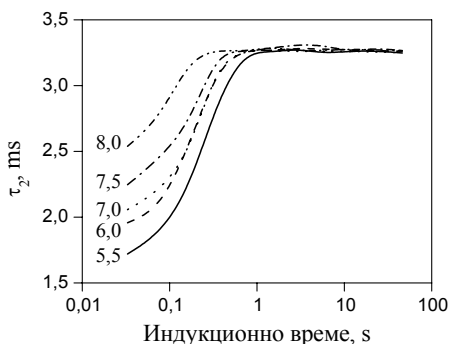
С изключение на някои особености, като сливането на максимумите на ЗФ I₁ и I₂ и забавянето на максимума на БФ, ходът на ИК на БФ и ЗФ в суспензии от ТМ (фиг. 15) следва същите закономерности както в цели листа. В контролните хлоропласти рН на средата влияе главно върху характеристиките на ЗФ. Общият интензитет на светенето е най-силен при рН 6,3 и намалява с промяна реакцията на средата към по-кисела или по-алкална. Максимумът в бавната фаза на индукцията е по-чувствителен към влиянието на рН, отколкото максимума в бързата фаза. Резултатите потвърждават известните факти, че в изследвания диапазон от стойности фотохимичната ефективност на ФС2 не се изменя (van Gorkom et al., 1976; Schatz, Witt, 1984), а скоростта на ЕТ е максимална при рН 6–7 (Ben-Nayyim et al., 1976; Barr, Crane, 1980).



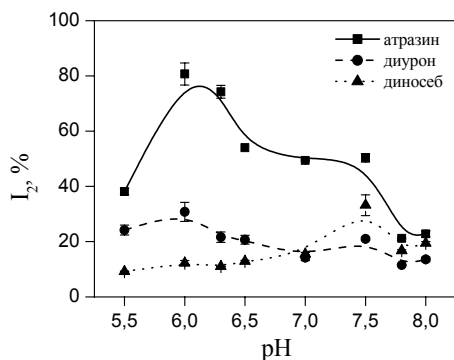
Фиг. 15. Индукционни криви на БФ (А) и ЗФ (Б) от контролни ТМ в среди с различно рН. Тилакоидите са суспендирани в среда съдържаща 25 mM MES/HEPES, 5 mM MgCl₂, концентрация на хлорофила 30 μg.ml⁻¹.

Влияние на рН върху времето на затихване на ЗФ

Ефектът на рН върху отделните компоненти на кинетиката на ЗФ по време на индукционния период е изследвано за пръв път. От фиг. 16 се вижда, че рН не оказва влияние върху характеристичното време на милисекундния компонент τ_2 в бавната фаза на ИК, т.е. когато ПХ е вече редуциран. Същевременно началната стойност на τ_2 нараства с увеличаване стойността на рН. Липсата на ефект в бавната фаза на индукцията може да се изтълкува с това, че рН не влияе върху скоростта на обратната реакция към Q_A . За да напусне Q_B -участъка обаче ПХ трябва да се протонира, следователно кинетиката на реакцията би трябвало да зависи от рН. Допускаме, че повишаването на τ_2 с алкализиране на средата е отражение на забавеното протониране на Q_B .



Фиг. 16. Влияние на рН върху характеристичното време на милисекундния компонент на ЗФ τ_2 , изчислен чрез регресия на кривите на тъмнинно затихване на ЗФ, регистрирани по време на индукционния период в контролни хлоропласти от грах.

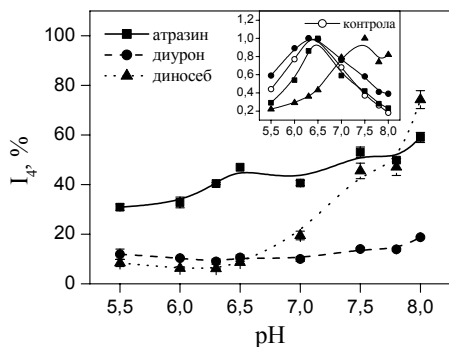


Фиг. 17. Влияние на рН върху максимума на ЗФ I₂, регистриран в тилакоидни мембрани, суспендирани в 10⁻⁶ М атразин, 10⁻⁶ М диурон или 10⁻⁵ М диносеб. Данните са представени като процент от контролата. Вертикалните черти представят стандартни грешки, изчислени от 3-5 повторения.

Зависимост на ефекта на хербицидите от рН

Ефектът на хербицидите е отчетен по изменението на индукционните параметри на БФ и ЗФ. В дисертацията са изложени рН-зависимостите на I₂, I₄, (I₄-D₂)/D₂ и F_v/F_p за хербицидите диурон, атразин и диносеб. На фиг. 17 е показана зависимостта на I₂, като стойностите са нормирани спрямо контролата. И трите изследвани вещества понижават максимума при всички стойности на рН, но кривите показват, че ефектът силно зависи от реакцията на средата. Хербицидите атразин и диурон понижават стойността на I₂ най-силно в алкална среда – рН 8 и ефектът намалява при по-ниски стойности на рН. Ефектът на диурон е минимален при рН 6,3, а на атразин – при рН 6,5, но ходът на рН-кривата е подобен за двата инхибитора. Най-силно подтискане на I₂ от диносеб се установява при кисели рН, а минималното отклонение от контролата е при рН 7,5. Подобен вид имат рН-зависимостите на отношението F_v/F_p.

Зависимостта на хербицидният ефект върху максимума в бавната фаза на ИК на ЗФ от рН (фиг. 18) има доста различен ход, изразяващ се в монотонно нарастване на параметъра (намаляване на ефекта) с увеличаване на рН. В присъствие на инхибитори като цяло се подтиска генерирането на трансмембранен протонен градиент. Скоростта на ЕТ и ΔрН обаче не са линейно свързани. Дори и при значително инхибиране на ЕТ, ΔрН може да се образува от оставащата част преминали между двете фотосистеми електрони, или от цикличен ЕТ около ФС1. В такъв случай енергизацията на мембраната, съответно височината на I₄ ще зависи силно от рН на средата. Отношението (I₄-D₂)/D₂ нараства почти експоненциално с увеличаване на рН (броят електрони, необходим за генериране на ΔрН, намалява с порядък при увеличаване на рН с 1).



Фиг. 18.

Влияние на рН върху максимума на ЗФ I₄, регистриран в тилакоидни мембрани, суспендирани в 10⁻⁶ М атразин, 10⁻⁶ М диурон или 10⁻⁵ М диносеб. Данните са нормирани спрямо контролата. Вмъкнатата графика изобразява истинските (ненормирани) височини на максимума.

Представените резултати доказват, че ефектът на хербицидите в ТМ зависи от рН на външната среда. Предполагаме, че в основата на това влияние лежат предизвикани от рН конформационни промени в белтъците на ФС2, засягащи Q_B-участъка на D1. Промяна в конформацията на хербицидният участък може да увеличи или намали афинитета към хербицидите (Vasil'ev, Venediktov, 1993). При определена стойност на рН хербицидният участък има конформация, която ограничава свързването с даден хербицид, т.е. РЦ се характеризират с оптимална устойчивост. Стойността на рН, която отговаря на устойчива конформация на Q_B-мястото, е строго специфична към съответния инхибитор и то най-вече към типа на свързване с участъка – Ser₂₆₄ или His₂₁₅. Хербицидите от „серинов“ тип – диурон, атразин – инхибират ЕТ най-ефективно в алкална среда, а от „хистидинов“ тип – диносеб – в кисела.

ИЗВОДИ

1. Величината луминесцентен потенциал, изведена теоретично и изчислена от експерименталните стойности на БФ и ЗФ, разкрива, че в първата секунда от индукционния период промените в БФ и ЗФ са свързани с фотохимично гасене, а след това в рамките на първата минута – нефотохимично гасене.
2. Анализът на хербицидното действие върху ИК на БФ и ЗФ показва, че максимумите I_1 и I_4 са зависими от трансмембрания потенциал, а в I_2 и частично в I_5 има влияние ЕТ и окислително-редукционното състояние на електронните акцептори на ФС2.
3. Действието на хербициди на ФС2 може да се определи количествено в интактни листа чрез анализ на ИК на БФ и ЗФ. Параметрите I_4 , F_v/F_p и $1-V_j$ са подходящи показатели за хербицидния ефект. Индексите на полуинхибиране, изчислени от концентрационните криви на съответните параметри, са сравнителен критерий за ефективността на хербицидите или чувствителността на пробите.
4. Ефективността на хербицидите зависи от метода на тяхното прилагане. Сравнителното изследване на трите метода – листна дифузия, инфилтрация и стъблен транспорт, показва, че най-ефективният метод за третиране с карбамидни и триазинови хербициди е стъбленият транспорт.
5. Действието на хербицидите зависи от условията на третирането и от физиологичното състояние на листата. Ефектът е по-голям в по-младите листа, защото те поглъщат хербицидите по-активно. За повишаване на ефекта способства облъчването с по-висок светлинен интензитет по време на третирането.
6. Статистическата дисперсия на измерените параметри силно се увеличава в листа, третирани с диурон чрез листна дифузия, а при междинни хербицидни концентрации честотното разпределение е бимодално – една част от пробите в извадката остават неповлияни от действието на хербицида.
7. Транспортът на хербицидите в растителните тъкани и динамиката на инхибирането на фотосинтезата в тях могат да се проследяват чрез видеозапис на флуоресцентни образи. Разпространението на атразин става с по-голяма скорост в сравнение с диурон, а инхибирането от диносеб не може да се установи с този метод.
8. Параметрите на БФ и ЗФ в контролни листа и относителният ефект на хербицидите върху тях зависят от температурата на регистрацията. Общо се наблюдава усилване на хербицидната активност около стайната температура.
9. Инхибиращият ефект на хербицидите в изолирани тилакоидни мембрани се модифицира от рН на суспензионната среда. Зависимостта на хербицидния ефект от рН е еднаква за хербицидите, свързващи се със Ser₂₆₄, и различна за двете суперфамилии – Ser₂₆₄ и His₂₁₅.

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Създадена е компютърна програма за обработка и анализ на ИК на БФ и ЗФ, регистрирани с флуориметър FL-2006.
2. Дефинирана е величината луминесцентен потенциал, равна на сумата от окислително-редукционния потенциал на Q_A и трансмембрания електрoхимичен градиент, и е показано, че тя може да се изчисли от експерименталните стойности на БФ и ЗФ и да се използва за разкриване природата на процесите по време на индукционния период.
3. Изяснено е действието на хербицидите на ФС2 върху ИК на милисекундната ЗФ в интактни листа и е показано, че ИК на ЗФ могат да се използват като количествен метод за определяне на хербицидния ефект.
4. Установено е предимството на стъбления транспорт за въвеждане на урея/триазинови хербициди в листа от грах пред пасивната дифузия през листа и инфилтрацията и е разработен метод за определяне на хербицидната чувствителност (хербицидната ефективност), включващ третиране на растенията, измерване на БФ и ЗФ и изчисляване на индекс на полуинхибиране.
5. За пръв път са заснети динамични образи на флуоресценцията на цели грахови растения, третирани с фотосинтетични хербициди. Определена е кинетиката на инхибиране на фотосинтезата в листата от хербицидите атразин и диурон.
6. Установено е, че колкото по-млади са листата в едно растение, толкова по-силна е тяхната хербицидна чувствителност. Предполага се, че това се дължи на по-активното поглъщане на хербицидите от младите листа, в резултат на което хербицидната концентрация в хлоропластите е по-висока.
7. Определена е температурната зависимост на хербицидния ефект върху различни параметри на БФ и ЗФ. Посочено е, че при ниски температури хербицидите атразин и диурон инхибират в най-голяма степен милисекундния компонент на ЗФ, което е причината за увеличения ефект в бързата фаза на индукцията.
8. Разкрита е зависимостта на ефекта на хербицидите на ФС2 в изолирани тилакоидни мембрани от рН на суспензионната среда. Показано е, че видът на рН-зависимостта е специфичен за Ser₂₆₄ и His₂₁₅-свързващи хербициди.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

Публикувани статии

1. Lambrev, P., V. Goltsev. 1999. Temperature affects herbicide-sensitivity of pea plants. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 25, 54-66
2. Lambrev, P., V. Goltsev. 2001. pH dependence of the effects of diuron, atrazine and dinoseb on the luminescent properties of thylakoid membranes. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 27, 85-100
3. Goltsev, V., I. Yordanov, D. Stefanov, I. Zaharieva, P. Lambrev, R. J. Strasser. 2001. Simultaneous analysis of variable and delayed chlorophyll fluorescence during induction period in photosynthetic apparatus. *Proc. 12th Int. Congr. Photosynthesis*, CSIRO Publishing, Colingwood
4. Lambrev, P., S. Ivanov, V. Goltsev. 2003. Effects of prolonged action of sub-herbicide concentrations of atrazine on the photosynthetic function of pea plants. *CR Acad. Bulg. Sci.*, 56, 59-62
5. Goltsev, V., I. Zaharieva, P. Lambrev, I. Yordanov, R. J. Strasser. 2003. Simultaneous analysis of prompt and delayed chlorophyll *a* fluorescence in leaves during the induction period of dark to light adaptation. *J. Theor. Biol.*, 225, 171-183

Предадени статии

6. Lambrev, P., V. Goltsev, R. Maldonado-Rodriguez, R. J. Strasser. Prompt and delayed chlorophyll fluorescence analysis of intact pea leaves treated with photosynthetic herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.*

ПУБЛИКУВАНИ РЕЗЮМЕТА ОТ УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Гольцев, В., П. Ламбрев. 1999. Ефект на температурата върху хербицидната чувствителност на фотосинтетичния апарат в листа грах. Осма научна сесия на Биологическия факултет на СУ “Св. Климент Охридски”, май 1999, София.
2. Ламбрев, П., Ц. Марков, В. Гольцев. 2001. Влияние на светлината върху хербицидния ефект на диурона при *in vivo* третиране. Девета научна сесия на Биологическия факултет на СУ “Св. Климент Охридски”, ноември 2001, София.
3. Ламбрев, П., В. Гольцев. 2001. рН-индуцирани промени на хербицидната чувствителност на диурон, атразин и диносеб в тилакоидни мембрани от грах. V национален конгрес по биохимия, биофизика и молекулярна биология, март 2001, София.

4. Goltsev, V., I. Yordanov, D. Stefanov, I. Zaharieva, P. Lambrev, R. J. Strasser. Simultaneous analysis of variable and delayed chlorophyll fluorescence during induction period in photosynthetic apparatus. 12th International Congress of Photosynthesis, August 2001, Brisbane, Australia.
5. Katerova, Z., S. Ivanov, P. Lambrev, V. Goltsev, E. Karanov. 2002. Effect of residual atrazine concentrations on chlorophyll fluorescence parameters, growth and chlorophyll content of pea plants (*Pisum sativum* L.). 13th Congress of FESPP, September 2002, Heraclion, Greece.
6. Lambrev, P., V. Goltsev. 2002. Activity of photosynthetic herbicides in intact pea leaves measured by prompt and delayed chlorophyll fluorescence. ESSA Workshop, September 2002, Varna, Bulgaria.
7. Goltsev, V., I. Zaharieva, P. Lambrev, P. Chernev, Ch. Slavov, I. Yordanov, R. J. Strasser. 2003. Analysis of millisecond dark relaxation kinetics of chlorophyll a delayed fluorescence in leaves during the induction period of dark to light adaptation. 13th Balkan Biochemical Biophysical Days and Meeting on Metabolic Disorders, November 2003, Kusadasi, Turkey.
8. Lambrev, P., V. Goltsev, R. J. Strasser. 2003. Prompt and delayed chlorophyll fluorescence of intact leaves in the presence of photosynthetic herbicides. 13th Balkan Biochemical Biophysical Days and Meeting on Metabolic Disorders, November 2003, Kusadasi, Turkey.
9. Lambrev, P., V. Goltsev, R. J. Strasser. 2003. The effect of temperature on the sensitivity of Photosystem 2 to the herbicide atrazine applied *in vivo*. Десета юбилейна научна сесия на Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“, ноември 2003, София.