СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ" БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ Катедра "Биофизика и радиобиология"

Петър Харалампиев Ламбрев

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

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на научната и образователна степен "доктор"

специалност 01.06.08 – биофизика

научен ръководител доц. д-р Василий Николаевич Гольцев

София, 2003 г.

Благодаря на научния си ръководител, доц. д-р Василий Гольцев, затова, че ми помогна винаги, когато имах нужда, без никога да ме лиши от свобода и избор.
Благодаря на доц. д-р Виржиния Долчинкова, Мая Ламбрева, Сергей Иванов, проф. Рето Страсер, Роналд Малдонадо-Родригез и проф. Иван Йорданов
за съдействието при експерименталната работа и полезните дискусии и съвети.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	5
УВОД	6
ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД	8
УСТРОЙСТВО И ФУНКЦИОНИРАНЕ НА ФОТОСИНТЕТИЧНИЯ АПАРАТ ПРИ ЗЕЛЕНИТЕ РАСТЕНИЯ	8
Организация на тилакоидната мембрана	
Структура на светлосъбиращия комплекс 2	13
Фотосистема 2	13
Фотосистема 1, цитохром b ₆ f и АТФ-синтетаза	17
Трансформация на енергията в тилакоидните мембрани	17
Стрес и адаптация	
Дефиниция за растителен стрес	22
Термодинамична концепция за стреса	23
Влияние на светлината върху фотосинтезата	24
Балансиране на енергетичния поток към двете фотосистеми	24
Ксантофилов цикъл	
Фотоинхибиране на ФС2	27
ДЕЙСТВИЕ НА ТЕМПЕРАТУРАТА ВЪРХУ ФОТОСИНТЕЗАТА	
Действие на високи температури	29
Действие на ниски температури	
Хербициди, действащи на фотосистема 2	
Механизъм на действие	
Класификация на хербицидите на ФС2	
Молекулни взаимодействия в хербицидното място	
Специфично и неспецифично свързване	
Абсорбция и транслокация на хербицидите	
Влияние на температурата върху хербицидния ефект	
Луминесцентни свойства на фотосинтезиращите организми	
Флуоресценция	
Биофизични основи на флуоресцентното излъчване от хлоропластите	
Индукция на флуоресценцията	41
Забавена флуоресценция	46
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	56
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	58
Растителен материал	

Отглеждане на грахови растения	
Изолиране на тилакоидни мембрани	
Обработка с хербициди	
Разтвори на хербициди	
Третиране на листа с хербициди чрез дифузия	
Третиране на листа с хербициди чрез инфилтрация	60
Третиране на цели растения през стъблото	60
Третиране на тилакоидни мембрани с хербициди	60
Отчитане на ефектите	61
Едновременна регистрация на ИК на БФ и ЗФ	61
Регистрация на ОЈІР криви с флуориметър HandyPEA	
Флуоресцентни образи	65
Обработка на резултатите	
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	69
Луминесцентни характеристики на листа от грах	
Изменение на БФ и ЗФ по време на индукцията	69
Луминесцентен потенциал	
Кинетика на затихването на ЗФ	77
Ефекти на хербицидите върху БФ и ЗФ	
Влияние на хербицидите върху ИК на БФ и ЗФ	
Концентрационни криви на параметрите на ИК на БФ и ЗФ	97
Влияние на хербицидите върху кинетиката на затихване на ЗФ	
Фактори, влияещи върху хербицидната активност	
Флуоресцентни образи на растения, третирани с хербициди	
Влияние на ниски и високи температури върху хербицидния ефект	
Влияние на рН върху хербицидния ефект	
ИЗВОДИ	
ЛИТЕРАТУРА	145

Използвани съкращения

ATΦ	аденозинтрифосфат
АЦП	аналогово-цифров преобразувател
БΦ	бърза флуоресценция
ET	електронен транспорт
3Ф	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
$\Phi\Phi$	феофитин
хл.	хлорофил

УВОД

Един поглед върху последните открития, направени в началото на 21-ви век в областта на фотосинтезата, показва колко далече е съвременната наука от пълното разбиране на процеса, доставящ химичната енергия и атмосферния кислород, необходими за живота на планетата. Доскоро общоприети догми за свойствата на фотосинтетичния апарат се отхвърлят с откриването на нови фактори или взаимоотношения. Нерядко се оказва, че процеси, които са установени чрез изследване на изолирани моделни системи, протичат по различен начин в интактния организъм или нямат значима роля *in vivo*. Затова е важно развитието на недеструктивни методи за изучаване на фотосинтезата, които носят информация за работата на фотосинтетичния апарат в нативни условия.

Луминесцентните методи, в т.ч. индукцията на флуоресценцията и забавената флуоресценция на ФС2, имат необходимите качества, за да бъдат използвани за изучаване 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 хербицидния 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 осъществяване на хербицидния ефект. Класическите радиоизотопни методи за проследяване на поглъщането и транспорта на хербицидите от целите растения са изключително трудоемки, скъпоструващи и често недостъпни. Индукционните флуоресцентни методи и флуоресцентните образи могат да се окажат перспективна алтернатива.

В настоящата работа е анализирано действието на три хербицида, инхибиращи фотосинтезата – 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.

ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД

УСТРОЙСТВО И ФУНКЦИОНИРАНЕ НА ФОТОСИНТЕТИЧНИЯ АПАРАТ ПРИ ЗЕЛЕНИТЕ РАСТЕНИЯ

Организация на тилакоидната мембрана

Ултраструктура на хлоропластите

Фотосинтетичните процеси при зелените растения се извършват в хлоропластите, които представляват специализирани клетъчни органели, обикновено овални, с диаметър 5–10 µm. Хлоропластите притежават двойна мембранна обвивка, ограничаваща хидрофилен матрикс – строма – и системата от вътрешни фотосинтетични мембрани – тилакоидни мембрани. Вътрешната мембрана на хлоропластната обвивка отговаря за транспорта на метаболити, липиди и белтъци и за синтез и процесинг на мембранни липиди, пигменти и белтъци. Стромата съдържа: копия на хлоропластната ДНК (пластом); РНК, рибозоми и ензими, осигуряващи белтъчния синтез (Jagendorf, Michales, 1990); ензимите от цикъла на Калвин – Бенсон, в частност рибулозобисфосфаткарбоксилаза-оксигеназа (Süss et al., 1993); ензими, свързани със синтез на липиди, порфирин, терпеноиди и други съединения (Senge, 1993). Често се натрупват скорбелни зърна и липидни капки (пластоглобули), включващи каротеноиди и пластохинони (Lichtenthaler, 1968).

Тилакоиди - гранални и стромални

Всички процеси от светлинната фаза на фотосинтезата – улавянето на светлинната енергия и превръщането ѝ в енергия на макроергични връзки (АТФ) и редуциращи еквиваленти (НАДФ.Н₂), са локализирани върху ТМ. В рамките на един хлоропласт се формира непрекъсната мембранна система, която затваря единен вътрешен обем – вътретилакоидно пространство или лумен (Thorne, Duniec, 1983). ТМ образуват две характерни структури (Arntzen, 1978) – дисковидни гранални тилакоиди с диаметър 0,3–0,6 µm, плътно подредени един над друг в цилиндрични пакети, наречени грани, и тилакоиди на стромата, които се свързват спираловидно с граналните тилакоиди (Mustárdy, Janossy, 1979; Staehelin, van der Staay, 1996), както е показано на фиг. 1. По този начин се осъществява връзката между отделните грани. При такава организация се обособяват

два типа участъци на ТМ – контактуващи (*appressed*), представляващи местата на плътно прилепяне на граналните тилакоиди, и неконтактуващи (*non-appressed*), включващи стромалните тилакоиди и периферните участъци на граните (Andersson, Anderson, 1980). Двата типа тилакоидни участъци се отличават по своя биохимичен състав и свойства (Albertsson, 1995).



Фиг. 1. Триизмерен модел на гранални тилакоиди. Показан е само един стромален тилакоид, оформящ спирала около двете грани. Тъмните отвори показват останалите възможни места на свързване със стромални тилакоиди. (Garab, Mustárdy, 1999)

Триизмерната структура на ТМ е изследвана чрез електронна микроскопия на серии от срезове (Paolillo, 1970) и потвърдена чрез сканираща (Mustárdy, Janossy, 1979) и *freeze-fracture* електронна микроскопия (Staehelin, van der Staay, 1996). Arvidsson и Sundby (1999) съставят компютърен модел, който може да покаже принципа на образуването на цялата система от грани чрез нагъване на една непрекъсната мембрана. Според модела елементарната единица на граните се състои от три тилакоидни диска, образувани от две срещуположни вгъвания на една мембранна двойка (фиг. 2а). Такива тилакоиди, подредени плътно един над друг, съставят граните. Всеки стромален тилакоид продължава в два гранални, което се вижда на електронномикроскопски снимки на хлоропласти.

Липиден състав на тилакоидната мембрана

Липидният състав на ТМ се различава значително от останалите растителни мембрани. Двата основни типа липиди – моногалактозилдиацилглицерол и дигалактозилдиацилглицерол – са уникални за тилакоидите на кислородотделящите фотосинтезиращи организми (Gounaris, Barber, 1983; Webb, Green, 1991). Те съставляват средно 85% от липидната фаза (Staehelin, van der Staay, 1996). Друг липид, който се среща само в ТМ (10%) е сулфохиновозилдиацилглицеролът, носещ един отрицателен заряд в неутрална среда (Minoda et al., 2002). Липидите имат относителна напречна асиметрия, като неутралните се намират в по-голямо количество (60%) в стромалния монослой, а сулфохиновозилдиациглицеролът е почти изцяло локализиран откъм лумена (Sundby, Larsson, 1985).



Фиг. 2. Топология на тилакоидната мембрана. а. Схема на образуването на гранални тилакоиди чрез нагъване на двойна ТМ. Вляво - елементарна единица получена чрез две срещуположни вгъвания. Вдясно - грана, представляваща пакет от три тилакоида подредени един над друг. По модела на Arvidsson и Sundby (1999). б. Разположение на петте основни белтъчни комплекса по ТМ. В контактуващите области се намират относително плоските от стромалната страна комплекси ФС2+ССК2, които могат да образуват двумерни кристали. Междумолекулните взаимодействия на ССК2 между два съседни тилакоида поддържат структурата на граните. ФС1 и АТФ-азният комплекс, които имат значителна част издадена към стромата, се локализират в периферията на граните и в стромалните тилакоиди. Цитохромният комплекс е равномерно разпределен по цялата мембрана. (Allen, Forsberg, 2001)

Пигментен състав

Фотосинтезата започва с поглъщане на светлината от фоточувствителните пигменти. При всички еукариотни фотосинтезиращи организми и при синьозелените водорасли основните пигменти са **хлорофили**. Хлорофилите са група съединения с обща химична структура, представляваща цикличен тетрапиролов пръстен, хлорин, с централен магнезиев атом (Hansen, 1991). Хлоринът се различава от хема още по наличието на пети изоцикличен пръстен. Кислородотделящите организми съдържат в най-голямо количество хл. a, който също изгражда реакционния център на ФС1 и ФС2. Зелените растения съдържат и хл. b, като съотношението a:b варира от 2 при хлоропласти от сенколюбив тип до 3,4 при хлоропласти от светлолюбив тип (Anderson, 1986). Хлорофилите в растителната клетка са нековалентно свързани с белтъци на ТМ, главно в светлосъбиращите антенни комплекси. Основната част от хл. b се намира в ССК2. Важна роля в ЕТ играят и деметализираните форми на хл. – феофитини. Феофитин a е първичният електронен акцептор на ФС2 (Klimov, Krasnovskii, 1981).

Абсорбционният спектър на хл. има два главни максимума– един в синята област (ивица Soret) и един в червената или близката инфрачервена област (Q-ивица). Те съответстват на електронни преходи от типа $\pi \rightarrow \pi^*$ в хлориновия цикъл (Hansen, 1991). Включването на хл. в белтъчните комплекси силно изменя техните спектрални свойства. Във всички случаи това води до батохромно изместване на най-дълговълновия максимум, понякога до 100 nm. Способността на хл. да флуоресцират и да пренасят енергията на възбуждане ще бъде обсъдена в следващите части.

Каротеноидите са пигменти, намиращи се у всички известни фотосинтезиращи организми, както и в много нефотосинтезиращи организми (Frank et al., 2000). Повечето представляват удължени молекули с полиизопренова верига, чиито спрегнати двойни връзки обуславят делокализирана π -електронна система. По-важните представители на каротеноидите в състава на зелените растения са β -каротен, виолаксантин, антераксантин, зеаксантин, лутеин и др.

Каротеноидите имат твърде необичайни спектрални свойства (вж. Blankenship, 2002). Преходът $S_0 \rightarrow S_1$ е забранен, а тяхната интензивна ивица на поглъщане в областта 400–500 nm е в резултат на преход до S_2 . Дезактивацията на възбуденото състояние при това е безизлъчвателна.

Каротеноидите имат няколко функции във фотосинтетичните системи. Те участват като спомагателни пигменти в улавянето на светлината, предавайки енергията на антенните хлорофили. Способността им да гасят триплетни състояния на хл. обуславя тяхната фотозащитна роля, тъй като те не позволяват взаимодействието на триплетите с кислород и образуването на токсичен синглетен кислород. Накрая, каротеноидите участват в регулацията на антенния пренос на енергия чрез ксантофиловия цикъл, разгледан подолу.

Белтъчни комплекси

Не само фотосинтетичните функции на ТМ, но и граналната ѝ структура се поддържат от нейните белтъци. При всички зелени растения те са организирани в пет основни надмолекулни трансмембранни комплекса: комплекс на фотосистема 2 (ФС2), включващ кислородотделящата система (КОС), светлосъбиращ комплекс на ФС2 (ССК2), цитохромен комплекс $b_6 f$, фотосистема 1 (ФС1), и АТФ-синтетазен комплекс. Тяхното разположение в липидния бислой има абсолютна асиметрия по отношение на двете страни на мембраната и относителна латерална асиметрия (фиг. 26). Двете фотосистеми са пространствено разделени (Boardman, Anderson, 1964) – ФС2 заедно със ССК2 се намират предимно в контактуващите области на граните, а ФС1 и АТФ-азният комплекс са практически изцяло в неконтактуващите области (Andersson, Anderson, 1980; Albertsson, 1995; Staehelin, van der Staay, 1996). Цитохромният комплекс се разпределя равномерно в ТМ (Anderson, 1992). За формирането и стабилизирането на граните основна роля играе ССК2 (Arntzen, 1978; Duniec et al., 1981). Смята се, че мембранната структура се дължи не на липидния компонент, а на белтък-белтъчните взаимодействия между светлосъбиращи комплекси, разположени на две контактуващи мембранни повърхности (Arvidsson, Sundby, 1999; Garab, Mustárdy, 1999; Allen, Forsberg, 2001). Не само пакетирането в грани, но и формирането на самия бислой е възможно единствено с помощта на ССК2 (Simidjiev et al., 2000; Lee, 2000). Алтернативен модел на разположението на комплексите в граните е предложен от Ford и съавт. (2002), които изолират фракции, обогатени отделно на ФС2 и ССК2, и микроскопски наблюдават ФС2 и ССК2 в две отделни равнини. Според тях комплексите на ФС2, намиращи се в един мембранен бислой, се свързват помежду си чрез ССК2 в съседен бислой.

Значението на латералното разделяне на фотосинтетичните компоненти не е добре изяснено. Счита се, че по този начин се регулира работата на двете фотосистеми, които са последователно свързани в една електрическа верига. За да се постигне оптимална производителност е необходимо балансирано подаване на светлинна енергия към тях (Anderson, Andersson, 1988; Trissl, Wilhelm, 1993). От друга страна, формирането на грани не е необходимо условие за нормалното функциониране на фотосинтетичната електронтранспортна верига (Allen et al., 1988). Друга хипотеза свързва граналната структура на хлоропластите с цикъла на репарация на ФС2 (Melis, 1991).

Структура на светлосъбиращия комплекс 2

ССК2 би могъл да се разглежда като част от комплекса на ФС2 или като отделен пигмент-белтъчен комплекс, поради способността му да мигрира независимо от ФС2. ССК2 е комплексът, намиращ се в най-голямо количество в ТМ и свързва повече от половината хлорофил (Kühlbrandt, 1994; Miller, 1994; Grossman et al., 1995). Структурата му е разрешена до 3.4 Å с електронна кристалография (Kühlbrandt et al., 1994). ССК2 кристализира и се разтваря в детергенти като белтъчен тример (Butler, Kühlbrandt, 1988). Предполага се, че *in vivo* белтъците на ССК2 също асоциират в тримери (Lyon, Miller, 1985). Три свързващи хлорофил полипептида, имащи 95% хомоложни последователности помежду си, изграждат субединиците на ССК2. Те са продукти на ядрените гени lhcb1, lhcb2 и lhcb3, с молекулни маси, съответно, 28 kDa, 27 kDa и 25 kDa (Grossman et al., 1995). Всяка субединица формира три трансмембранни α-спирали и свързва поне 12 хлорофилни молекули – 7 хл. а и 5 хл. b, две молекули каротеноид (лутеин), неоксантин и, вероятно, виолаксантин (Peter, Thornber, 1991; Hankamer et al., 1997). Каротеноидите, освен вече споменатата функционална роля, имат и структурна – стабилизират третичната структура на субединицата (Plumley, Schmidt, 1987; Paulsen et al., 1990). Изолираните ССК2 винаги съдържат и няколко липидни молекули, сред които дигалактозилдиацилглицерол и фосфатидилглицерол. Те са необходими за изграждането на тримерите и тяхната кристализация (Nussberger et al., 1993).

Фотосистема 2

Фотосистема 2 е един от най-големите белтъчни комплекси в природата и, поради своята уникална функция, един от най-изследваните (Critchley, 1996; Hankamer et al., 1997; Barber, Kühlbrandt, 1999; Diner, Rappaport, 2002).

Биохимичен състав

Холокомплексът се състои от най-малко 25 отделни полипептида, свързващи всички кофактори, необходими за фотохимично окисление на водата и редуциране на пластохинон, с обща молекулна маса от около 1000 kDa (заедно със ССК2). Повечето белтъци са кодирани в хлоропласта и според съответните им гени са означени PsbA–Z. В състава на ФС2 влизат и ядренокодираните белтъци на светлосъбиращия комплекс – Lhcb1–6.

В сърцето на ФС2 стои реакционният център (РЦ), съставен от белтъците D1 (PsbA, 32 kDa) и D2 (PsbD, 34 kDa). Изолираните РЦ със запазена фотохимична актив-

ност съдържат още субединиците α и β на цитохром *b*-559, означени съответно PsbE и PsbF и с молекулни маси 9 и 4 kDa, както и един белтък с маса 4,8 kDa – PsbI (Nanba, Satoh, 1987; Satoh, 1996). Реакционният център заедно с белтъците CP47 и CP43 (буквите CP означават *chlorophyll protein*, а цифрите показват молекулната маса), продукти на гените *psbB* и *psbC*, белтъците на кислородотделящата система PsbO (33 kDa), PsbP (23 kDa) и PsbQ (17 kDa) и редица малки субединици (под 10 kDa), съставят т.нар. **сърцевинен комплекс** на ФС2. Изолираните сърцевинни комплекси съдържат 40–60 молекули хл. *а* и около 10 β -каротен и имат способността да окисляват водата (Ikeuchi et al., 1985; Ghanotakis, Yocum, 1986; Satoh, 1996). Белтъците CP29 (Lhcb4), CP26 (Lhcb5) и CP24 (Lhcb6) изграждат **вътрешната (фокусираща) антена**, чрез която функционално се свързва сърцевинният комплекс със ССК2. Те се различават от белтъците на ССК2 по това, че не съдържат хл. *b* и не се свързват в тримери (Grossman et al., 1995).

Изучаване структурата на ФС2

Първоначалните предположения за пространствената организация на ФС2 са основани на сходството в първичната структура на белтъците D1 и D2 с L и M субединиците на РЦ на червените несерни фотосинтезиращи бактерии (Michel, Deisenhofer, 1988). Известна е атомната структура на РЦ на *Rhodopseudomonas viridis* (Deisenhofer et al., 1995) и *Rhodobacter sphaeroides* (Ermler et al., 1994). С отчитане на хомоложните области и компютърно минимизиране на енергията са създадени структурни модели на ФС2 (Trebst, 1986; Ruffle et al., 1992; Svensson et al., 1996; Xiong et al., 1996). Анализирайки електрохромни диференциални спектри, Mulkidjanian и съавт. (1996) предлагат модел на разположението на пигментите в РЦ на ФС2. Те отхвърлят наличието на "специална двойка" от екситонно спрегнати молекули хл. *а* като единица, съставяща Р680, както е при РЦ на пурпурните бактерии.

Експериментално получени данни за структурата на Φ C2 са публикувани от редица авторски групи, изследвали изолирани комплекси или субкомплекси на Φ C2 чрез електронна и криоелектронна микроскопия. Прилагат се два подхода – **анализ на единични частици** (Boekema et al., 1995; Hankamer et al., 1997; Boekema et al., 1999; Kuhl et al., 1999; Tsiotis et al., 1999; Nield et al., 2000) и **електронна кристалография** (Dekker et al., 1990; Holzenburg et al., 1993; Marr et al., 1996; Tsiotis et al., 1996; Morris et al., 1997; Stoylova et al., 1998; Hankamer et al., 1999; Stoylova et al., 2000; Ford et al., 2002). Найдобре разрешената структура, получена с електронна кристалография, е на част от сърцевинния комплекс, включваща D1, D2, цитохром *b*-559 и CP47 (комплекс РЦ–СР47) –

първоначално до 8 Å (Rhee et al., 1998), а понастоящем и до 6 Å (Rhee, 2001). Теоретични модели, включващи събраните структурни данни, съставят Xiong и съавт. (1998) и Barber и Kühlbrandt (1999).

Първата **рентгенова структура** с кристалографско разрешение 3,8 Å на нативен комплекс на ФС2 от *Synechococcus elongatus*, способен да отделя кислород, беше получена наскоро от Zouni и съавт. (2001). Въпреки че при тази разделителна способност не се разграничават страничните остатъци на полипептидните вериги, точно са установени всички α-спирали и β-структури, както и разположението на хлорофилните молекули. Потвърдено е структурното сходство между РЦ на ФС2 на кислородотделящите организми и РЦ на пурпурните бактерии, както и с ФС1.

Съвременен модел на организацията на ФС2

Комплексът на ФС2, свързан със ССК2, излиза извън повърхността на ТМ с 10 Å към стромата и 55 Å към лумена. Мембранната част е с дебелина 40 Å. Интересно е, че стромалната повърхност е почти плоска (Nield et al., 2000), способствайки междумолекулните взаимодействия и образуването на граните. Изолираните комплекси са димерни, вероятно такова е и нативното състояние на Φ C2 (Santini et al., 1994; Morris et al., 1997; Barber, 1998). Белтъците на реакционния център, D1 и D2, имат по пет трансмембранни α-спирали, означени A-Е и две малки периферни свързващи спирали – CD на луменалната страна, и DE на стромалната. D1 и D2 са разположени симетрично един спрямо друг, оформяйки характерна S-образна структура (фиг. 3). В образувания реакционен център се съдържат 3 двойки хл. а, 2 молекули ФФ а, 2 молекули каротеноид, 2 молекули пластохинон – Q_A и Q_B (при изолиране се губи Q_B), 1 атом нехемово желязо, 1 бикарбонатен йон. Една двойка хлорофилни молекули, P_{D1} и P_{D2}, разположени паралелно една спрямо друга (както при бактериалния РЦ) на разстояние 10 Å, перпендикулярно на мембраната, вероятно представлява Р680. Поради голямото разстояние между тях, не се осъществява екситонно спрягане и те могат да се разглеждат като отделни молекули, така че катионът $P680^{\bullet+}$ се образува на едната от тях, вероятно P_{D1} (Diner, Rappaport, 2002). В близост до D2 белтъка се разполагат двете субединици, α и β, на цитохром *b*-559, който е представен в единично копие. За този белтък се предполага, че предпазва ФС2 от фотоувреждане (Stewart, Brudvig, 1998).

Реакционният център D1–D2 е обкръжен от двете страни от антената на сърцевинния комплекс – белтъците СР47 и СР43, както е предположено от Barber и съавт. (1999), като СР47 е по-здраво свързан с РЦ (Ghanotakis, Yocum, 1990). Двата полипеп-

тида имат по 6 трансмембранни α -спирали (Bricker, 1990). Обемисти външни бримки свързват спиралите от луменалната страна. СР47 и СР43 свързват, съответно, 14 и 12 молекули хл. *а* и по 2–3 молекули β -каротен. Тяхната основна роля е в предаването на енергията на възбуждане от светлосъбиращия комплекс към РЦ. Наред с това се предполага, че участват в изграждането на **кислородотделящата система** (KOC) на донорната страна на ФС2 (Green, Durnford, 1996; Barber et al., 2000) чрез външните луменални бримки.



Фиг. 3. Структура на ФС2 от Synechococcus sphaeroides с означения на белтъчните субединици и кофакторите. Вляво - гледано откъм лумена, вдясно - гледано напречно на тилакоидната мембрана (луменалната част надолу). С елипса са оградени D1 и D2 белтъците, а с кръгове - антената на сърцевинния комплекс, CP47 и CP43. Схемата е взета от Zouni et al. (2001).

В зелените растения и водорасли КОС се състои от трите периферни белтъка PsbO– Q, поддържащи клъстер от четири манганови атома, хлорни и калциеви йони и един бикарбонатен йон. Полипептидът с молекулна маса 33 kDa PsbO, наречен Мпстабилизиращ (Murata, Miyao, 1985), се открива също в синьозелените водорасли, но останалите два белтъка са заменени (Shen, Inoue, 1993). Мангановият клъстер е идентифициран непосредствено до D1 белтъка, който предоставя тирозиновия лиганд Y_Z (Tyr₁₆₁) – електронен донор на P680.

Периферно на сърцевинния комплекс при зелените растения се намират белтъците на **вътрешната антена**, CP29, CP26 и CP24. Те имат голяма степен на хомоложност с белтъците на външните антенни комплекси и вероятно имат сходна структура с три трансмембранни спирали, но не се откриват агрегирани в тримери.

Фотосистема 1, цитохром b₆f и АТФ-синтетаза

Пространствената структура на Φ C1, изолирана от синьозелени водорасли, е определена чрез рентгенова кристалография (Fromme, 1996; Schubert et al., 1997; Jordan et al., 2001). Останалите два белтъчни комплекса имат аналози в митохондриалните мембрани, чиито структури са известни. Така цитохромният комплекс b_6f е аналогичен на комплекса bc_1 в мембраните на пурпурни бактерии (Berry et al., 2000) и митохондрии (Xia et al., 1997), а АТФ-синтетазният комплекс CF₀-CF₁ има сходство с митохондриалната АТФ-синтетаза F₀-F₁. Кристалографски е определена структурата на каталитичната "шапка" F₁ (Abrahams et al., 1994), а наскоро и на голяма част от мембранния канал F₀ (Stock et al., 1999).

Трансформация на енергията в тилакоидните мембрани

В светлинната фаза на фотосинтезата ТМ превръщат енергията на светлинните кванти в химична под формата на АТФ и НАДФ.Н₂. Светлината се улавя от пигментите на антенните комплекси на двете фотосистеми и те (пигментите) преминават във възбудено състояние. Енергията на възбуденото състояние се предава на реакционния център, където се осъществява фотохимична реакция. Електроните, избити от РЦ, преминават през поредица от преносители с нарастващ окислително-редукционен потенциал, изграждащи електронтранспортната верига. Според т.нар. Z-схема на електронния транспорт (Hill, Bendall, 1960), илюстрирана на фиг. 4 по-долу, пътят на електроните включва последователно Φ C2, цитохромния комплекс и Φ C1. Крайният акцептор за електрони е НАД Φ , който се използва за редукция на CO₂ в тъмнинната фаза. Химична енергия за този процес доставя АТ Φ . Според хипотезата на Митчел, при ЕТ енергията се съхранява под формата на трансмембранен електрохимичен протонен градиент, който служи за синтез на АТ Φ .

Абсорбция на светлината и миграция на енергията на възбуждане

Всички хлорофилсъдържащи фотосинтезиращи организми притежават светлосъбиращи антенни системи, които улавят светлинните кванти и пренасят тяхната енергия към реакционни центрове (Green, Parson, 2001). Теорията, с която би могъл да се обясни механизмът на такова пренасяне, е създадена от Thomas Förster (1965).

Фьорстеровият механизъм за миграция на енергията на възбуждане, наричан още *индуктивно-резонансен*, представлява безизлъчвателен пренос между пигменти, разположени на разстояние до няколко нанометра, при което няма припокриване на молекулните орбитали и обмен на електрони. Ефективността на преноса зависи от разстоянието $(1/R^6)$, интеграла на припокриване на спектъра на излъчване на донорната молекула и абсорбционния спектър на акцепторната молекула (условие за резонанс), и относителната ориентация на диполните моменти на прехода на двете молекули (Cantor, Schimmel, 1980; van Grondelle, Amesz, 1986). Миграцията на енергия по безизлъчвателен механизъм е един от конкурентните пътища за релаксация на възбуденото състояние и следователно намалява неговото време на живот.

Когато пигменти с еднакви електронни нива са разположени много близо един до друг (< 1 nm), те взаимодействат помежду си по механизъм, наречен *екситонно спрягане* (van Armerongen et al., 2000). При това между тях може да се осъществява бърза изоенергетична миграция на възбудната енергия. Трябва да се отбележи, че няма фундаментални разлики във физичния механизъм на екситонния и индуктивно-резонансния пренос (Knox, Gulen, 1993).

Преглед на кинетичните модели на енергетичния пренос в светлосъбиращите антенни комплекси и спрягането с реакционния център е направен от van Grondelle и съавт. (1994). За фотосинтезиращите бактерии, както и за ФС1 е възприет модел, според който лимитиращ етап в процеса на улавяне на енергията е преносът между антената и РЦ. Кинетиката на ФС2 се интерпретира обикновено въз основа модела на обратимата радикалова двойка, развит от Schatz и съавт. (1988). Според него възбужданията могат многократно да достигнат реакционния център и да се осъществи първично разделяне на заряда. Реакцията е обратима и при рекомбинация възбуждането може да се върне в антената. Моделът поставя фотохимичната реакция, а не спрягането на антената с РЦ като скоростоопределящ етап за ФС2.

Тази концепция в последно време се преразглежда в светлината на новооткритата кристална структура на ФС2 (Zouni et al., 2001). Vasil'ev и съавт. (2001) посочват два хл., С12 и С30, свързани със, съответно, СР43 и СР47, като пигментите, осъществяващи електронния пренос към РЦ. Разстоянието между тях и РЦ обаче би трябвало да обуславя относително ниска скорост на миграция (100 ps). Следователно лимитиращият стадий при ФС2 може би е преносът между антената и РЦ, както е при ФС1 и фотосинтезиращите бактерии, а не разделянето на заряда в РЦ.



Фиг. 4. Линеен електронен транспорт в тилакоидната мембрана и фотофосфорилиране. Означения: ПХ пластохинон, ФФ - феофитин, ПЦ - пластоцианин, Фд - фередоксин, ФНР - фередоксин:НАДФ оксидоредуктаза.

Електронен транспорт

Основна роля във фотосинтезата има линейният ЕТ (фиг. 4), който включва последователно двете фотосистеми и осигурява растението с АТФ и редуциращи еквиваленти за фиксацията на СО₂.

Първичната фотохимична реакция на ФС2 представлява отдаване на електрон от хлорофила на реакционния център P680 на първичния акцептор феофитин, I (Klimov, Krasnovskii, 1981), при което се получава P680⁺Г. Реакцията се осъществява за няколко ps (Greenfield et al., 1997; Whitmarsh, Govindjee, 1999). Стабилно разделяне на заряда става при последващо отдаване на електрона на първичния хинонов акцептор Q_A (200 ps). Катион-радикалът P680⁺ приема електрон от вторичния донор Y_Z (свързан с KOC) в рамките на 200 ns. Здраво свързаният с D2 белтъка Q_A функционира като едноелектронен преносител, докато следващият хинонов акцептор Q_B се редуцира двукратно от Q_A . В процеса на редукция на Q_B е възможно участието на нехемов железен катион, както и на бикарбонатен анион (van Rensen et al., 1999). Алтернативно, нехемовото желязо би могло да има само структурна роля (Blankenship, 2002). $Q_B^{2^-}$ свързва два протона от стромата, превръщайки се в хинол, и напуска Q_B -участъка на D1.

Редуцираният ПХ се движи свободно в липидната фаза на ТМ, пренасяйки електроните между Φ C2 и цитохромния комплекс b_6f . Цитохромният комплекс има две спе-

цифични места за свързване с ПХ – Q_0 от страната на лумена и Q_i в близост до стромата. Според хипотезата за участие на ПХ в Q-цикъл, сайтът Q_0 окислява редуцирания ПХ, като единият електрон се пренася през железосерния белтък на Риске, а другият се връща чрез Q_i отново на ПХ (Hauska et al., 1996). Протоните се освобождават от цитохром b_6 в лумена. Ако Q-цикълът е валиден за ПХ, то за два електрона пренесени от ФС2 на цитохромния комплекс, ще се транспортират два протона от стромата в лумена. Такова съотношение обаче не винаги може да се установи в хлоропласти (Hope, 1993).

Фотохимичната реакция на ФС1 представлява редукция на A_0 (хл. *a*) от реакционния център, Р700, с характеристично време 2 ps (Chitnis, 2001). В следващите 25 ps електронът преминава на вторичния акцептор A_1 (филохинон) и за 200 ns на F_X – един от трите характерни за ФС1 железосерни клъстера от типа 4Fe–4S, намиращ се между белтъците PsaA и PsaB. Останалите два клъстера са F_A и F_B – свързани с PsaC (Golbeck, 1992; Hiyama, 1997). Вероятният път на електроните е $F_X \rightarrow F_A \rightarrow F_B$ (Golbeck, 1999). ФС1 редуцира железосерния център (2Fe–2S) на белтъка фередоксин (Schoepp et al., 1999). Флавоензимът фередоксин:НАДФ оксидоредуктаза (ФНР) пренася два електрона от фередоксин на крайния акцептор в електронтранспортната верига, НАДФ (Knaff, 1996).

Окисление на водата

Способността на кислородотделящите организми да фотолизират водата, отделяйки молекулен кислород, поддържа живота на всички аеробни организми на Земята (Broda, Peschek, 1979). Окислението на водата е най-високоенергетичната реакция, извършвана от живите организми, възможна поради изключително високия окислителноредукционен потенциал на катион-радикала P680⁺ (+1,2 V при pH 7). За отделянето на молекула кислород са необходими две молекули вода и четири последователни фотохимични реакции на РЦ на Φ C2. Това е демонстрирано в експериментите на Pierre Joliot, при които облъчването на хлоропласти с кратки светлинни импулси води до периодично отделяне на кислород през четири импулса (Joliot et al., 1969; Joliot, Kok, 1975). За да обясни тези осцилации, Кок предлага схематичен модел, в който кислородотделящата система преминава последователно през серия от пет състояния, означени от S₀ до S₄, като всяко следващо е по-окислено от предишното (Kok et al., 1970). С всеки светлинен импулс системата преминава в следващото S-състояние. Връщането S₄-->S₀ става спонтанно без участие на светлина, като се отделя О2. Състоянията S2 и S3 релаксират на тъмно до S₁. Така, след тъмнинна адаптация КОС се намира в състояния S₀ и S₁ в съотношение 1:3.

Същинският механизъм на окислението на водата и химичната природа на Sсъстоянията са неизяснени до днес, въпреки че са представяни много хипотетични модели (Witt, 1996; Tommos, Babcock, 1998; Haumann, Junge, 1999). За да се установи химизмът на реакциите е нужно точно познаване атомната структура на КОС. В скорошна публикация Carrel и съавт. (2002) обобщено интерпретират наличните спектроскопски и кристалографски данни за структурата и функцията на КОС. Наличните хипотези за химичния механизъм на фотолизата са дискутирани в прегледа на Renger (2001).

Отдавна се предполага, че S-състоянията отговарят на различни степени на окисление на тетрамангановия клъстер, установен в състава на КОС (Debus, 1992; Bricker, Ghanotakis, 1996). Чрез ЕПР и рентгенова спектроскопия е показано, че преходите $S_0 \rightarrow S_1$ и $S_1 \rightarrow S_2$ представляват окисление на мангана (Yachandra et al., 1993; Britt, 1996). Химичната природа на окисляващия еквивалент в S₃ засега е недоказана (Hundelt et al., 1997; Haumann, Junge, 1999). Като възможен кандидат е посочен хистидин (Boussac et al., 1990). В четвъртата реакция положителният заряд се съхранява на тирозиновия остатък Туг₁₆₁ от D1 белтъка на РЦ на ФС2, означаван Y_Z. В електронтранспортната верига Y_Z е вторичен донор на ФС2, но е постулирано и прякото му участие в отнемането на протони от водата (Britt, 1996; Hoganson, Babcock, 1997). Това е отразено в химичния механизъм, предложен от Tommos и Babcock (1998). Според по-нови данни, получени от материал с интактна КОС, такава функция на тирозина е малко вероятна (Ahlbrink et al., 1998; Haumann et al., 1999; Renger, 2001).

Противоречие съществува и по въпроса в кои преходи между S-състояния се отделят протоните от водата. Дълго време се възприема, че протони се освобождават по схемата 1:0:1:2 започвайки от S₀ (Fowler, 1977; Bowes, Crofts, 1981). Оказва се обаче, че тази схема може силно да се изменя в зависимост от pH и обкръжението на каталитичния център на KOC (Rappaport, Lavergne, 1991; Haumann, Junge, 1996).

В заключение ще отбележим, че КОС се възприема като супермолекула, съставена със специалната функция да окислява водата, и за разбирането ѝ не е достатъчно да се изучават само свойствата на кофакторите, разглеждайки апоензима като инертна матрица. КОС е "същност, чиито интегрални свойства не могат да бъдат разбрани, ако само се съберат нейните отделни части" (Renger, 2001). Със същия успех това твърдение може да се каже за целия апарат на фотосинтезата.

СТРЕС И АДАПТАЦИЯ

Подобряването на продуктивността на растенията и тяхната адаптивност към екологичните фактори – абиотични, биотични или антропогенни – повишаването на устойчивостта към неблагоприятни условия и замърсители на околната среда, са целите, които обуславят огромен интерес към изучаването на растителния стрес през последните десетилетия. Изследователският напредък в тази област е отразен в редица обзорни публикации (Lichtenthaler, 1996; Bohnert, Sheveleva, 1998; Lichtenthaler, 1998; Smirnoff, 1998) и монографии (McKersie, Leshem, 1994; Larcher, 1995), както и в книгите под редакцията на H. Lichtenthaler (1996) и M. Pessarakli (1999).

Дефиниция за растителен стрес

Обща концепция за стреса при живите организми е развита от Selye (1936), покъсно адаптирана и за растения (Lichtenthaler, 1998). Според нея стресът представлява специфична реакция към определен агент. Levitt (1980) дефинира стреса като "всеки фактор на средата, който е потенциално неблагоприятен за живите организми". Подобна дефиниция е използвана от Osmond и съавт. (1987) – "биотичен или абиотичен фактор, който нарушава нормалното функциониране на растенията и така намалява техния растеж и репродукция".

Larcher (1987; 1995) описва стреса като състояние, при което промяната в условията води до първоначално дестабилизиране на растителните функции, последвано от нормализиране и увеличаване на устойчивостта. Ако промяната надхвърля възможностите за адаптация, резултатът може да бъде трайно увреждане или смърт. Тази теория се възприема и от Lichtenthaler (1998), който различава два вида стрес в зависимост от крайния отговор. *Еустрес* е активиращ, слаб стрес, необходим за развитието на растението, докато *дистрес* е силен стрес, който има отрицателно въздействие и причинява увреждания.

Lichtenthaler (1998) означава четири фази в развитието на стресовия отговор: *сигнална реакция* – нарушаване на оптималното функциониране на растението; *стадий на устойчивост* – процесите се адаптират към условията на стрес; *изтощаване* – хронично увреждане или смърт, ако дозата надвишава капацитета за адаптация; *възстановяване* – след премахване на стресора.

Термодинамична концепция за стреса

Разглеждайки живите организми като отворени термодинамични системи, Reto Strasser подхожда към стреса от гледна точка на теорията на неравновесната термодинамика (Strasser, 1988; Tsimilli-Michael et al., 1996; Krüger et al., 1997). Strasser подчертава относителния характер на стреса, който се дефинира като "всяко отклонение от състояние, условно възприето като нестресово". Състоянието на нестрес е такова, при което системата функционира оптимално, т.е. се намира "в хармония с околната среда" (Strasser, 1988). От термодинамична гледна точка това е стационарно състояние, в което, според правилото на Пригожин, продукцията на ентропия (дисипативната функция) е минимална. Всяко изменение на някой от параметрите на околната среда извежда системата от оптималното стационарно състояние и стойността на дисипативната функция се увеличава – системата е в състояние на стрес. Вследствие на стреса възникват сили, които изменят системата така, че тя да достигне ново стационарно състояние, съответстващо на новите условия. Според Strasser стресът се разглежда като *субоптималност*, а адаптацията представлява термодинамична необходимост.

За фотосинтезиращите организми, чиято функция е превръщане на енергия, концепцията за стреса формално се изразява по следния начин:

$\eta = f(\mathbf{J}, \mathbf{K}, \mathbf{B}),$

където: η е производителността на системата, J е енергетичният вход, K отразява структурата/конформацията на системата, B е параметър, описващ поведението на системата, напр. нивото на редуцираност на електронните преносители.



Фиг. 5. Изобразяване на състоянието на системата с трилогията J-K-B. Кривите показват функции B = f (J) за две структурни състояния, K₁ и K₂. За всяко състояние функцията има оптимум, означен с бяло кръгче. Промяната в условията на средата J₁→J₂ извежда системата от оптимума. В резултат настъпват промени в структурата K₁→K₂, които обуславят нова функция на състоянието с оптимум при новите условия. Обратният път на системата до състоянието, адаптирано към J₁, е различен (Tsimilli-Michael et al., 1996).

В е функция единствено на J и K, така че, ако се знае зависимостта B = f(J, K), тогава B може да отпадне от израза за производителността. От друга страна, ако K е постоянна, т.е. системата не претърпява структурни промени, тогава B = f(J), а производителността зависи само от B, $\eta = f(B)$. Така за дадено състояние K, производителността на системата се определя от нивото на енергетичния вход.

Съгласно тази формулировка, ако системата се намира в оптимално (стационарно) състояние, то структурата на системата К обуславя такава функция B = f(J), че производителността на системата е максимална при дадените условия Ј. Обратно, всяко изменение на Ј при даденото К ще доведе до намалена производителност η . Стресът представлява изменение на Ј и нарушаване на условието за оптимум. Ако се промени Ј, то се променя и В. Системата не може да контролира тези два параметъра, но може да реагира с промяна в структурата (конформацията) – К. В резултат ще се достигне такова К, че функцията В да има оптимум при новите условия Ј, както е илюстрирано на фиг. 5.

ВЛИЯНИЕ НА СВЕТЛИНАТА ВЪРХУ ФОТОСИНТЕЗАТА

Светлината движи фотосинтезата, но въпреки това растенията се нуждаят от защита срещу светлина. В естествена среда количеството светлина, падаща върху хлоропластите, варира с няколко порядъка във времеви мащаб от секунди до сезони. Твърде често падащата светлина надвишава чувствително капацитета на фотосинтетичния апарат за нейното усвояване. Това потенциално създава условия за фотоокислително увреждане. В резултат намалява ефективността на фотосинтезата, а в крайни случаи може да се достигне до загиване на целия организъм. Растенията са развили многобройни начини за адаптиране към светлинните условия, както за ефективно улавяне на светлината, така и за защита от излишната енергия. Фотозащитата е общирно застъпена в литературата (Niyogi, 1999). Тук ще бъдат прегледани основните механизми, имащи пряко отношение към ФС2.

Балансиране на енергетичния поток към двете фотосистеми

Двете фотосистеми са свързани последователно във фотосинтетичната електронтранспортна верига. Това означава, че електроните трябва да преминават през тях с еднаква скорост, а за това е необходимо балансирано подаване на светлинни кванти от антените. Светлинните условия в естествената среда се менят с времето както по интен-

зитет, така и по спектрален състав. За да се оптимизира фотосинстетичната ефективност, съществува механизъм, по който се разпределя енергията между двете фотосистеми, които имат различен спектър на възбуждане.

Съществуването на две светлинни състояния на фотосинтетичния апарат и преходите между тях са открити преди повече от тридесет години (Bonaventura, Myers, 1969; Murata, 1969). Явлението се изразява в следното – ако фотосинтезираща проба се осветява със светлина, активираща предимно ФС1 (*светлина 1*), фотосинтетичният апарат се адаптира така, че част от енергията се преразпределя към ФС2. Процесът се нарича *преход в състояние 1*. Обратно, *светлина 2*, която се поглъща предимно от ФС2, предизвиква преход в *състояние 2*, при който енергията се преразпределя към ФС1.

Десетилетие по-късно Bennet (1977; за преглед вж. 1991) вниква за пръв път в молекулярните основи на тези преходи, откривайки фосфорилирането на белтъците на ТМ. Въпреки че точният механизъм все още не е напълно изяснен, в последно време е постигнат значителен напредък (Allen, Forsberg, 2001; Wollman, 2001; Haldrup et al., 2001). Известно е, че сигналът за преход между светлинните състояния е редуцираността на ПХ. Когато ФС2 работи с по-голяма скорост, пластохиноновият пул се редуцира и се активира мембранносвързана протеинкиназа, която фосфорилира белтъците на ССК2 (Carlberg et al., 1999; Rintamäki, 1997; Rintamäki, 2000). Обратно, окисленият ПХ инактивира протеинкиназата и ССК2 се дефосфорилират от фосфатаза, която не се влияе от окислително-редукционното ниво на ПХ. Наскоро е уточнено, че активирането на киназата не става директно от редуцирания ПХ, а при свързването му към участъка Q_0 на цитохромния комплекс (Zito et al., 1999). Wollman (2001) предлага хипотетичен механизъм на този процес, в който се подчертава ролята на белтъка на Риске.

Фосфорилираният ССК2 дисоциира от ФС2, напуска граните и, вероятно, се свързва с ФС1. Данните на Lunde и съавт. (2000) показват, че ФС1 има активна функция в регулацията на енергетичния баланс, тъй като субединицата Н е необходима за преход в състояние 2. Според последните модели (Allen, Forsberg, 2001; Haldrup et al., 2001) ССК2 дифундира свободно между два специфични участъка за свързване – единият на ФС2 в граните, а другият на ФС1 в стромалните тилакоиди. Фосфорилирането на комплекса предизвиква структурни промени, които вероятно променят афинитета му към тези участъци. В състояние 2 фосфорилираните ССК2 имат по-голям афинитет към ФС1, а дефосфорилираните в състояние 1 се свързват с ФС2.

Ксантофилов цикъл

Ксантофиловият цикъл предоставя механизъм за бързо и ефективно разсейване на излишната светлинна енергия, защитавайки по този начин хлоропластите от фотоокислително увреждане (Demmig-Adams, 1990; Demmig-Adams, Adams, III, 1996). Киселата реакция на тилакоидния лумен предизвиква ензимно превръщане на виолаксантин в зеаксантин с междинно образуване на антераксантин. Конверсията на виолаксантина се катализира от ензима виолаксантиндеепоксидаза, който е ядренокодиран белтък с молекулна маса 43 kDa, локализиран в лумена (Bugos, Yamamoto, 1996). Виолаксантиндеепоксидазата се активира при ниско pH (Eskling et al., 1997) и се свързва с TM (Hager, Holocher, 1994), където редуцира епоксидните връзки на виолаксантина, използвайки аскорбинова киселина като косубстрат (Bratt et al., 1995).

Обратната реакция се катализира от друг ензим, зеаксантинепоксидаза. Той е ФАДсъдържаща кислородзависима оксигеназа, която използва редуциран фередоксин, за да епоксидира зеаксантин и антераксантин (Bouvier et al., 1996). За епоксидазата се предполага, че се намира в стромата и е постоянно активна. Така, количеството зеаксантин се определя от активността на деепоксидазата, която се модулира от реакцията на лумена. При насищащи фотосинтезата светлини луменът се подкиселява, активността на деепоксидазата многократно надвишава тази на епоксидазата и в ТМ бързо се акумулира зеаксантин.

Различни механизми са предложени, за да се обясни ролята на зеаксантина в разсейването на излишъка от енергия. Единият от тях предполага директно гасене на възбудените състояния на хл. (Frank et al., 2000). Според другата основна хипотеза ксантофилите действат като алостерични регулатори (Horton et al., 2000), индуциращи структурни промени в антенните комплекси на ФС2, вследствие на които се увеличава дисипацията на енергия. Ruban и съавт. (1997) са показали връзката между количеството зеаксантин и агрегацията на ССК2, съпътствана с намален добив на хлорофилната флуоресценция. Все още се дебатира дали в индуцираната дисипация на енергия участва периферният светлосъбиращ комплекс, или белтъците от вътрешната антена на ФС2 (Elrad et al., 2002; Govindjee, 2002).

Според други предположения зеаксантинът защитава мембранните липиди от окислителен стрес (Eskling et al., 1997; Havaux, Niyogi, 1999).

Фотоинхибиране на ФС2

При всички кислородотделящи организми продължителното излагане на силна светлина води до необратимо инактивиране на ФС2. Високоспециализиран цикъл възстановява фотоувредените комплекси, които отново се включват във фотосинтезата (Aro et al., 1993; Melis, 1999; Yamamoto, 2001). Така фотоинхибирането се счита не за нежелателен деструктивен процес, а за главен компонент от фотозащитата, ето защо самият термин "инхибиране" се използва не съвсем уместно (Reto Strasser, лична комуникация). Най-общо цикълът се състои в следното (Melis, 1999): фотоувреждане на D1 белтъка; частично разпадане на ФС2; отвеждане на сърцевинния комплекс към стромата; деградация на D1 белтъка; синтез на нов D1 белтък и инкорпориране в TM; сглобяване на холокомплекса и активиране на ЕТ.

Вследствие на многобройни изследвания, правени предимно *in vitro*, са установени два механизма за фотоинактивация на Φ C2 – от акцепторната и от донорната страна на Φ C2 (Aro et al., 1993; Zer et al., 1994). Фотоинхибирането от акцепторната страна е свързано с нарушен пренос на електрони между Q_A и Q_B и двойна редукция на Q_A, който дисоциира от комплекса. В резултат се увеличава вероятността за рекомбинация на заряда между $\Phi\Phi$ и P680⁺, при която може да се генерира триплетно състояние на РЦ (Vass et al., 1992). В реакция на триплетен P680⁺ с молекулен кислород се образува синглетен кислород, способен да увреди D1 белтъка (Zer et al., 1994).

Алтернативно, при фотоинхибиране от донорната страна се счита, че D1 белтъкът се уврежда от $P680^+$ – най-силният окислител във фотосинтезата (Jegerschöld, Styring, 1996). Времето на живот на $P680^+$ значително се увеличава при интензивно осветяване на TM вследствие на освобождаване на Ca²⁺ (Krieger, Weis, 1996) и инактивиране на KOC (Dau, 1994).

Все още не е доказано кой от двата механизма се реализира в нативни условия. Известно противоречие поражда откритието, че скоростта на фотоувреждането е правопропорционална на интензитета на светлината в голям светлинен диапазон (Tyystjärvi, Aro, 1996). Такава зависимост предполага, че при всеки фотон, погълнат от ФС2, съществува определена вероятност за фотоувреждане, независимо от скоростта на фотосинтетичните реакции. В потвърждение на тази интерпретация е наблюдаваната реципрочност между светлинния интензитет и времето на експозиция (Park et al., 1995), т.е. фотоинактивацията зависи от броя погълнати фотони (дозата). Anderson и съавт. (1998) заключават, че само един механизъм отговаря за фотоинхибирането на ФС2 *in vivo* и

предполагат, че той е свързан с окислително увреждане на D1 белтъка от катионрадикала P680⁺. За съжаление и този модел не задоволява напълно всички експериментални данни. Според Melis (1999) вероятността за фотоинактивиране е по-голяма, когато първичният хинонов акцептор Q_A е в редуцирано състояние. Тогава светлинната зависимост на фотоинактивирането отразява всъщност нарастването на дела на Q_A^- с увеличаване на интензитета.

В заключение ще отбележим, че фотосинтезата притежава много възможности за защита от светлинен стрес и адаптация към непрестанно променящите се светлинни условия на естествената среда. И трите споменати механизма (разпределяне на енергията между фотосистемите, дисипация на излишната енергия чрез ксантофиловия цикъл, фотоинактивация на ФС2) са обект на интензивно изследване в последните години, но въпреки постигнатото досега, тяхното пълно разбиране е далеч от завършено.

ДЕЙСТВИЕ НА ТЕМПЕРАТУРАТА ВЪРХУ ФОТОСИНТЕЗАТА

Температурата е основен екологичен фактор, определящ географското разпределение на растенията. Различните растителни видове са адаптирани към определен температурен диапазон, който може да бъде от почти минусови температури в полярния и планинския климатичен пояс до над 50°С при някои пустинни сукуленти (Berry, Björkman, 1980). В умерените ширини сезонните температурни промени основно определят добива на културните растения.

Известно е, че фотосинтезата е силно чувствителна към температурата и представлява ранен индикатор за възникването на температурен стрес и увреждания (Alexandrov, 1964; Yordanov et al., 1986; Larcher, 1994). Температурната зависимост на фотосинтезата за даден индивид се характеризира с оптимум, при който фотосинтетичната ефективност е максимална. Няколко градуса под или над оптималната температура могат силно да намалят скоростта на фотосинтезата (Carpentier, 1999). Промените обикновено са бързообратими в областта 10–35°С, но извън тези температури настъпват необратими поражения (Berry, Björkman, 1980).

Температурната зависимост на фотосинтезата е не само генетично обусловена, но в голяма степен се определя от условията на растеж на индивида. Температурният оптимум на растения от един вид може да варира (до 10° С и повече) в зависимост от надморската височина (Fryer, Ledig, 1972; Slatyer, Morrow, 1977), сезона (Oechel, 1976; Strain et al., 1976; Mooney et al., 1978) или по време на деня (Alexandrov, 1977; Kappen,

1981; Srivastava, Strasser, 1996). Аклимацията на фотосинтезата към ниски или високи температури, съпътствана с увеличена термотолератност, изисква от няколко часа до няколко дни (Larcher, 1994; Bukhov, Mohanty, 1999) и обхваща поредица от процеси като реорганизация на ТМ (Yordanov, 1992; Carpentier, 1999), натрупване на осмолити (Iba, 2002; Sakamoto, Murata, 2002), синтез на нови белтъци (Sachs, Ho, 1986; Yordanov et al., 1989; Iba, 2002). Освен тези относително продължителни аклимационни процеси е демонстрирана способността на Φ C2 да се адаптира към повишена температура в рамките на минути (Srivastava, Strasser, 1995; Srivastava, Strasser, 1996).

Действие на високи температури

Високата температура индуцира значителни промени в състава на мембранните липиди и белтъци и структурата на TM, в резултат на което силно се повлияват функциите на фотосистемите и фотосинтезата като цяло (Berry, Björkman, 1980; Bukhov, Mohanty, 1999; Carpentier, 1999; Georgieva, 1999). Има еднозначни доказателства за това, че инхибирането на фотосинтезата се дължи на нарушения във фотосинтетичния апарат в хлоропластите (Björkman et al., 1976; Armond et al., 1978; Bauer, 1979), а не е резултат от други физиологични реакции, например затваряне на устицата (Berry, Björkman, 1980). Фотосистема 2 се разглежда като най-чувствителното място към топлинен стрес, докато ФС1, цитохромният комплекс и ензимите от цикъла на Калвин – Бенсон са сравнително устойчиви (Quinn, Williams, 1985; McCain et al., 1989; Havaux et al., 1991; Mamedov et al., 1993).

Промени в тилакоидните мембрани

Тилакоидните мембрани загубват граналната си структура, когато са изложени на температури над 35°С (Sundby et al., 1986; Velitchkova et al., 1989). Raison и съавт. (1982) са показали, че с повишаване на температурата до 45°С рязко нараства флуидитетът на мембраната. При по-високи температури се разпада липидният бислой и се образуват мицеларни структури (Gounaris et al., 1984). Топлинното увреждане на мембраните е свързано с увеличено прекисно окисление на тилакоидните липиди (Mishra, Singhal, 1992). Високотемпературното третиране увеличава електрофоретичната подвижност на изолирани хлоропласти (Goltsev et al., 1987; Georgieva et al., 1989), разкривайки промени в повърхностния електричен заряд на TM, както е предположено от Babu и съавт. (1992). Йонната пропускливост на мембраната се увеличава (Mukohata et al., 1973; Havaux et al., 1996; Bukhov et al., 1999).

Топлинният стрес не е свързан с фазови преходи на липидната фаза или значими химични изменения като окисление на ненаситените мастни киселини (Carpentier, 1999). Наблюдавано е увеличено ниво на свободните мастни киселини (McCarty, Jagendorf, 1965; Santarius, 1980). При по-продължително третиране се увеличава съдържанието на дигалактозилдиацилглицерол с наситени мастнокиселинни остатъци (Süss, Yordanov, 1986; Yordanov, 1992). Това се разглежда като защитна реакция, тъй като дигалактозилдиацилглицеролът стабилизира липидния бислой.

С увеличаване на температурата над оптималната в изолирани интактни хлоропласти намалява протонният градиент, отчетен по гасенето на флуоресценцията на 9аминоакридин, и над 45° С той напълно изчезва (Bilger, Schreiber, 1990). Подобни резултати се получават при регистриране на електрохромното отместване на абсорбцията при 515 nm (Yordanov, Weis, 1984; Havaux et al., 1996).

Топлоиндуцираните промени в структурата и свойствата на тилакоидната мембрана водят до нарушаване функциите на белтъчните комплекси и инхибиране на фотосинтетичните реакции.

Инхибиране на Фотосистема 2

От ранните работи на Yamashita и Butler (1968) е известно, че катализираното от ФС2 окисление на водата е особено чувствителна реакция към действието на топлина и увреждането ѝ е първична причина за инхибирането на ЕТ (Bukhov, Mohanty, 1999). Добавянето на изкуствени електронни донори към третирани ТМ възстановява линейния електронен пренос (Sabat et al., 1986). Инактивацията на кислородотделящата система е съпътствана с отделяне на два от мангановите атоми (Nash et al., 1985). Епаті и съавт. (1994) поставят под съмнение загубата на Мп като причина за инхибирането на КОС. Авторите предполагат, че то се дължи на дисоциация на 33 kDa Mn-стабилизиращ белтък.

Въпреки че акцепторната страна на Φ C2 се счита за термостабилна, Bukhov и Mohanty (1993) са регистрирали известна тъмнинна редукция на Q_A след нагряване. Тъмнинно редуциране на Q_A установяват и Yamane и съавт. (2000), но авторите не го свързват с изменения във Φ C2, а с температурно активиране на ензимен път за редуциране на ПХ. Окислително-редукционният потенциал на двойката Q_A/Q_A⁻ нараства при температурно третиране на ТМ, вследствие на което се нарушава ЕТ между Q_A и Q_B (1999). Възможно е посочените ефекти да се дължат на конформационни промени в сърцевинния комплекс. Такива действително са демонстрирани чрез инфрачервена спектроско-

пия от De Las Rivas и Barber (1997). Схващането, че акцепторната страна на ΦC2 се модифицира от повишена температура бе наскоро подкрепено и от експериментите на Vani и съавт. (2001), които характеризират измененията в чувствителността към инхибитори и изкуствени електронни акцептори.

Дори умерено високи температури (30–40°С) могат да предизвикат дисоциация на светлосъбиращия комплекс (ССК2) от сърцевинния комплекс на ФС2 (Armond et al., 1978; Armond et al., 1980). С това явление е свързано регистрираното за пръв път от Schreiber и Berry (1977) топлоиндуцирано нарастване на началната флуоресценция (F_0). Дисоциацията на ССК2 вероятно съвпада с разпадането на граните и превръщането на реакционни центрове от типа ФС2 α във ФС2 β , наблюдавано от Sundby и съавт. (1986). Увеличаване количеството на ФС2 β с нарастване на температурата се потвърждава и от Pastenes и Horton (1996) и Bukhov и Carpentier (2000). Наред с това, според Takeuchi и Thornber (1994) димерната структура на ФС2 преминава в мономерна, а тримерните агрегати на ССК2 се разпадат до димерни.

Топлоиндуцираните промени в големината на антената на Φ C2 водят до преразпределяне на уловената енергия между двете фотосистеми (Weis, 1985). Действието на повишените температури е подобно на преход от състояние 1 в състояние 2, където енергията се предава предимно към Φ C1 (Sundby, Andersson, 1985; Havaux, 1988; Bukhov et al., 1998).

Влияние върху Фотосистема 1

 Φ C1 е по-устойчива към топлинен стрес от Φ C2 и, в инхибиращи за Φ C2 условия, е способна да катализира редукция на метилвиологен от дихлорфенолиндофенол (Thomas et al., 1986), цикличен ЕТ (Havaux et al., 1991; Bukhov et al., 1996) или електронен поток от ендогенни стромални донори (Havaux, 1996). При нагряване на ТМ над 40°C Ivanov и Velitchkova (1990) регистрират стимулиране на фотоиндуцираната редукция на P700, което авторите свързват с увеличено ефективно сечение на поглъщане на антената на Φ C1.

Топлинно увреждане на изолирани ФС1, изразяващо се в загуба на фотохимична активност, се наблюдава над 60°С (Bukhov, Karapetyan, 1978).

Действие на ниски температури

Като екологичен фактор ниските температури имат не по-малко значение за растенията от високите, но нискотемпературни увреждания се проявяват сравнително по-

бавно и често краткотрайното студово въздействие няма вредни последици за растението (Berry, Björkman, 1980). Ефектите на продължително подлагане на ниски температури върху фотосинтезата и механизмите на аклимация са широко застъпени в литературата, особено в последно време (Hughes, Dunn, 1996; Martindale, Leegood, 1997; Kratsch, Wise, 2000; Browse, Xin, 2001; Allen, Ort, 2001; Palva et al., 2002; Stitt, Hurry, 2002), но тяхното подробно разглеждане излиза извън обсега на настоящата работа.

Директното въздействие на ниски температури върху фотосинтетичния апарат е свързано главно с изменения в свойствата на ТМ. От критично значение е дали се провокира фазов преход на мембранните липиди и латерално фазово разделяне (Mäenpää et al., 1988), при което превърналият се в гел липид се отделя от течнокристалната фаза. В това състояние мембраната става по-пропусклива за йони (Block et al., 1976), с което се свързва наблюдаваното от Avron и Fork (1977) бързо разсейване на трансмембранния протонен градиент при ниска температура. Фазовият преход на мембраните силно би изменил и липид-белтъчните взаимодействия. Електронномикроскопски снимки са по-казали изместване на белтъците от втвърдените участъци на мембраната (Armond, Staehelin, 1979). При температури на фазовия преход в *Anacystis* Murata и съавт. (1975) са установили рязка промяна в активационните енергии на електронтранспортните реакции.

При висши растения в нативни условия се смята, че студовият стрес не предизвиква фазови преходи в липидите (Yordanov, 1992). Независимо от това се наблюдават драстични промени във функциите на фотосинтетичния апарат: инхибиране на КОС (Havaux, Lannoye, 1984; Shen et al., 1990) със загуба на Mn (Kaniuga et al., 1978), образуване на свободни мастни киселини (Kaniuga, Michalski, 1978), разпрягане на фотофосфорилирането и спадане на протонния градиент (Yordanov, 1992), забавяне на реокислението на Q_A^- (Havaux, 1987).

Във всички случаи развитието на увреждания във фотосинтетичния апарат вследствие на нискотемпературен стрес зависи изключително от интензитета на светлината по време на третиране. Докато на тъмно растенията могат да издържат продължително време при околонулеви температури, то високите светлинни интензитети комбинирани с ниска температура бързо предизвикват инхибиране на фотосинтезата и са предпоставка за трайни увреждания.

ХЕРБИЦИДИ, ДЕЙСТВАЩИ НА ФОТОСИСТЕМА 2

Над 60% от хербицидите, въведени през последните 40 години въздействат върху функцията на хлоропластите (Wakabayashi, Böger, 2002). Инхибиторите на фотосинтезата съставят повече от половината от всички търговски хербициди през 70-те години. Всички фотосинтетични хербициди със стопанско значение блокират електронния транспорт при ФС2 (Oettmeier, 1992). Изключение прави единствено паракват, който отклонява електрони от ФС1.

В селскостопанската практика съществува тенденция за намаляване употребата на този тип хербициди за сметка на нови съединения с по-добри екотоксикологични качества (Böger, Sandmann, 2000). Въпреки това тяхното приложение в изследователските лаборатории като специфични инхибитори на електронния транспорт ще продължи да допринася за разбирането на фотосинтетичния процес. В такива изследвания намират място и фенолните хербициди, които, макар и класифицирани като разпрягащи агенти, също се свързват специфично с D1 белтъка и блокират електронния транспорт.



Фиг. 6. Химични структури на хербицидите на ФС2 диурон (карбамиден тип), атразин (симетричен триазин) и диносеб (заместен фенол).

Механизъм на действие

Wessels и van der Veen (1956) първи показват, че диуронът инхибира реакцията на Хил в изолирани хлоропласти. Radosevich (1977) открива, че TM, изолирани от резистентни плевели, остават нечувствителни към атразин и заключава, че устойчивостта се дължи на изменение в мястото на действие на хербицида в TM. Стимулирането на флуоресценцията от диурон Duysens и Sweers (1963) отдават на инхибиране реокисляването на Q_A^- . Сравнявайки площта над индукционната крива на флуоресценцията на третирани и нетретирани проби Forbush и Kok (1968) изчисляват, че диуронът блокира ET непосредствено след Q_A . Това е потвърдено и в изследвания с единични насищащи светкавици, показали, че за пълно редуциране на инхибирани реакционни центрове е достатъчен един електрон (Pfister, Arntzen, 1979).

Няколко авторски групи посочват, че хербицидното действие се влияе от наличието на трипсин или други меки пептидазни агенти (Regitz, Ohad, 1976; Pfister, Arntzen, 1979; Tischer, Strotmann, 1979). Това е свидетелство, че прекъсването на електронния поток става след свързване на хербицида с участък от белтък на ТМ. Идентифицирането на свързващия белтък става възможно с използването на фотоактивни производни на хербицидите, които при облъчване с ултравиолетова светлина се свързват ковалентно с белтъка. Така е установено, че всички карбамидни и триазинови инхибитори, напр. азидомонурон (Nelson et al., 1973) и азидоатразин (Pfister et al., 1981), се свързват с един и същ белтък с молекулна маса 32 kDa – D1 белтъка на ФС2. За разлика от тях, фенолни инхибитори, като азидодиносеб, маркират белтък с молекулна маса 41 kDa (Oettmeier et al., 1980). Свързването на радиоактивно белязани фенолни хербициди към изолирани реакционни центрове, съдържащи само хетеродимера D1/D2 и цитохром *b*-559 доказва, че и тези вещества блокират същия участък (Giardi et al., 1988).

До началото на 80-те години се смята, че инхибирането е алостерично и съществуват различни участъци за карбамидни, триазинови и фенолни хербициди (прегледано от van Rensen, 1982; Renger, 1986). Tischer и Strotmann (Tischer, Strotmann, 1977), а покъсно и други групи (Oettmeier, Masson, 1980; Haworth, Steinback, 1987; Oettmeier et al., 1987; Giardi et al., 1988), демонстрират конкурентно свързване между много хербициди. Конкурентност между диурон и Q_B е предположена от Velthuys (1981). Vermaas и съавт. (1983) забелязват, че афинитетът към атразин рязко намалява, когато към Q_B-сайта е свързан азидохинон.

Сега е всеобщо възприето, че хербицидите, подобни на диурон и атразин, блокират ЕТ между Q_A и Q_B като изместват конкурентно пластохинона от Q_B -участъка на D_1 . Хербицидите и пластохинонът се свързват към неидентични, но припокриващи се участъци, локализирани в общ домен (Pfister, Arntzen, 1979; Trebst, Draber, 1979). Афинитетът към хербицида зависи от състоянието на Q_B – той е висок, когато Q_B е окислен и слабо свързан към участъка, и нисък, когато Q_B е в полуредуцирано състояние и здраво свързан към участъка (Lavergne, 1982).

Класификация на хербицидите на ФС2

Въз основа на химичната си структура и свойства хербицидите, инхибиращи ΦC2 са разделени на две семейства – урея/триазинови и фенолни хербициди (Trebst, Draber, 1979). Към първото семейство принадлежат: триазини, уреи, триазинони, бискарбамати, цианоакрилати, пирони, хромони, циклохександиони, хидроксихинол-N-оксиди, бензохинони и нафтохинони. Към второто се отнасят: нитрофеноли, азафенантрени, хидроксипиридини, кетонитрили. В химично отношение урея/триазиновите хербициди предоставят карбонилна група за свързване с белтъка, а фенолните хидроксилна (фиг. 6).

Някои различия в свойствата на двете семейства хербициди са следните. Тилакоиди, третирани с Tris и трипсин, са по-малко чувствителни към хербициди от урея/триазинов тип, докато свързването на фенолни хербициди не се повлиява (Trebst et al., 1985). При фотоафинитетно белязане с азидо- аналози на урея/триазинови хербициди се маркира предимно D1, докато фенолните аналози маркират както D1, така и белтък с молекулна маса 41 kDa (Oettmeier, Masson, 1980). Фенолните хербициди се свързват с хербицидния участък чувствително по-бавно – с 1–2 минути закъснение (Durner et al., 1986) и пребивават по-дълго в участъка (Vermaas et al., 1984). Мутанти, при които Ser₂₆₄ е заменен (с глицин/аланин) са толерантни към хербициди от урея/триазинов тип, но са чувствителни или свръхчувствителни към фенолни хербициди (Bowyer et al., 1991; Trebst, 1996; Oettmeier, 1999).

Молекулни взаимодействия в хербицидното място

Първоначалният модел за нагъване на D1 белтъка, формиране на хербицидния участък и ориентация на хербицидите в него е съставен от Trebst (1986; 1987). В няколко по-скорошни модела е направен опит за подробно описание топологията на Q_Bучастъка, но те са създадени без да е налична кристална структура на ФС2, чрез молекулно моделиране въз основа структурата на РЦ на пурпурни бактерии и данни за резистентни мутанти (Bowyer et al., 1990; Tietjen et al., 1990; Xiong et al., 1996).

Съгласно тези модели хербицидното място се формира между спиралите D и E на D1 белтъка. Всички познати мутации, резултиращи в хербицидна устойчивост са локализирани между Phe₂₁₁ и Leu₂₇₅ (Oettmeier, 1999). Следователно в изграждането на хербицидното място участва секвенция от поне 65 аминокиселинни остатъка. Q_B се свързва в мястото с две водородни връзки – едната с His₂₁₅, а другата с пептидна група при Ser₂₆₄ (Trebst, 1986). Към тази пептидна връзка се ориентират хербициди с карбонилна

или еквивалентна група (уреи, триазини, триазинони). Фенолните съединения нямат подходящ заместител за такава водородна връзка, а се свързват с His₂₁₅.

Отнасянето на урея/триазиновите хербициди към Ser₂₆₄, а на фенолните към His_{215} обяснява защо мутанти със заменен Ser₂₆₄ са резистентни към уреи/триазини, но са чувствителни към фенолни хербициди. В подкрепа на тази хипотеза е и регистрираното влияние на фенолите върху ЕПР сигнала на нехемовото желязо (Itoh et al., 1986), тъй като His_{215} е лиганд за железния атом. Забавеното инхибиране на тилакоидни мембрани от "хистидинов" тип съединения (Durner et al., 1986) се обяснява с необходимостта от конформационни изменения, за да достигне хербицидната молекула до разположения навътре в "джоба" His_{215} .

Специфично и неспецифично свързване

Съществуват множество данни за наличието на втори участък, различен от Q_B участъка, за свързване на хербициди на ФС2. Tischer и Strottman (1977) са открили, че някои хербициди се свързват с ТМ както специфично, т.е. с висок афинитет, така и неспецифично. Само специфичното свързване корелира с инхибиране на ЕТ. Подобно поведение с наличието на повече от една константа на свързване е докладвано от редица автори (Trebst, 1979; Oettmeier, Masson, 1980; Laasch et al., 1981; Carpentier et al., 1985; Jursinic et al., 1991; Drechsler, Neumann, 1992).

Кривите на свързване на някои хербициди имат двуфазен характер, което сочи за съществуването на второ хербицидно място във ФС2. За диурон такова място е локализирано на донорната страна на ФС2 (Delrieu, 1981; Pfister, Schreiber, 1984). Нѕи и съавт. (1986) са показали, че има два участъка за диурон – на донорната и на акцепторната страна на ФС2, но двата не могат да задържат хербицид едновременно. Предполага се, че в интактните тилакоиди, представляващи затворени везикули диуронът се свързва първо с редуциращата страна на ФС2, което не позволява по-нататъшно свързване с донорната страна.

Vasil'ev и Venediktov (Vasil'ev et al., 1988; Vasil'ev, Venediktov, 1993) са регистрирали ефекта на диурона върху донорната страна на Φ C2 по намаляване на секундния компонент на забавената флуоресценция, който възниква при рекомбинация на състоянието S₂Q_A⁻, в концентрации на диурона над 10⁻⁴ M. Jursinic и съавт. (1991) са установили наличие на два участъка за свързване за атразин в тилакоидни мембрани от грах. Атразинът във втория участък частично инхибира рекомбинацията на S₂Q_A⁻ и е иден-
тифициран върху D2. Drechsler и Newmann (1992) потвърждават наличието на две места за диурон, но не и за атразин.

Ефекти върху донорната страна на ФС2 са наблюдавани също и с фенолни хербициди чрез флуоресценция, забавена флуоресценция или ЕПР (Pfister, Schreiber, 1984; Rutherford et al., 1984). Предположено е участието на образувани каротеноидни радикали (Mathis, Rutherford, 1984).

Абсорбция и транслокация на хербицидите

Интактните растения абсорбират хербициди през листата или през корените. Листно приложените хербициди трябва да преминат през няколко бариери с различен състав преди да достигнат своята мишена – тилакоидните мембрани. Това са кутикулните слоеве (липофилен восък и хидрофилен кутин), клетъчната стена и плазмалемата (Ashton, Crafts, 1981). Един важен входящ път, особено за водоразтворимите съединения, е през устицата (Currier, Dybing, 1959). Проникването на хербициди през листата зависи от редица условия на външната среда – температура, светлина, влажност, pH, наличие на сърфактанти (Thompson et al., 1970; Smith, Nalewaja, 1972).

Поглъщането на хербициди през корените и транслокацията им към фотосинтезиращите тъкани и органи може да включва три пътища, в зависимост от химичните и физичните свойства на хербицидните молекули: апопласт (клетъчни стени и ксилем), симпласт (цитоплазма и флоем) и апопласт-симпласт (Ashton, Crafts, 1981). Скоростта на абсорбция и транслокация на апопластно транспортираните хербициди е пропорционална на скоростта на транспирация (Lund-Hoie, 1969; Vostral et al., 1970). Карбамидните и триазиновите хербициди активно се абсорбират от корените и транспортират по апопластната система (Bayer, Yamaguchi, 1965; Lund-Hoie, 1969; Moyer et al., 1972; Hilton et al., 1976; Radosevich, 1977). За разлика от тях, фенолните хербициди не могат да се транспортират добре (Bandal, Casida, 1972). Те са контактни хербициди, които увреждат мембраните (Morrod, 1976), така че действието им бързо разрушава органите, отговорни за транспорт както по апопластния, така и по симпластния път (Ashton, Crafts, 1981).

Ефективността на абсорбция на хербицидите през корените и транспортирането им към листните тъкани зависи и от възрастта на растенията – младите растения, при които физиологичните процеси протичат с по-голяма скорост, натрупват повече хербициди (Knuteson et al., 2002).

Влияние на температурата върху хербицидния ефект

Известно е, че физиологичната токсичност на хербицидите на фотосинтезата се влияе от температурните условия (Ashton, Crafts, 1981), но механизмът на взаимодействие на тези два стресови фактора не е добре изучен.

Витап, Gealy и Fuerst (1992а; 1992b) изследват активността на триазиноновите хербициди метрибузин и етилметрибузин върху два вида плевели (*Bromus tectorum, Aegilops cylindrica*) и показват, че тя се повишава с температурата. И двата хербицида намаляват скоростта на фотосинтезата и транспирацията в по-голяма степен при 30°C, отколкото при 10 или 20°C (Gealy, Buman, 1989). Концентрацията на полуинхибиране на кислородното отделяне при 10°C е около 5 пъти по-висока, отколкото при 30°C. Повишената активност на хербицидите авторите откриват както в интактни листа, така и в изолирани протопласти и тилакоидни мембрани.

Първото предположение за увеличения ефект на хербицидите при повишените температури е свързано с конформационни изменения в Q_B -участъка, водещи до увеличаване на афинитета към хербицида. Това обаче противоречи с изследванията на Tischer и Strotmann (1979) с радиоактивно белязани хербициди, които показват, че афинитетът е намален при повишените температури. Резултатите на Buman и съавт. (1992b) с ¹⁴Сбелязани метрибузин и етилметрибузин също посочват известно намаляване в константата на свързване на хербицидите при 30°С. Подобно изменение на афинитета на диурон към свързващия участъци е показано във *Phaseolus vulgaris* (Wiest, 1986) и наскоро в *Oryza sativa* (Vani et al., 2001). При увеличаване на температурата до 35, 40 и 45°С афинитетът на свързване на диурона постепенно намалява. Предположено е, че това се дължи на постепенно конформационно изменение на свързващия участък.

ЛУМИНЕСЦЕНТНИ СВОЙСТВА НА ФОТОСИНТЕЗИРАЩИТЕ ОРГАНИЗМИ

Флуоресценция

Флуоресценцията на хлорофила е явление, което от няколко десетилетия се използва като основно средство за изследване на фотосинтезата. Сред немалкото разнообразие флуоресцентни техники, една от най-разпространените представлява регистрация на индукцията на флуоресценцията (Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Krause, Weis, 1991). Този подход е недеструктивен, бърз, изисква сравнително достъпна апаратура, има висока чувствителност и информативност. Последните две свойства на флуоресцентния сигнал го правят колкото ценен за изследователя, толкова труден за интерпретиране. Въпреки че са изминали 70 години от откриването на флуоресцентната индукция, теория описваща напълно това явление няма. Дори Holzwarth (1993) провокира с въпроса "Време ли е да изхвърлите вашия апарат за индукция на хлорофилната флуоресценция?". Разбира се, отговорът, даден в следващите прегледи (Govindjee, 1995; Lazár, 1999; Strasser et al., 2000; Schreiber et al., 2000), е категорично отрицателен.

Биофизични основи на флуоресцентното излъчване от хлоропластите

Флуоресценцията е един от конкурентните пътища за дезактивация на възбудените състояния на пигментните молекули. Квантовият добив на флуоресценцията, φ_f , зависи от скоростните константи на всички възможни дезактивационни процеси:

$$\varphi_{\rm f} = \frac{k_{\rm f}}{k_{\rm f} + k_{\rm d} + k_{\rm p} + k_{\rm t} + k_{\rm ic} + k_{\rm q}[{\rm Q}]},\tag{1}$$

където $k_{\rm f}$, $k_{\rm d}$, $k_{\rm p}$, $k_{\rm t}$, $k_{\rm ic}$, $k_{\rm q}$ са скоростните константи на, съответно, флуоресценция, топлинна дезактивация, фотохимия, миграция на възбуждането към друга молекула, интеркомбинационна конверсия и гасене от молекула гасител Q.

Квантовият добив е свързан с времето на живот на флуоресцентното излъчване, т, което е реципрочната стойност на сумата от всички скоростни константи, чрез отношението

$$\varphi_{\rm f} = \tau/\tau_0, \tag{2}$$

където $\tau_0 = 1/k_f$ е радиационно време на живот или времето на живот, ако флуоресценцията е единственият път за дезактивация на възбуждането.

Интензитетът на флуоресценцията, *F*, ще бъде пропорционален на флуоресцентния добив и интензитета на погълнатата светлина:

$$F = I_a.\varphi_f \tag{3}$$

Разтвори на хлорофил *а* флуоресцират с добив 20–35% и време на живот 6–20 ns, докато флуоресценцията на хлорофилите в тилакоидната мембрана е 2–8%, с времена от ps до 1–2 ns (вж. Lazár, 1999).

При стайна температура флуоресценцията се излъчва предимно от антената на ФС2. Счита се, че основната част от светенето се формира в антената на сърцевинния комплекс – белтъците СР43 и СР47 (Govindjee, 1995). Участието на ФС1 е около 20% от общата емисия (Roelofs et al., 1992; Trissl et al., 1993), но може да се увеличи при ниски температури или при регистрация на флуоресценцията с по-голяма дължина на вълната.

Според хипотезата, първоначално предложена от Duysens и Sweers (Duysens, Sweers, 1963) и развита от Butler (вж. 1978), флуоресценцията е минимална, когато първичният хинонов акцептор Q_A е окислен. Такива реакционни центрове се наричат "*отворени*". Когато Q_A е редуциран (*"затворен*" РЦ), флуоресценцията е максимална. Разликата в интензитета на емисията от отворени и затворени РЦ се нарича *вариабилна флуоресценция*. Флуоресценцията на ФС1 не зависи от окислително-редукционното състояние на РЦ или електронните акцептори и не участва във вариабилната флуоресценция. Това се обяснява с относителната стабилност на Р700⁺, докато Р680⁺ бързо получава електрон от Y_Z. В затворените РЦ на ФС1 стабилният Р700⁺ улавя възбудната енергия и я превръща в топлина, така че флуоресценцията остава ниска (Nuijs et al., 1986). Franck и съавт. (2002) изчисляват дела на флуоресценцията от ФС1, сравнявайки спектъра на излъчване на флуоресценцията от затворени и отворени РЦ – според тях при 722 nm приносът на ФС1 в общото светене от отворени РЦ е 40%.

Вариабилната флуоресценция се описва със споменатия вече модел на обратимата радикалова двойка (Schatz et al., 1988; van Grondelle et al., 1994), според който, от една страна, възбудените нива са динамично уравновесени между антената и P680, а от друга, съществува (частично) равновесие между P680*I и P680⁺I⁻. Според първоначалната хипотеза, предположена от Klimov и Krasnovskii (1981), вариабилната флуоресценция е резултат от излъчвателна рекомбинация на двойката P680⁺I⁻ в затворени РЦ. Според Shatz и съавт. (1988), потвърдено и от други автори (Schlodder, Brettel, 1988; Gibasiewicz et al., 2001), когато Q_A е редуциран, разделянето на заряда е силно ограничено, вероятно поради електростатично отблъскване. Тогава участието на рекомбинацията във вариа-билната флуоресценция ще бъде малко.

Vredenberg (2000) предлага нов модел, разграничаващ три състояния на РЦ – отворено (ФФ и Q_A окислени), полузатворено (окислен ФФ и редуциран Q_A) и затворено (редуцирани ФФ и Q_A).

Индукция на флуоресценцията

Ако адаптирана на тъмно фотосинтезираща проба се освети с непрекъсната светлина, нейната флуоресценция първоначално бързо нараства, а после намалява и след един или няколко преходни максимума достига стационарна стойност. Това явление се нарича *индукция на флуоресценцията* и е описано за пръв път от Kautsky и Hirsch (1931). Нарастването на флуоресценцията до максимума се отбелязва като *бърза фаза*, а последващите промени – *бавна фаза*. Графиката на измерения интензитет на флуоресценцията като функция от времето от началото на осветяването представлява *индукционна крива* (ИК) на флуоресценцията. Този вид излъчване по-нататък в текста ще се означава като *бърза флуоресценция* (БФ), за да се различава от забавената флуоресценция (ЗФ). Характерният ход на ИК на БФ е изобразен на фиг. 7, като особените места в кривата са отбелязани с букви според общоприетата OIDPSMT номенклатура (Govindjee, 1995) – начало (О), инфлексия (I), пик (Р), квазистационарно състояние (S), вторичен максимум (М) и терминално състояние (T).



Фиг. 7. Индукционни криви на бързата флуоресценция, регистрирани в тъмнинно адаптирани листа от грах при ниска действаща светлина (40 µmol.m⁻².s⁻¹). Отбелязани са характеристичните точки О, P, S, M, T (крива a, отместена на 50 s от началото) и O, P, S₁, M₁, S₂, M₂, T (крива b). Репродуцирана от (Lazár, 1999).

Начална и максимална флуоресценция

В съответствие с хипотезата на Duysens и Sweers (1963) нарастването на флуоресценцията в бързата фаза на ИК отразява фотоиндуцираното затваряне на РЦ, които са били отворени на тъмно. **Началната флуоресценция**, F_o, е излъчване от отворени РЦ. За F_o се счита, че е следствие от екситонното равновесие в антената. За квантовия добив на флуоресценцията в F_o може да се запише

$$\varphi_{\rm Fo} = \frac{k_{\rm f}}{k_{\rm f} + k_{\rm p} + k_{\rm d}},\tag{4}$$

където k_d включва всички процеси на безизлъчвателна дезактивация.

По принцип се допуска, че не всички хлорофили са функционално свързани с РЦ (Lavorel, Etienne, 1977). Възможно е F_0 да включва флуоресценцията от тези пигменти. Една част от светенето в F_0 е за сметка на ФС1 (Trissl et al., 1993; Franck et al., 2002). Измереното начално ниво на флуоресценцията би могло да се повиши, ако някои РЦ са били затворени преди осветяването. Такава тъмнинна редукция на Q_A има особено значение при високи температури (Yamane et al., 2000).

Флуоресценцията в максимума (P) се отбелязва с F_p . Ако възбуждащата светлина е с насищащ интензитет, тогава $F_p = F_m$ отговаря на флуоресценцията от изцяло затворени РЦ. Разликата $F_v = F_m - F_o$ се нарича максимална вариабилна флуоресценция. Кitajama & Butler (1975) са показали, че максималният квантов добив на фотохимичната реакция на ФС2 може да се изрази с отношението F_v/F_m . Ефективната константа на фотохимичната реакция k_p при затворени РЦ е 0. Тогава квантовият добив на флуоресценцията в F_m е

$$\varphi_{\rm Fm} = \frac{k_{\rm f}}{k_{\rm f} + k_{\rm d}} \,. \tag{5}$$

От друга страна, квантовият добив на фотохимичната реакция на ФС2 в началния момент от осветяване е:

$$\varphi_{\rm Po} = \frac{k_{\rm p}}{k_{\rm f} + k_{\rm p} + k_{\rm d}} = 1 - \frac{\varphi_{\rm Fo}}{\varphi_{\rm Fm}} = 1 - \frac{F_{\rm o}}{F_{\rm m}} = \frac{F_{\rm v}}{F_{\rm m}} \,. \tag{6}$$

Това отношение е силно консервативно (Björkman, Demmig, 1987) и е най-често използваният флуоресцентен параметър за оценка на фотосинтезата. Трябва да се отбележи, че има добра съвместимост между F_v/F_m и отношението F_v/F_p , измерено при относително ниски светлинни интензитети (Ögren, 1988).

Бърза фаза на ИК при ниска действаща светлина

Ходът на ИК на БФ от О до Р се определя както от експерименталните условия – интензитет на действащата (възбуждаща) светлина и условия на предварителната адаптация, така и от вътрешни фактори като: кооперативност на Φ C2; хетерогенност на Φ C2; големина на пула от ПХ и скорост на реокисляването му; активност на Φ C1 и тъмнинните реакции; активност на КОС (Krause, Weis, 1991).

*Q*_В-нередуциращи центрове

Нарастването на БФ в О–І фазата отразява редукцията на Q_A от РЦ на ФС2, при които е нарушен преносът към Q_B , както е предположено за пръв път от Melis (1985) и потвърдено от други (Chylla, Whitmarsh, 1989; Cao, Govindjee, 1990). Това обаче е валидно само в условия на ниска действаща светлина, когато окисляването на Q_A^- от Q_B в "нормалните" РЦ превишава скоростта на редуциране на Q_A . От относителната височина на платото I делът на Q_B -нередуциращите центрове е оценен на приблизително 30% (Melis, 1985; Cao, Govindjee, 1990). Този метод може би е неточен, защото в F_i определено участие има и Q_A^- от Q_B -редуциращите центрове, както е показал Hsu (Hsu, 1993).

Размер на акцепторния пул

Комплементарната площ над ИК на БФ е пропорционална на броя електрони, които могат да приемат акцепторите между двете фотосистеми до пълното затваряне на РЦ на ФС2. Размерът на ПХ пула се изчислява от отношението на площта над кривата измерена в контролни хлоропласти към тази в хлоропласти, третирани с диурон (Malkin, Kok, 1966).

Хетерогенност ФС2а/В

В присъствие на диурон изменението на комплементарната площ над флуоресцентната крива във времето изразява времевата зависимост на броя редуцирани Q_A (Melis, Duysens, 1979; Trissl et al., 1993). Melis и Homann (Melis, Homann, 1976) са открили двуфазност в хода на комплементарната площ и са нарекли двете фази α и β , отдавайки ги съответно на два типа Φ C2, различаващи се по своята антена. Значително по-бавната редукция на Q_A в β фазата се отдава на по-малката антена на Φ C2 β в сравнение с Φ C2 α (Melis, Duysens, 1979). Смята се, че Φ C2 α са локализирани в граните, а Φ C2 β в стромалните тилакоиди. Първите показват сигмоидално нарастване на флуоресценцията, а вторите – експоненциално. Експоненциалното нарастване на флуоресценцията от Φ C2 β се приема като показател, че тези комплекси са енергетично изолирани, т.е. при тях няма възможност възбуждането да се предаде от затворен на съседен отворен РЦ (кооперативност).

В процедурата, използвана от Melis и Homann, съществува възможност за грешка поради неточно определяне на крайната стойност на F_m и пълната комплементарна площ (Sinclair, Spence, 1988). Подобрена математическа процедура е предложена от Hsu и съавт. (Hsu et al., 1989). Тези автори разграничават три фази – α, β, и γ. Lazár и съавт.

(2001) разработват метод за оценка на трите вида ФС2 чрез паралелен регресионен анализ на ИК регистрирани при различен светлинен интензитет.

Бърза фаза на ИК при силна действаща светлина

Използването на много силен интензитет на действащата светлина за регистрация на ИК на БФ позволява да се разграничат две междинни нива в бързата фаза O–P (Schreiber, Neubauer, 1987; Neubauer, Schreiber, 1987), отбелязани като I₁ и I₂. Предположено е, че нарастването O–I₁ съответства на фотохимичната фаза на ИК, изследвана от Delosme (1967), която отразява редуцирането на Q_A. От друга страна преходът I₁–D₁–I₂– P е наречен термална фаза, тъй като зависи от температурата на измерването (Neubauer, Schreiber, 1987). Регистрацията на ИК с флуориметър PEA (Hansatech Instruments, Великобритания), позволяващ записване на флуоресценцията през 10 µs, е въведено от Strasser и Govindjee (1992). Двете нива се различават ясно в логаритмичен времеви мащаб и са отбелязани с буквите J и I. По-късно е установено, че J и I са еквивалентни на I₁ и I₂ (Strasser et al., 1995). Номенклатурата на Strasser за означаване на бързата фаза на ИК, регистрирана при силна възбуждаща светлина – OJ(D)IP – ще бъде използвана в настоящата работа.

Фотохимична фаза

Strasser и съавт. (1995) предполагат, че O–J фазата е свързана с редуциране на Q_A . Това се потвърждава от математичните модели на ИК и от нарастването на J в присъствие на диурон (Stirbet, Strasser, 1995; Ruth, 1996; Lazár et al., 1997; Lazár et al., 1998; Stirbet et al., 1998). Показано е също, че с намаляване на светлинния интензитет времето на поява на J се увеличава, така че пикът J е еквивалентен на I в ИК, измерени при ниска светлина (Strasser et al., 1995; Tomek et al., 2001). Всъщност новото стъпало, което се появява в ОЈІР кривите е I, а не J.

Термална фаза

Няма общоприето виждане за процесите, обуславящи термалната фаза (J–I–P) на ИК. В нивото I е предположено, че се акумулират състояния $Q_A^-Q_B^-$, докато фазата I–P се дължи на затваряне на ПХ и акумулиране на $Q_A^-Q_B^{2-}$ (Strasser, Govindjee, 1992). Друга хипотеза е, че в I и P нивата се редуцират два вида ПХ пул – съответно бърз и бавен (Strasser et al., 1995; Barthelemy et al., 1997).

От друга страна, според Schreiber и съавт. (2000), пълно затваряне на РЦ (редуциране на Q_A) става още в нивото Ј, но флуоресценцията е по-ниска поради неизвестни засега процеси на нефотохимично гасене. Установено е, че окисленият ПХ гаси 15–20% от флуоресценцията (Vernotte et al., 1979), което отговаря на прехода I–P. Като доказателство, че I–P преходът е свързан с гасене от ПХ се приема фактът, че след инхибиране с диурон, който не позволява редуцирането на ПХ, максималната флуоресценция достига приблизително стойността на I в контролните проби. Yaakoubd и съавт. (2002) установяват, че изкуственото увеличаване размера на ПХ пула допълнително намалява максималната флуоресценция в присъствие на диурон. При това термалната фаза на ИК според авторите е по-чувствителна към нефотохимично гасене от окислен ПХ, отколкото фотохимичната.

Schreiber и Neubauer (1990) наблюдават корелация в нарастването I_1-I_2 и електрохромното изместване при 515 nm, отразяващо трансмембранния потенциал. Авторите допускат влияние на локални електрични полета, генерирани при разделянето на зарядите в РЦ, върху свойствата на първичната радикалова двойка. Vredenberg и Bulychev (2002) също изтъкват възможността за "фотоелектрохимичен контрол" на първичните реакции в РЦ. Тяхната хипотеза е, че преходът I–P се дължи на промени в трансмембранния електричен потенциал, обусловени от активността на ФС1. Pospíšil & Dau (2002) демонстрират, че в ТМ фазата J–I се подтиска след премахване на трансмембранния потенциал с валиномицин, докато O–J и I–P не са чувствителни. Според авторите фотоиндуцираният трансмембранен електричен потенциал стимулира флуоресценцията във фазата J–I като ускорява излъчвателната рекомбинация на първичната радикалова двойка P680⁺Г.

Бавна фаза на ИК - гасене на флуоресценцията

След максимума Р флуоресценцията намалява, понякога с един или повече вторични пика, до установяване на стационарна стойност (Т), която при нормални физиологични условия е близка до началната (F_o). Ходът на БФ в тази фаза на ИК се контролира от множество едновременно протичащи процеси, затова е трудно да се интерпретира изцяло. В общ смисъл всяко намаляване на флуоресценцията от максималната ѝ стойност (Krause, Weis, 1991; Lazár, 1999) се означава като *гасене*. Два различни типа гасене определят добива на БФ. Отварянето на РЦ след активиране на ФС1, АТФсинтетазата и тъмнинната фаза на фотосинтезата се нарича фотохимично гасене, q_P. Всички механизми, които не са свързани с окислително-редукционното състояние на Q_A представляват нефотохимично гасене, q_{NP}.

Кинетиката на релаксация на нефотохимичното гасене след период на непрекъснато осветяване, както и изменението на гасенето под въздействие на някои инхибитори, разкриват най-малко три отделни компонента (Horton, Hague, 1988). Най-бързо релаксиращият компонент и същевременно отговорен за по-голямата част от общото гасене е q_E или енергозависимо гасене. Друг компонент, който релаксира за няколко минути, е свързан с прехода на фотосинтетичния апарат в състояние 2 и се означава q_T . Найбавният компонент, който води до значително намаляване на отношението F_v/F_m , е свързан с фотоинхибиране на реакционните центрове и съответно е наречен q_I .

Наименованието на q_E показва, че то следва енергизацията на тилакоидната мембрана, т.е. формирането на ΔpH . Гасене може да се индуцира и на тъмно от протонен градиент, генериран чрез хидролиза на АТФ (Gilmore, Yamamoto, 1992). За обяснение връзката на ΔpH с гасенето на флуоресценцията са обсъждани механизми, свързани с донорната или акцепторната страна на РЦ или с промени в антенните комплекси (вж. Kramer, Crofts, 1996). В последно време q_E се отдава, поне в по-голямата си част, на пигментите зеаксантин и антераксантин от ксантофиловия цикъл (Muller et al., 2001). Количеството синтезиран зеаксантин в ксантофиловия цикъл е строго свързано с q_E (Demmig-Adams, 1990). Инхибирането на виолаксантиндеепоксидазата с дитиотреитол се съпровожда с намаляване на q_E (Horton et al., 1994). В мутанти на *Arabidopsis*, които нямат лутеин и зеаксантин, не се наблюдава никакво енергозависимо гасене (Niyogi et al., 2001).

Забавена флуоресценция

Забавената флуоресценция (3Ф) е затихващо излъчване на светлина в червената област на спектъра от предварително осветени растения, водорасли или фотосинтезиращи бактерии, което продължава след приключване на тяхното осветяване. Явлението е открито от Strehler и Arnold (1951), които също са посочили връзката му с процесите на фотосинтезата. Те са постулирали, че 3Ф е хемилуминесценция на хлорофила, т.е. резултат от обръщане на първичните реакции на фотосинтезата. В многобройни изследвания е доказано, че 3Ф отразява функционирането на фотосинтезата и се влияе от редица стресови фактори, като нерядко е по-чувствителна от БФ (вж. Kramer, Crofts, 1996). Въпреки това, съвременното познание за този сигнал е ограничено и изостава в сравнение с БФ. Отчасти това се дължи точно на високата чувствителност на 3Ф към цялата

съвкупност реакции на фотосинтезата, което я прави изключително сложна функция от много променливи. Също причина за по-слабата популярност на 3Ф в сравнение с БФ е, че регистрирането на 3Ф е технически по-сложно за изпълнение (Lavorel et al., 1986).

По-надолу ще резюмираме сегашните възгледи за механизма на 3Ф, връзката ѝ с реакциите на фотосинтезата и факторите, от които се влияе. При написването на този раздел са използвани прегледите на Jursinic (1986), Гаевский и Моргун (1993), Radenović и съавт. (1994) и Kramer и Crofts (1996), както и монографията на Веселовский и Веселова (1990). Основополагащите изследвания в изучаването на 3Ф са прегледани порано от Lavorel (1975), Malkin (1977), Amesz и van Gorkom (1978).

Механизъм на 3Ф

Място на излъчване на 3Ф

ЗФ се излъчва (предимно) от молекулите на хл. *а* в антените на ФС2, за което свидетелстват следните открития. ЗФ не се регистрира или е много слаба в мутанти на *Scenedesmus* (Bertsch. et al., 1967) или грах (Matorin et al., 1974) без функционираща ФС2. В мембранни частици, обогатени с ФС2, ЗФ е с два порядъка по-интензивна, отколкото от обогатени с ФС1 частици (Itoh, Murata, 1973). Спектърът на възбуждане на ЗФ съвпада със спектъра на действие на фотосинтезата (Литвин, Шувалов, 1966). Спектрите на излъчване на ЗФ и БФ в растенията са практически еднакви (Arnold, Davidson, 1954; Lavorel, 1969). Показано е, че в зелени и червени водорасли в спектъра на излъчване няма ивици на съпровождащите пигменти хл. *b* и фикобилини (Ковалев, Красновский, 1980).

От казаното става ясно, че както БФ, така и ЗФ се излъчва при електронен преход от най-ниското синглетно възбудено на основното ниво на хл. a, намиращ се близо до РЦ на ФС2. Затова двата вида фотолуминесценция имат еднакви спектрални характеристики. Но БФ затихва за няколко пѕ след спиране на осветяването, докато ЗФ може да се наблюдава с часове. БФ се излъчва и след разрушаване на фотосинтетичния апарат и от разтвори на хл., докато за ЗФ е необходима интегрирана и функционираща каскада от електронни преносители. БФ и ЗФ се различават по механизма на възбуждане на излъчващите пигменти.

Рекомбинационна теория за 3Ф

Задържането на излъчването при ЗФ произхожда от преминаването на първично възбуденото състояние на пигментите в метастабилно състояние, което има по-малка енергия и по-голямо време на живот. Сега не буди съмнение теорията, че в първичните реакции на фотосинтезата се получават окислени и редуцирани продукти, а ЗФ е резултат от тяхната рекомбинация:

 $P680^+ Q_A^- \rightarrow P680^* Q_A \rightarrow P680 Q_A + hv_{(3\Phi)}$

Във всяка реакция на фотосинтетичния ЕТ се губи част от запасената енергия, което осигурява висока скорост на реакциите в права посока и стабилизация на разделените заряди. Въпреки това, на всеки етап съществува вероятност за протичане на обратната реакция. Електроните могат да се върнат на окисления първичен донор (Р680⁺) чрез тунелиране, което води директно до основното състояние на молекулата. Рекомбинацията може да протече и по активационен механизъм с образуване на синглетно възбудено състояние. Енергийният дефицит при това се запълва от топлинната енергия на средата. Делът на излъчвателната рекомбинация е малък в сравнение с безизлъчвателния механизъм (de Grooth, van Gorkom, 1981). Дезактивацията на вторично възбуденото състояние Р680* се определя от съотношението на същите скоростни константи, които определят добива на БФ (вж. уравнение 1). Механизмът и енергетиката на рекомбинацията, водеща до излъчване на ЗФ в РЦ на фотосинтезиращи бактерии са разгледани детайлно от Turzó и съавт. (1998; 2000).

Като се има предвид изложеното, за интензитета на ЗФ, L, може да се запише

$$L = I_a.\varphi_{\rm f}.k^*.[{\rm P680}^+ {\rm Q_A}^-], \tag{7}$$

където I_a е интензитетът на погълнатата светлина, φ_f – квантовият добив на флуоресценцията, k^* – скоростната константа на излъчвателната рекомбинация.

Уравнение (7) показва, че фактори, които влияят върху добива на флуоресценцията, ще се отразят по същия начин и на 3Ф (Lavorel, 1975).

Кинетични компоненти на 3Ф

След изключване на действащата светлина, ЗФ спада във времето, описвайки сложна многокомпонентна функция с характеристични времена на отделните компоненти, намиращи се във всички времеви мащаби – от наносекунди до минути и часове. Кинетиката на затихване на ЗФ отразява последователните етапи в електронтранспортната верига. Електроните може да се върнат от Q_A, Q_B и т.н. Положителните заряди също могат да се намират на различни места в донорната страна на ФС2. Това определя наличието на множество състояния, отговорни за излъчването на ЗФ и наличието на много компоненти в кинетиката на затихване с различни амплитуди и характеристични времена.

В даден момент интензитетът на 3Ф се определя от количеството РЦ, намиращи се в състояния, способни да произведат рекомбинация. Кинетиката на 3Ф следва кинетиката на изчезване (дезактивация) на тези състояния:

$$\frac{dc_i}{dt} = -k_i c_i \tag{8}$$

или в интегрален вид

$$c_i(t) = c_0 e^{-k_i t}, (9)$$

където c_i е концентрацията на *i*-тото състояние, а k_i е сумата от скоростните константи на ЕТ от това състояние в права и в обратна посока.

Тогава общата кинетика на 3Ф може да се представи като сума от експоненти (Lavorel, 1975):

$$L(t) = \sum_{i} L_{i} e^{-\frac{t}{\tau_{i}}},$$
 (10)

където L_i е амплитудата на съответния кинетичен компонент, а τ_i е характеристичното време.

Кинетика на 3Ф в милисекундната област

В най-голяма част от работите със 3Φ се разглежда излъчването, измерено в интервал от няколко милисекунди след края на осветяването. Прието е, че 3Φ в тази област е резултат от рекомбинация на състоянията $P680^+Q_A^-$ (Itoh, Murata, 1974) или $Z^+P680Q_A^-$ (van Gorkom, Donze, 1973).

Милисекундната кинетика на затихване на 3Φ се регистрира с помощта на фосфороскоп (Lavorel et al., 1986). Веселовский и Веселова (1990) обобщават действието на електронни донори и акцептори върху бързата и бавната част на кривите на затихване в областта от една до няколко десетки милисекунди. 3Φ в бавния участък включва и светене, индуцирано не само в последния цикъл на осветяване, което не е успяло да затихне напълно в предходните периоди. Акцептори, които ускоряват ЕТ, стимулират бързия компонент и понижават бавния, докато инхибитори на ЕТ между Q_A и Q_B (диурон) намаляват бързия и увеличават бавния компонент на кинетиката. Инхибирането на донорната страна на Φ С2 има противоположно действие върху двете

ната страна на Φ C2 има противоположно действие върху двете фази на затихването. Предположено е, че бързият компонент се определя предимно от скоростните константи на правите реакции, а бавният – от обратните реакции. Бавните компоненти отразяват също рекомбинацията на зарядите между хиноновите акцептори и S състоянията на КОС (Joliot et al., 1971).

Гаевский и Моргун (1993) отделят микросекунден компонент в кинетиката на затихване на 3Ф с характеристично време 160 µs и милисекунден, с време 1–6 ms. Амплитудата на микросекундния компонент нараства в условия, създаващи повишена концентрация на $P680^+$, например при ниско pH (Haveman, Lavorel, 1975), поради което е предположено, че той е свързан с рекомбинация на $P680^+Q_A^-$. Времето на живот на бързия компонент се запазва постоянно във физиологични условия, независимо от скоростта на реакциите в донорната или акцепторната страна на $\PhiC2$. Забелязано е, че то е поголямо в интактни листа, отколкото в изолирани хлоропласти.

Милисекундният компонент, според Гаевский и Моргун, отразява кинетиката на окисление на първичния хинон от ПХ. Ускорението на ЕТ ще води до намаляване на неговото характеристично време за сметка на увеличаване дела на правата реакция в изчезването на състоянията – предшественици на ЗФ.

Дългоживущи компоненти на 3Ф

Като постоянна съставка в кинетиката на затихване в милисекундната област участват дългоживущите компоненти на 3 Φ , които могат да се наблюдават без фосфороскоп в рамките на секунди и минути. Емисионният спектър на 3 Φ в тази област е същият, както на милисекундната 3 Φ (Gerhardt, Krause, 1984), така че излъчването е също от Φ C2. При топлинна инактивация на КОС или увреждането ѝ с Tris или хидроксиламин, тази фаза на 3 Φ изчезва. Затова се предполага, че за генерирането на дългоживущите компоненти отговарят положителни заряди, натрупани по време на осветяването в КОС – състояния S₂ и S₃ (Joliot et al., 1971).

В изолирани хлоропласти при стайна температура Rutherford и Inoe (1984) откриват два компонента в секундната кинетика на затихване на 3Ф с характеристични времена, съответно, 1,5 и 25 s. След прекъсване на ЕТ с диурон вторият изчезва, а амплитудата на първия нараства. Направен е изводът, че затихването на 3Ф с характеристично време 1,5 s съответства на рекомбинация на заряда между $S_2(S_3)$ и Q_A^- , а 25-секундният компонент отразява рекомбинация с Q_B^- . На тъмно Q_B^- (за разлика от Q_B^{2-}) е стабилен, защото не може да се реокисли от пластохиноновия пул.

Показано е (Vasil'ev et al., 1988; Vasil'ev, Venediktov, 1993), че третирането на TM с диурон стимулира секундната 3Φ с $\tau \approx 2$ s, но при по-високи концентрации (10^{-4} M) и този компонент изчезва. Предполага се, че инхибирането на секундната 3Φ е резултат от свързване на диурона с донорната страна на Φ C2.

Зависимост на 3Ф от мембранния потенциал

Стимулирането на 3Ф от трансмембранния електрохимичен потенциал е неоспоримо доказано. Демонстриран е стимулиращ ефект от дифузионен потенциал, създаден чрез добавяне на соли в суспензия от ТМ (Barber, Kraan, 1970; Гольцев, 1979; Venediktov et al., 1980), фотохимично генериран потенциал (Junge, Jackson, 1982) или външно приложено електрично поле (Arnold, Azzi, 1971; de Grooth, van Gorkom, 1981).

Влиянието на енергизацията на мембраната върху 3Ф може да се обясни в светлината на рекомбинационната теория за механизма на 3Ф (Wraight, Crofts, 1971; Evans, Crofts, 1973). Според предложения механизъм трансмембранният електрохимичен градиент намалява енергията на активационната бариера на излъчвателната рекомбинация. Тъй като рекомбиниращите състояния са в болцманово равновесие с активирания междинен продукт, намаляването на енергията на активация ще доведе до експоненциално нарастване на скоростта на обратната реакция. Така, между енергизацията на мембраната и 3Ф се очаква експоненциална зависимост (Evans, Crofts, 1973):

$$L \sim e^{-\frac{E_a - \Delta \mu \mathrm{H}^+}{kT}} \sim e^{-\frac{E_a - F \,\Delta \psi + 2, 3.RT \,\Delta \mathrm{pH}}{kT}},\tag{11}$$

където E_a е активационната енергия, $\Delta \psi$ е електричният потенциал, R, k и T са, съответно, универсалната газова константа, константата на Болцман и абсолютната температура.

Обикновено се приема, че потенциалът стимулира 3Φ , ускорявайки обратната реакция, но е възможен и друг път – увеличаване на вероятността рекомбинацията да протече по излъчвателен механизъм. De Grooth и Van Gorkom (1981) сравняват нарастването на 3Φ след единичен електричен импулс със скоростта на рекомбинация на Q_A^- , отчетена по изменението на Б Φ и на абсорбцията при 320 nm. Интензитетът на 3Φ и скоростната константа на рекомбинацията нарастват с няколко порядъка след прилагане на импулса, но коефициентът на пропорционалност между тях остава един и същ в присъствие и отсъствие на електрично поле. Авторите заключават, че трансмембранният потенциал влияе само върху скоростта на рекомбинацията, без да увеличава вероятността тя да доведе до излъчване на 3Φ .

Индукционни криви на 3Ф

Фосфороскопското измерване на 3Ф позволява да се проследят фотоиндуцираните времеви промени в излъчването при прехода на фотосинтетичния апарат от тъмнинно в светлинно състояние, означени като индукция на 3Ф (Malkin, 1977). Индукционните криви (ИК) на 3Ф се считат за добър индикатор за капацитета на ЕТ, трансмембранния протонен градиент и интегритета на ТМ (Havaux, Lannoye, 1983; Fork et al., 1985; Bilger, Schreiber, 1990).

Формата на ИК зависи от типа изследван материал, физиологичното състояние на пробата, скоростта на фотосинтезата (Климов, 1988; Härtel et al., 1993; Srivastava et al., 1999). От друга страна ИК могат да имат различни характеристики в зависимост от конкретните условия на измерването – температурата по време на регистрация (Веселовский, Веселова, 1990; Marković et al., 1999); времето на предварителна тъмнинна адаптация (Веселовский, Веселова, 1990; Radenović et al., 1994); интензитета на действащата светлина (Моргун, Должиков, 1990). Значение има и времевият интервал между светлинните импулси, в който се регистрира 3Ф (Itoh, Murata, 1974; Malkin et al., 1994; Zaharieva, Goltsev, 2003). За съжаление последните два фактора правят трудно съпоставянето между ИК, получени в различни лаборатории, поради което липсва и обща номенклатура на наблюдаваните максимуми.

Някои автори означават максимумите на 3Φ като заемат номенклатурата на ИК на $5\Phi - I$, D, P, S (Itoh, Murata, 1973; Моргун, Должиков, 1990; Гаевский, Моргун, 1993). Други номерират последователно максимумите – M₁, M₂, M₃ (Веселовский, Веселова, 1990); L₁, L₂, L₃ (Satoh, Katoh, 1983); или буквено – A, B, C, D (Radenović et al., 1994; Marković et al., 2001). Goltsev и Yordanov (1997) означават конвексните фази (максимуми) с I₁, I₂, I₃, ..., а конкавните (минимуми) с D₁, D₂, D₃, ... Аналогия между отделните номенклатури трябва да се прави внимателно, защото времената на максимумите не са постоянни и невинаги в ИК се проявяват едновременно всички максимуми.

Промените на 3Ф по време на индукцията се контролират от два фактора – отвореността на РЦ на ФС2 и трансмембранния потенциал (Malkin et al., 1994). Влиянието на първия фактор обаче е сложно поради това, че и отворените, и затворените РЦ могат да излъчват 3Ф. Прието е че, бързите компоненти в кинетиката на затихване са пропорционални на концентрацията на отворените РЦ в съответния момент от индукцията, а затворените РЦ имат принос в бавните компоненти на 3Ф (Mar et al., 1975; Веселовский, Веселова, 1990; Malkin et al., 1994).

Бърза фаза на ИК

Обикновено ИК на 3Ф се разделят на две фази – бърза, включваща първите 200 ms (Гаевский, Моргун, 1993) до няколко секунди (Веселовский, Веселова, 1990) и бавна – от секунди до минути. В началото на индукционния период 3Ф рязко нараства до първия максимум в бързата фаза – I, L₁, M₁. В този максимум преобладава микросекундният компонент на 3Ф, но участие има и милисекундният (Гаевский, Моргун, 1993). Амплитудата му се повишава при забавяне на ЕТ в донорната страна на ФС2 и нараства линейно с интензитета на възбуждащата светлина.

 L_1 е свързан с трансмембранния електричен градиент, формиран непосредствено след включване на светлината за сметка разделянето на зарядите от РЦ (Satoh, Katoh, 1983). Доказателство за това е, че 1) максимумът изчезва след третиране с агенти, които разсейват електричния потенциал (валиномицин) и 2) по същото време се регистрира максимум в абсорбцията при 560 nm, която е показател за трансмембранния потенциал. От друга страна, максимумът в бързата фаза на ИК съпътства нарастването на БФ и затова е предположено, че той е пропорционален на количеството окислен Q_A преди началото на осветяването (Itoh, Murata, 1973).

В интактни водорасли или листа в бързата фаза се различават два максимума (Satoh, Katoh, 1983; Goltsev, Yordanov, 1997). Поставянето на интактни хлоропласти в хипотонична среда води до пълно изчезване на втория максимум, затова Satoh и Katoh (1983) приемат, че за неговата поява е необходима интегрираната структура на целия хлоропласт.

В бързата фаза на ИК обикновено се наблюдава спад след максималната стойност на 3Ф, свързан с редуциране на пластохиноновия пул и затваряне на РЦ (Гаевский, Моргун, 1993). По време на тази фаза в общото светене се увеличава делът на бавния компонент на затихването, а намалява бързият (Itoh, Murata, 1973; Mar et al., 1975). Паралелно се увеличава времето на живот на милисекундния компонент. В присъствие на ферицианид и при разпрягане на ЕТ от фотофосфорилирането обаче, увеличението на времето на живот е незначително.

Бавна фаза на ИК

Нарастването на 3Ф в бавната фаза на ИК се свързва с генерирането на трансмембранен протонен градиент (Wraight, Crofts, 1971; Evans, Crofts, 1973). Установено е, че логаритъмът от амплитудата на 3Ф в максимума е пропорционален на скоростта на ЕТ, отчетена по редуцирането на ферицианид (Моргун, Должиков, 1990). Авторите приемат, че скоростта на ЕТ е линейно свързана с ∆рН. В хода на тази фаза времето на живот на милисекундния компонент на 3Ф не се изменя значително (Гаевский, Моргун, 1993).

От друга страна се допуска, че в нарастването на 3Φ има отражение активирането на ЕТ на акцепторната страна на Φ C2, водещо до реокисляване на ПХ и отваряне на РЦ (Веселовский, Веселова, 1990; Malkin et al., 1994). Това предположение е основано на наблюдението, че нарастването на 3Φ става по време на намаляване на Б Φ след Р, което се счита, че има предимно фотохимичен характер при невисоки светлини (Бухов et al., 1989).

Пътят на 3Ф от максимума до стационарната ѝ стойност, която в интактни листа при нормални условия е с около порядък по-ниска (Гаевский, Моргун, 1993), вероятно се определя от няколко едновременни процеса. Според Климов (1988) амплитудата на спада е пропорционална на скоростта на асимилация на CO_2 . Изчерпването на акумулирания протонен градиент след активиране на АТФ-синтетазата би могло да бъде причина за намаляване на 3Ф. Съдържанието на АТФ в хлоропластите обаче също намалява паралелно със 3Ф (Бухов et al., 1989). В тази фаза на ИК намаляват амплитудата и времето на живот на милисекундния компонент на затихването (Моргун, Должиков, 1990; Гаевский, Моргун, 1993). Според авторите първото явление се дължи на намаляване на електричния компонент на мембранния потенциал при транспорт на Mg^{2+} извън тилакоидите, а второто е следствие от ускоряване на ЕТ с активиране на ензимите от цикъла на Калвин – Бенсон.

За интерпретацията на спада на 3Ф трябва да се има предвид, че в бавната фаза на индукционния период 3Ф и БФ имат паралелен ход (Bilger, Schreiber, 1989; Malkin et al., 1994). Възможно е нефотохимичното гасене на БФ да подтиска също 3Ф, защото и 3Ф би трябвало да зависи от квантовия добив на флуоресценцията (Lavorel, 1975). При определени светлинни интензитети енергозависимото гасене има главна роля в бавния спад на 3Ф, според Bilger и Schreiber (1989).

Трябва да се уточни, че в литературата се разглеждат два максимума в бавната фаза на ИК. Те могат да се разграничат като се направи сравнение между хода на БФ и ЗФ. Единият максимум съвпада с фазата Р–S на ИК на БФ, а другият се наблюдава покъсно, по време на фазата S–M–T на БФ. По номенклатурата на Radenović (1994) това са максимумите С и D, съответно, а по Веселовский и Веселова (1990) – M₂ и M₃. В настоящата работа се разглежда само първият максимум.

Независимо, че до днес процесите и механизмите, участващи в излъчването на ЗФ от растенията, не са изяснени докрай, анализът на ЗФ може да бъде използван като тест за оценка действието на различни стресови фактори върху фотосинтетичния апарат. Чрез метода на ЗФ различни авторски групи са изследвали влиянието на абиотични (Härtel et al., 1993; Cajanek et al., 1998; Zaharieva et al., 2001; Gerhardt, Bodemer, 2001)} и биотични (Milanov et al., 1997; Христов и съавт., 2001) растителни стресори. Поради своята високата чувствителност и информативност този недеструктивен метод има потенциал да увеличи своята практическа приложимост за изследване на физиологичното състояние на растенията и за изучаване процесите на фотосинтезата. Този процес ще се ускори с напредването на технологиите в измервателната и анализираща апаратура, с натрупването на експериментални данни за поведението на БФ и ЗФ в отговор на различни въздействия, които да бъдат основа за развитието на обща теория за луминесценцията на растенията.

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

4. Да се проследи динамиката на хербицидния 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 хербицидния ефект от температурата.

6. Да се изследва влиянието на pH 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 от семена, доставени от опитното поле на Биологическия факултет. След като са престояли 24 часа във вода, семената се разстилат върху филтърна хартия, чиито краица са потопени във вода и се оставят за покълване три денонощия на тъмно при температура 23–25°C. Прорастъците се нареждат върху съдове с хранителен разтвор през разстояние около 2 сm, по 50–60 растения на литър разтвор.

Хранителната среда съдържа 1 g/l Ca(NO₃)₂ (6,1 mM), 0,25 g/l KH₂PO₄ (1,8 mM), 0,25 g/l MgSO₄ (2,1 mM), 0,125 g/l KCl (1,7 mM), FeCl₃ (следи), разтворени в питейна вода, pH 6,5.

Растенията са отглеждани във фитостатно помещение при интензитет на светлината 60 μ mol.m⁻².s⁻¹, осигуряван от луминесцентни лампи, фотопериод 12/12 h, температура 23–25°С и относителна влажност на въздуха 50–65%. В експериментите са използвани 14-дневни растения, които имат 5 развити листа. Измервания са правени върху 3ти лист, ако не е отбелязано друго.

Изолиране на тилакоидни мембрани

Тилакоидни мембрани са изолирани по метода на Whatley и Arnon (1963) с модификации. Откъснатите листа се поставят за 30 min при температура 4°C, след което се хомогенизират в среда за изолиране с pH 7,8, съдържаща калиево-натриев фосфатен буфер (1/15 M Na₂HPO₄, 1/15 M KH₂PO₄), 330 mM Sorbitol, 5 mM MgCl₂. След прецеждане през четирислоен тъканен филтър хомогенатът се центрофугира в хладилна центрофуга K-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% (Гольдфельд и съавт., 1980).

За всяка процедура по изолирането на хлоропластите са използвани предварително охладени стъклария и инкубационна среда, а самото изолиране е проведено при слабо осветление – до 1 lx.

ОБРАБОТКА С ХЕРБИЦИДИ

Разтвори на хербициди

Използвани са следните хербициди:

- диурон, 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилурея, SIGMA
- атразин, 2-етиламино-4-хлоро-6-изопропиламино-1,3,5-триазин, SERVA
- диносеб, 6-(втор-бутил)-2,4-динитрофенол, SERVA

Първоначално се приготвя изходен разтвор като сухото вещество се разтваря в 95% етанол до концентрация 3 mM. Преди експериментите изходните разтвори се разреждат до желаната крайна концентрация с дестилирана вода. За изследванията с интактни листа към хербицидните разтвори не са добавяни сърфактанти или буфери.

Третиране на листа с хербициди чрез дифузия

При този метод на третиране хербицидите навлизат пасивно през повърхността на интактния лист. По-надолу методът ще бъде наричан *листна дифузия* за удобство.

Откъснатите листа се поставят в петриеви панички между два слоя филтърна хартия. Листата се подреждат с долната част нагоре без се припокриват. Добавя се разтвор на хербицид (съответно дестилирана вода за контрола) в достатъчно количество, за да покрие напълно горния филтърен слой (20 ml в паничка с диаметър 10 cm) и се отстраняват образувалите се въздушни мехурчета.

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° С и интензитет на светлината $50 \ \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. При експериментите за определяне влиянието на светлината по време на инкубиране сме прилагали друг режим на осветяване с различни интензитети, получени с помощта на шрайбпроектор. В този случай е използван воден филтър (10 cm), за да се предотврати нагряването от близкостоящата халогенна лампа.

Третиране на листа с хербициди чрез инфилтрация

Вакуумно инфилтриране на откъснати листа с хербициден разтвор е извършвано по процедура, описана от Malkin и съавт. (1992). Двойка листа се поставят в пластмасова спринцовка с обем 50 ml. Изтеглят се 10 ml разтвор и остатъчният въздух в спринцовката се отвежда. Като се държи изходът на спринцовката плътно затворен, буталото се изтегля максимално, за да се постигне достатъчно ниско налягане. Визуално това се потвърждава с поява на въздушни мехурчета около листата. След това буталото се връща обратно и се прилага натиск, така че освободените междуклетъчни пространства да се заемат от разтвора. Процедурата се повтаря три пъти. При успешно инфилтриране листата потъват в разтвора. За измерване се вземат листа, които изглеждат полупрозрачни по цялата петура и нямат механични увреждания.

След инфилтрацията листата престояват един час на тъмно, потопени в същия разтвор.

Третиране на цели растения през стъблото

За удобство този метод на третиране ще бъде наричан стъблен транспорт.

Стъблата на растенията се прерязват в основата под вода и корените се отстраняват. Растенията се потапят до първи лист в стъклени чаши с 50 ml разтвор на хербицид или дестилирана вода, по три растения във всяка чаша, така че да не се засенчват. Третирането продължава 20 h, като в първите 12 h растенията престояват на тъмно, при температура 23° C, а през следващите 8 h те се осветяват с интензитет 50 µmol.m⁻².s⁻¹ при температура 25° C. Такъв режим сме избрали от технически съображения, тъй като сме използвали една и съща камера едновременно за отглеждане и за третиране на растения.

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 MgCl₂. 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 µg.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

Описание на флуориметъра FL-2006

ИК на БФ и 3Ф, тъмнинното затихване на 3Ф и термограми на стационарната БФ и 3Ф са регистрирани с флуориметъра FL-2006 (Тест, Русия). Принципната схема на апарата е представена на фиг. 8.



Фиг. 8. Схема на апарата FL-2006. 1 - халогенна лампа; 2 - фокусираща леща; 3 - синьозелен стъклен филтър C3C-22 (λ ≤ 660 nm); 4 - червен стъклен филтър KC-19 (λ ≥ 680 nm); 5 - електронно управляем прекъсвач на светлината; 6 - проба; 7 - светлоизолирана камера; 8 - въртящ се диск; 9 електромотор; 10 - фотоумножител ФЕУ-79; 11 - циркулираща вода за охлаждане; 12 - електронен блок за управление и регистрация, включващ: стабилизиращо захранване за ФЕУ и лампата, двуканален усилвател, двуканален АЦП, управление на температурния блок, управление на светлинния прекъсвач, синхронизатор на електромотора; 13 - компютър.

Като източник на действаща светлина се използва халогенна лампа (1) с мощност 70 W, имаща стабилизиращо захранване 9 V. Система от лещи (2) фокусира светлината върху входния отвор на фосфороскопа. Светлинният интензитет върху пробата при въртящ се диск е 1200 μ mol.m⁻².s⁻¹.

За регистрация на ИК е необходимо рязко първоначално включване на действащата светлина. Използваният светлинен източник е предназначен за продължително стабилно осветяване на обекта, но се характеризира с относително бавно запалване след като е подадено напрежение, съответно бавно изключване. За да бъдат осигурени достатъчно остри фронтове е поставена електромагнитна бленда (5) с електронно управление. Тя

прекъсва или пропуска светлинния поток за време по-малко от 1 ms. Движението на блендата е синхронизирано с диска на фосфороскопа посредством фотодвойка.

За течни (суспензии от хлоропласти или водорасли), и твърди (листни дискове и листа) проби са предвидени два вида държатели. В първия случай това са полистиролови кювети с ниска собствена флуоресценция и ЗФ, сравнима с кварцови кювети. Твърдите проби се поставят между две метални пластини с отвор за осветяване с размери 0,8 cm².

Температурата на държателя се контролира чрез комбинация от нагреваема жичка и елемент с преход на Пелтие. Температурата се отчита с вграден съпротивителен датчик. Управляващият блок подава кратки импулси на нагревателя или охладителя и поддържа зададената температура с точност $\pm 0,5$ °C. Освен температурна стабилизация е предвиден и режим на сканиране, при който температурата на обекта се повишава постепенно между две предварително зададени крайни стойности със скорост около 3°C/min.

Квантите на БФ и ЗФ се регистрират посредством два фотоумножителя тип ФЕУ-79, поместени в непроницаеми кожуси (10). Те имат мултиалкален фотокатод със спектрална чувствителност тип S20. БФ се разделя от възбуждащата светлина чрез кръстосани светофилтри: синьозелен C3C-22 с $\lambda \le 660$ nm (3), поставен между лампата и обекта, и червен КС-19 с $\lambda \ge 680$ nm (4) между обекта и фотодетекторите. Регистрацията на ЗФ става с бекерелов тип дисков фосфороскоп, който механично разделя във времето осветяването на обекта и отчитането на излъчената ЗФ.

Дискът се върти от електрически мотор (9) със скорост 2000 об./min, осигурявайки продължителност на цикъла около 11 ms. Във всеки цикъл пробата се осветява в продължение на 5,15 ms. В този период се регистрира излъчваната БФ. В следващите 0,35 ms осветяването спира и се отваря прозорецът пред втория фотоумножител, който регистрира експоненциалния тъмнинен спад на 3Ф в период от 5,15 ms. След 0,35 ms тъмнинен интервал започва следващият цикъл. Времето за отваряне и затваряне на прозореца пред осветителя е около 0,2 ms. Анодните сигнали от двата фотоумножителя се усилват и се отчитат от двуканален 10-битов АЦП на всеки 40 µs.

Управлението на апаратурата, записването, съхраняването и първоначалната обработка на получените данни се осъществява софтуерно с програма, разработена от Ивелина Захариева и Петко Чернев. В получените ИК на БФ и ЗФ всяка точка представлява интегрирана стойност от всички направени отчитания в един цикъл на фосфороскопа. Отделно от ИК се записват целите тъмнинии спадове на ЗФ за последващ анализ.

Провеждане на измерванията

Адаптираните на тъмно откъснати листа се поставят в камерата на фосфороскопа за 1 min. В експериментите с различни температури листата престояват 3 min в камерата при съответната температура на измерването. ИК на БФ и 3Ф 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 3Φ се използва специален 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, като стационарната стойност на БФ, 3Φ и тъмнинният спад на 3Φ се отчитат през 1°C.

Регистрация на OJIP криви с флуориметър HandyPEA

Описание на флуориметъра

В допълнение към измерванията на ИК, правени с FL-2006, фотоиндуцираният преход на БФ О–J–I–P е проследяван в интактни листа с микросекундна времева разделителна способност с помощта на портативен флуориметър HandyPEA (Hansatech Instruments, Великобритания). Флуориметърът работи с непрекъсната възбуждаща светлина с изцяло електронно управление на включването и изключването (без механични бленди).

Листът се поставя в специален държател, изолиращ външната светлина. Към държателя се прикрепва **сензорната глава** на флуориметъра, която осигурява действащата светлина и регистрира излъчената флуоресценция. Флуоресценцията се възбужда от три свръхярки светодиода, излъчващи червена светлина с пиков интензитет при 650 nm. Инфрачервеното излъчване на светодиодите се блокира от ИЧ филтри. С помощта на лещи възбуждащата светлина се фокусира върху отвора на държателя, който е с диаметър 4 mm. Максималният интензитет на светлината на повърхността на пробата е > 3000 µmol.m⁻².s⁻¹. Излъчването на светодиодите се контролира от електронна схема с обратна връзка, която следи и коригира флуктуации, свързани с вътрешното нагряване на светодиодите или околната температура.

Детекторът на флуоресценцията, разположен в центъра на сензорната глава срещу отвора на държателя, е бързореагиращ PIN фотодиод. Възможността за попадане на от-

разената възбуждаща или разсеяна светлина върху детектора се изключва с помощта на филтър Kopp Corning RG9, пропускащ над 700 nm. Флуоресцентният сигнал се отвежда в контролния блок на флуориметъра с връзка RJ-45, категория 5, и след усилване се преобразува в цифров и съхранява в оперативната памет на апарата.

Контролният блок на HandyPEA съдържа 16-битов микропроцесор, който управлява всички функции на инструмента, 512 КВ оперативна памет за съхраняване на данните (достатъчна за запазване на 1000 ИК), 12-битов АЦП с времева разделителна способност 10 µs за флуоресцентния сигнал и 8-битов АЦП за корекция на светлинния източник, тактов генератор, часовник, сериен порт RS-232 за връзка с компютър, акумулаторна захранваща батерия, течнокристален дисплей и клавиатура.

Провеждане на измерванията

Всички измервания са правени с листа, предварително престояли един час в затъмнено помещение. Допълнително листата се оставят за 1 минута в затворените държатели. Листата се поставят с долната повърхност към сензорната глава. Флуориметърът се стартира с предварително въведен протокол на измерването, определящ продължителност на регистрация 1 s и интензитет на действащата светлина 3000 µmol.m⁻².s⁻¹. Всички ОЛР криви се регистрират от различни листа, като за всяка експериментална група се правят по 6 измервания.

Измерване на ОЈІР криви при различни температури

Температурните характеристики на хлорофилната флуоресценция регистрирахме с помощта на специално конструирана термостатираща масичка. Пробата се разполага върху алуминиева пластина, като листата се притискат с оригинален държател за флуориметъра HandyPEA, закрепен подвижно в две фиксирани положения – за плоски обекти (листа) и за течни (хлоропластни суспензии). Температурата на пластината се отчита с платинен съпротивителен датчик Pt100 и се регулира от микропроцесорен термоконтролер TC502SP (VEMA, Плевен). Температурата се поддържа в охладителен режим чрез постоянно охлаждане с елемент с преход на Пелтие, мощност 30 W, и периодично нагряване с транзистори, работещи в режим на нагряване. Термоконтролерът управлява включването и изключването на нагревателя. Точността на поддържането на температурата в стационарен режим е $\pm 0,1^{\circ}$ С. След като се стабилизира желаната температура на масичката, откъснат лист се фиксира върху нея и след триминутно изчакване за уравновесяване на листната температура се включва измерването на ИК с HandyPEA.

Флуоресцентни образи

Образи на флуоресценцията от цели растения бяха заснети със съдействието на проф. Рето Страсер и Роналд Малдонадо-Родригез в Лабораторията по биоенергетика към Женевския университет. Единствено в тези експерименти бяха използвани грахови растения от местен сорт, отглеждани като почвена култура във вегетативна къща.

Описание на апаратурата

Видеозаписи на флуоресцентните образи бяха правени с помощта на модифицирана версия на апарата FluorCam M690 (Photon System Instruments, Чехия). Възбуждащата светлина се излъчва от два панела светодиоди (DH-08, Hewlett-Packard, CAIII) с $\lambda = 635$ nm. На всеки от панелите са разположени 350 светодиода, така че светлината пада равномерно върху основата на камерата, като максималният интензитет е 300 µmol.m⁻².s⁻¹. Включването и изключването на светлината и нейният интензитет се контролират от компютър. Флуоресценцията се разделя от възбуждащата светлина с помощта на специално изработен интерференчен филтър с $\lambda_{max} = 700$ nm и полуширина 30 nm и червен филтър с кант RG697 (Corion, САЩ). Преминалата флуоресценция се отчита от ССDкамера с вариобектив (F2.8–6 mm), която генерира цифрови изображения с размер 320×240 пиксела и 8-битово кодиране (256 нива на сивото). Системата може да записва изображенията със скорост до 25 кадъра/min.

Провеждане на измерванията

Техниката на флуоресцентните образи е прилагана, за да се визуализира абсорбцията на хербицидите през стъблото и движението им през растителните тъкани. Корените на растенията се отрязват под вода и се отстраняват. За да се ограничат растежните движения и да се ориентират листата подходящо към видеокамерата, стъблата и листните дръжки се фиксират внимателно с лепенка към стъкло с матирана повърхност.

Стъблата се потапят в пластмасови епруветки (по едно растение в епруветка) с обем 50 ml, пълни с дестилирана вода или разтвори на атразин, диурон или диносеб с концентрация 6 µM. Епруветките са предварително покрити с парафилм, в който е изрязан отвор само за стъблото, така че листата нямат контакт с разтвора.

Непосредствено след потапянето на стъблата, стативът с епруветките се поставя в камерата на флуориметъра и се включва видеозаписът. Изображения се записват на всеки 3 min за период от 24 h.

Обработка на резултатите

Програма Indwin

За обработване на ИК на БФ и ЗФ беше специално разработена програма Indwin за Microsoft Windows. Програмата разчита двоичните файлове във формат 2006, съдържащи регистрираните 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 (фиг. 9) за преглед от потребителя и ръчно настройване на позициите на максимумите, ако е необходимо.

Параметрите на БФ и ЗФ – амплитудите и времената на пиковете 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.



Фиг. 9. Основен екран на програмата Indwin за вторична обработка на ИК на БФ и 3Ф. Програмата разчита двоичните изходни файлове, генерирани при измерванията с FL-2006, изглажда ИК, изобразява ги на екрана, изчислява параметрите на ИК и дава възможност да се коригират позициите на характеристичните точки.

JIP тест

Регистрираните с HandyPEA OJIP криви са анализирани чрез разработения от Strasser (Strasser et al., 2000; Strasser, Tsimilli-Michael, 2001) JIP тест. Анализът предоставя количествени параметри, отговарящи на енергетичните потоци през Φ C2 и ефективностите за трансформация на енергията на всяко стъпало. Дефинират се следните потоци: ABS – поток на абсорбираната светлина; TR₀ – поток на квантите, уловени от PЦ чрез фотохимично редуциране на Q_A; ET₀ – електронен транспорт (реокисляване на Q_A⁻); DI₀ – разсеяна енергия под формата на топлина или флуоресценция. Индексът "0" посочва, че стойностите са за началния момент след включване на действащата светлина. Тези потоци се изразяват относително един реакционен център – ABS/RC, TR₀/RC, ET₀/RC, DI₀/RC, или за абсорбираща повърхност, CS – ABS/CS, TR₀/CS, ET₀/CS, DI₀/CS. Първите се наричат "специфични", а вторите "феноменологични" потоци.

Чрез отношенията между потоците се изразява квантовата ефективност на съответните процеси – $TR_0/ABS = \phi_{Po}$ е добивът на първичната фотохимична реакция; ET_0/TR_0 = ψ_0 е ефективността на реокисляване на Q_A^- (пренасяне на електрона към Q_B); $ET_0/ABS = \phi_{Eo}$ изразява квантовия добив на електронния транспорт.

Потокът TR₀/RC се изчислява от началния наклон на флуоресцентната крива, когато ЕТ предварително е блокиран, например с диурон. Тогава нормализираният към F_v наклон е $M_{0,DCMU}$. В противен случай наклонът на кривата, M_0 , ще се намалява от потока на електрони пренесени от Q_A към Q_B :

$$M_0 = TR_0/RC - ET_0/RC$$
(12)

Strasser и Strasser (1995) са показали, че инхибирането на електронния транспорт в нормални проби може да се симулира като се нормализира наклонът спрямо V_J:

$$TR_0/RC = M_{0,DCMU} = M_0/V_J$$
 (13)

 V_J е относителната вариабилна флуоресценция в J: $V_J = (F_J - F_o)/(F_m - F_o)$. Скоростта на ET се получава от (12) и (13):

$$ET_0/RC = TR_0/RC - M_0 = M_0/V_J - M_0 = M_0/V_J . (1-V_J) = TR_0/RC.(1-V_J)$$
(14)

Оттук следват изразите за ефективността на електронния транспорт:

$$\psi_0 = ET_0 / TR_0 = 1 - V_J, \tag{15}$$

$$\varphi_{Eo} = ET_0 / ABS = TR_0 / ABS \cdot ET_0 / TR_0 = \varphi_{Po} \cdot \psi_0$$
(16)

Квантовият добив на фотохимичната реакция $TR_0/ABS = \varphi_{P_0}$ се изчислява по уравнение (6). Тогава (16) може да се преобразува в

$$\varphi_{\rm Eo} = (1 - F_{\rm o}/F_{\rm m}).(1 - V_{\rm J}) \tag{17}$$

Потокът на абсорбираните кванти – ABS/RC – се извежда по следния начин:

$$TR_0/RC = TR_0/ABS \cdot ABS/RC = \varphi_{Po} \cdot ABS/RC$$
 (18)

$$ABS/RC = TR_0/RC / \phi_{Po} = M_0/V_J/(1 - F_0/F_m)$$
(19)

Състоянието на дадена проба може цялостно да се оцени чрез параметъра *индекс* на производителност (performance index), PI_{ABS}, който се дефинира по следния начин:

$$PI_{ABS} = \frac{RC}{ABS} \cdot \frac{\phi_{Po}}{1 - \phi_{Po}} \cdot \frac{\psi_0}{1 - \psi_0}$$
(20)

Като се заместят биофизичните параметри с експерименталните (получени от OJIP кривите) се получава:

$$PI_{ABS} = \frac{1 - F_o/F_m}{M_0/V_J} \cdot \frac{F_m - F_o}{F_o} \cdot \frac{1 - V_J}{V_J}$$
(21)

Индексът на производителност е произведение от изрази от вида x/(1-x), където x < 1. По аналогия с уравнението на Нернст, логаритъмът от PI_{ABS} има смисъла на потенциал – *движеща сила* на фотосинтезата, DF:

$$DF = \log PI_{ABS}$$
(22)

Параметрите на JIP теста са изчислявани поотделно за всяка ОЈIP крива с помощта на програмата Biolyzer, създадена и любезно предоставена от Роналд Малдонадо-Родригез от Женевския университет.

Статистическа обработка

Концентрационните криви ("доза-отговор") на луминесцентните параметри и някои времеви зависимости са апроксимирани към съответните моделни функции чрез нелинейна регресия по метода на най-малките квадрати. Използван е алгоритъмът на Левенберг-Маркварт, вграден в Origin (Microcal, САЩ). Чрез нелинейна регресия са анализирани и кривите на тъмнинния спад на 3Ф, като е използвана програмата на И. Захариева и П. Чернев. Поради сравнително малкия размер на извадките и установените отклонения от нормалното разпределение, за откриване на достоверни различия сме използвали непараметрични тестове – тест на Ман – Уитни за сравняване на две извадки и вариационен анализ (ANOVA) на Крускал – Уолис. Статистическият анализ е правен с пакета Statistica (StatSoft, САЩ).

За всички задачи са провеждани два или три независими експеримента. Статистическият анализ на данните е правен поотделно за независимите повторения.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

ЛУМИНЕСЦЕНТНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЛИСТА ОТ ГРАХ

Изменение на БФ и ЗФ по време на индукцията

Флуориметърът FL-2006 позволява едновременното регистриране от една и съща проба на ИК на БФ и ЗФ с интервал на отчитане 11 ms. Всяка точка от ИК на ЗФ представлява средна стойност от записания спад в даден тъмнинен период на фосфороскопа 0,5–5,5 ms след прекъсване на светлинния поток. Получените от интактни грахови листа ИК имат характерен ход, показан в полулогаритмичен мащаб на фиг. 10.

Първата секунда от началото на осветяването на пробата условно ще отбелязваме като бърза фаза на индукцията, а последващите изменения – бавна фаза.



Фиг. 10. 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 µmol.m⁻².s⁻¹. ИК са показани в логаритмичен времеви мащаб. С буквите I₁, I₂, D₂, I₄ и I₅ са означени характеристичните позиции в ИК на 3Ф.

Бърза фаза на ИК

Ход на БФ

В бързата фаза на индукцията БФ нараства до своя максимум (фиг. 10, точки), достиган в рамките на 300 ms. Измереният максимален интензитет означаваме с F_p, в съответствие с класическата номенклатура (Lavorel, 1959). Минималното време за достига-

не на F_p при насищащи светлинни интензитети е 200 ms (Schreiber, Neubauer, 1987), докато при слаба светлина то надвишава 1 s. Следователно ИК на БФ, регистрирани с флуориметъра FL-2006, осигуряващ интензитет на възбуждащата (действаща) светлина около 1200 µmol.m⁻².s⁻¹, трябва да се разглеждат като ИК при силна светлина, за които е характерно наличието на две междинни нива (J, I) в бързата фаза (Strasser et al., 1995). Преходът O–J не може да бъде регистриран с FL-2006, тъй като протича в първата милисекунда от индукцията. Предполагаме, че първата измерена точка от ИК се намира между J и I и интензитетът на БФ в нея отговаря приблизително на нивото J. Тогава началната флуоресценция в ИК не може да се приеме като излъчване от отворени РЦ, каквото по дефиниция е нивото F_o, и ще бъде означавана с F₁.

Преходи в 3Ф

В интактни листа ходът на 3Ф в първата секунда от индукцията (фиг. 10, непрекъсната линия) позволява да се различат два максимума, означени като I_1 и I_2 , последвани от минимум, D_2 (Goltsev, Yordanov, 1997). За първия максимум на 3Ф е предположено, че се формира в резултат на два независими процеса – единият водещ до нарастване на 3Ф, а другия – до понижаване (вж. Seaton, Walker, 1990). Показано е, че максимумът I_2 е чувствителен спрямо агенти, влияещи върху редокс състоянието на ФС2 (Goltsev, Yordanov, 1997). Изкуствени електронни акцептори, които окисляват ПХ пула, повишават нивото на максимума, докато инхибитори на ЕТ като диурон го премахват.

Интерпретация на хода на 3Ф може да се направи въз основа на възприетото виждане, че излъчването в микросекунден и милисекунден времеви интервал е резултат от излъчвателна рекомбинация на Q_A^- с вторичния донор Z⁺ (van Gorkom, Donze, 1973). В даден цикъл на фосфороскопа за излъчването ще допринасят тези РЦ, които са преминали в състояние Z⁺P680Q_A⁻ по време на предходния период на осветяване, т.е. са били отворени преди това. Това означава, че в определен момент от индукцията, интензитетът на 3Ф ще бъде пропорционален на броя отворени РЦ. Отчитайки Q_B, това са РЦ в състояние Q_AQ_B, Q_AQ_B⁻ и Q_AQ_B²⁻.

Според математичния модел на Goltsev и Yordanov (1997), максимумите в бързата фаза се определят от динамиката на появяване и изчезване на различни светещи състояния на Φ C2. Симулираните криви посочват възможността максимумът I₁ да се формира главно от светенето на РЦ, които са били отворени по време на тъмнинната адаптация (Q_AQ_B), а в I₂ да се отразява акумулирането на Q_AQ_B⁻ и Q_AQ_B²⁻. От описаното поведение на I₂ след въздействие с електронни акцептори или инхибитори може да се заключи, че

амплитудата на този максимум отразява баланса между скоростта на редуциране на Q_A и тази на реокисляването от Q_B.

След I₂ интензитетът на 3Ф постепенно спада до минимума D₂, който съответства по време на достигането на максимална БФ (F_p). Високата флуоресценция в F_p е резултат от затварянето на РЦ след редуциране на ПХ. Обратно, с акумулирането на такива изцяло редуцирани РЦ ($Q_A^-Q_B^{2-}$) се изчерпват състоянията, способни да произведат излъчване в милисекундната област и 3Ф намалява. Следователно спадът I₂–D₂ отразява запълването на ПХ пула. В потвърждение на това е показано, че поддържането на окислено състояние на ПХ чрез добавяне на електронни акцептори елиминира спада I₂–D₂ в ТМ (Goltsev et al., 1998).

Бавна фаза на ИК

Като цяло промените на луминесценцията в бавната фаза на индукцията са потрудни за интерпретиране, защото се контролират от голям брой взаимосвързани процеси – генериране на трансмембранен протонен и електричен градиент, активиране на електронния транспорт през ФС1 и на АТФ-синтетазния 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, така и нефотохимично гасене, главно енергозависимо. При използването на силна действаща светлина се очаква гасенето на БФ да бъде предимно от нефотохимичен характер (Schreiber et al., 1986). Трябва да се отбележи, че в ИК на БФ, регистрирани с FL-2006, е обичайно стационарното ниво F_s (в случая за F_s се взема стойността на БФ 1 min от началото на осветяване) да бъде по-ниско от началното (F_1), поради изложените особености на измервателната апаратура.

В ИК на 3Ф след D_2 се наблюдава бавно, но силно изразено покачване на интензитета, като максималните стойности се достигат за около 3–5 s. Стимулирането на 3Ф по време на прехода D_2 –I₄ се приема, че отразява генерирането на трансмембранен електрохимичен градиент (Wraight, Crofts, 1971). Въпреки това не е изключено принос да има активирането на междусистемния електронен транспорт (Веселовский, Веселова, 1990; Malkin et al., 1994).

В настоящата работа означаваме с I₄ същия пик, който в предишни публикации (Goltsev, Yordanov, 1997; Goltsev et al., 1998; Христов и съавт., 2001) е отбелязван като I₃. Промяната в номерацията се прави с оглед наблюдаваното в определени условия рамо между I₂ и I₄. Установено е, че това рамо, означено I₃, има различен (засега неизяснен)

произход от максимума I₄ на бавната фаза и се формира предимно от по-бавни компоненти на 3Ф (Zaharieva, Goltsev, 2003).

Основният максимум в бавната фаза е видимо съставен от поне два компонента, I₄ и I₅, които не са разграничени като отделни пикове (фиг. 10). Направено е предположение, че първият компонент е свързан с градиента на протоните, а вторият с вторичен йонен транспорт (Гаевский, Моргун, 1993; Zaharieva et al., 1999). 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. Амплитудата на спада на ЗФ е предложена като критерий за активността на тъмнинната фаза на фотосинтезата (Веселовский, Веселова, 1990). От друга страна, намаляването на ЗФ може, подобно на БФ, да се дължи на нефотохимично гасе (Bilger, Schreiber, 1989).

Връзка между БФ и ЗФ

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 предвиди теоретично.

По-горе беше обсъдено, че при фосфороскопско регистриране на 3Ф, интензитетът на светенето е пропорционален на концентрацията на отворени РЦ, 1–*В*. Тук с *В* бележим концентрацията на затворени РЦ:

$$B = \frac{[Q_{\overline{A}}]}{[Q_{\overline{A}}] + [Q_{A}]}.$$
(23)

Вероятността за рекомбинация на зарядите във формираните по време на цикъла на осветяване състояния $Z^+P680Q_A^-$ се изразява с квантовия добив на излъчвателната рекомбинация, r^* . Той зависи от енергизацията на TM (Wraight, Crofts, 1971) и състоянието на Q_B . За интензитета на 3Φ , L, може да се запише

$$L = \text{const} \cdot \varphi_{\text{Fo}} \cdot r^{*} \cdot (1-B) \cdot I_{a} \cdot \varphi_{\text{Po}}, \qquad (24)$$

където I_a е скоростта на поглъщане на светлина от антената на Φ C2, φ_{Fo} е квантовият добив на флуоресценцията от отворени РЦ, а φ_{Po} е добивът на първичната фотохимична реакция.

С преминаването на електрони през ФС2 се редуцират електронните акцептори, което според оригиналната хипотеза на Duysens и Sweers (1963), води до нарастване на вариабилната флуоресценция. За кратък период от време, какъвто е един цикъл на фос-
фороскопа, относителното нарастване на вариабилната флуоресценция ще бъде пропорционално на електронния поток през ФС2:

$$\Delta F = \text{const} \cdot K \cdot (\varphi_{\text{Fm}} - \varphi_{\text{Fo}}) \cdot (1 - B) \cdot I_a \cdot \varphi_{\text{Po}}, \qquad (25)$$

където *K* е променлива, зависеща от капацитета на акцепторния пул между двете фотосистеми в текущия момент (броя окислени ПХ), ϕ_{Fo} и ϕ_{Fm} са квантовите добиви на БФ, съответно от отворени и затворени РЦ.

ИК на 3Ф, която представлява графика на 3Ф като функция от времето на осветяване – L(t), ще се контролира от сложния времеви ход на $r^*(t)$, B(t) и $I_a(t)$. От друга страна ИК на БФ е интегрална функция от ΔF . Като се сравнят уравнения (24) и (25) може да се допусне, че в периоди, когато K не се променя значително, ходът на 3Ф ще наподобява първата производна от БФ, т.е. $L(t) \sim F'(t)$.

Паралелно регистрираните ИК на БФ и ЗФ (фиг. 10) показват, че в определени периоди от индукцията максимумите на ЗФ съвпадат с максималния наклон на ИК на БФ, т.е. ЗФ има вид, подобен на първата производна на БФ. Така I₂ съвпада с максималната скорост на нарастването О–Р. Може да се предположи, че в този период промените в ЗФ са резултат предимно от редокс състоянието на ФС2.

Луминесцентен потенциал

Относителната вариабилна флуоресценция, $V = (F_t-F_o)/(F_m-F_o)$ във всеки момент е равна на концентрацията на затворените РЦ, V = B, ако се пренебрегне кооперативността на фотосистемите, т.е. възможността възбуждането да се пренесе от затворен РЦ на съседен отворен РЦ (Havaux, Strasser, 1992b). Тогава вариабилната флуоресценция F_v може да се изрази по следния начин:

$$F_{\nu}(t) = F_{t} - F_{o} = V.(F_{m} - F_{o}) = V.I_{a}.(\varphi_{Fm} - \varphi_{Fo}).$$
(26)

Разликата в квантовите добиви на флуоресценцията за двете състояния на РЦ може да се изрази чрез скоростните константи на дезактивационните процеси (вж. уравнения (4)–(6) на стр. 42). Тогава

$$\phi_{\rm Fm} - \phi_{\rm Fo} = \frac{k_{\rm f}}{k_{\rm d} + k_{\rm f}} - \frac{k_{\rm f}}{k_{\rm d} + k_{\rm f} + k_{\rm p}} = \frac{k_{\rm f} (k_{\rm d} + k_{\rm f} + k_{\rm p}) - k_{\rm f} (k_{\rm d} + k_{\rm f})}{(k_{\rm d} + k_{\rm f})(k_{\rm d} + k_{\rm f} + k_{\rm p})}
= \frac{k_{\rm f}}{k_{\rm f} + k_{\rm d}} \cdot \frac{k_{\rm p}}{k_{\rm d} + k_{\rm f} + k_{\rm p}} = \phi_{\rm Fm}.\phi_{\rm Po}$$
(27)

Или, като заместим в (26):

$$F_{v} = B \cdot I_{a} \cdot \varphi_{Po} \cdot \varphi_{Fm}$$
⁽²⁸⁾

Като разделим (24) на (28) се получава

$$L/F_v = \text{const. } r^* . (1-B)/B . \phi_{\text{Fo}}/\phi_{\text{Fm}}$$
 (29)

Последното уравнение показва, че отношението на 3Ф към вариабилната БФ е пропорционално на отношението на концентрацията на отворените към затворените РЦ. От друга страна L/F_v е свързано с квантовия добив на излъчвателната рекомбинация r^* , който в течение на индукцията се променя в зависимост от мембранната енергизация:

$$r^* = r_0^* \cdot e^{\frac{-E_a - F \,\Delta\psi + 2, 3 \cdot R \,T \,\Delta p H}{kT}}$$
(30)

В този израз r_0^* представлява тази част от r^* , която не зависи от мембранния потенциал, E_a е енергията на активация на рекомбинацията, $\Delta \psi$ е мембранният потенциал, R, k и T са, съответно, универсалната газова константа, константата на Болцман и абсолютната температура.

За логаритъма на отношението L/F_v може да се каже, че ще бъде линейно зависим от състоянието на Q_A и от трансмембранния потенциал:

$$\ln(L/F_{\nu}) \sim \ln\frac{1-B}{B} - \frac{E_a - F\,\Delta\psi + R\,T\,\Delta pH}{kT} + \ln\varphi_{Fo} - \ln\varphi_{Fm}$$
(31)

Изразът $\ln \frac{1-B}{B}$ е пропорционален на окислително-редукционния потенциал на двойката Q_A/Q_A^- , E' (според уравнението на Нернст). Вторият член в уравнението изразява допълнителната енергия, необходима за рекомбинация на Q_A^- . Енергията на активация се намалява с големината на трансмембранния електрохимичен градиент $\Delta \mu H^+ = F \Delta \psi - RT \Delta p H$. Като пренебрегнем всички константи достигаме до израза

$$U_L = E' + \Delta \mu H^+ \sim \ln(L/F_\nu) , \qquad (32)$$

или величината U_L , изразяваща сумата от окислително-редукционния потенциал на Q_A и трансмембранния потенциал, е пропорционална на логаритъма от отношението между ЗФ и БФ. Понеже U_L представлява сума от потенциали, 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.

Изчисляването на луминесцентния потенциал предоставя нов подход за анализ на поведението на фотосинтетичния апарат по време на индукционния период. Връзката между двата вида луминесценция и U_L може да се представи във вид на графики Б $\Phi(U_L)$ и З $\Phi(U_L)$. Както Б Φ и З Φ , така и U_L има немонотонен ход във времето, т.е. в едни периоди нараства, а в други намалява. В такъв случай не може да се говори за функционална зависимост на луминесценцията от U_L , а тези графики ще представляват фазов портрет на прехода на изследваната система от тъмнинно в светлинно състояние.



Фиг. 11. Ход на промените на относителната вариабилна флуоресценция, V (A) и 3Ф, нормирана спрямо I₄, L (Б) в зависимост от луминесцентния потенциал U_L = ln L/F_v в контролни листа от грах. Данните са взети от фиг. 10. Плътните символи и буквите до тях отговарят на характеристичните точки в ИК. Стрелките указват посоката на развитие на фазовата траектория във времето. V, L и U_L са представени в относителни единици.

На фиг. 11 е илюстриран ходът на БФ и ЗФ в зависимост от луминесцентния потенциал, изчислен от ИК на контролни листа. БФ е нормирана спрямо максималната вариабилна флуоресценция, за изчислението на която е използвано отношението F_o/F_m, измерено с флуориметър HandyPEA, т.е.

$$V = \frac{F_{t} - F_{p} \cdot F_{o} / F_{m}}{F_{p} - F_{p} \cdot F_{o} / F_{m}}$$
(33)

За изчисляване на U_L вариабилната флуоресценция е получена по същия начин:

$$F_{v} = F_{t} - F_{p} F_{o} / F_{m}$$
(34)

В началото на индукционния период U_L монотонно намалява до максимума на БФ – Р, съответно минимума D₂ на ЗФ. След *Р* 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.

Паралелно с намаляването на луминесцентния потенциал във фазата O–P нараства Б Φ , при това зависимостта на Б Φ от U_L е почти линейна. Този ход напълно съответства на общоприетото виждане, че в бързата фаза на индукцията промените в Б Φ отразяват фотоиндуцираното затваряне на РЦ. Следователно в този участък намалява редокс ком-

понентът на луминесцентния потенциал $E' \sim \ln(1-B)/B$. Линейна зависимост се установява и за 3Ф в отсечката I₂–D₂, също в подкрепа на предположението, че в този период U_L зависи от E'. За разлика от БФ, намаляването на E' подтиска 3Ф, която е пропорционална на количеството отворени РЦ, затова правата I₂–D₂ има наклон, обратен на O–I.

В следващия период на индукцията БФ почти не се изменя с нарастването на U_L (прехода Р–М). Следователно промените на U_L не могат да се дължат отново на E' – в такъв случай БФ би трябвало да се върне по обратния път. Обяснението изпъква на другия фазов портрет – ходът на ЗФ в този участък (D₂–I₄) отлично се описва с експоненциална функция от U_L ($y = 0,0182.e^{0,935x}$; $r^2 > 0,999$), каквато е зависимостта на ЗФ от Δ pH. Това потвърждава, че максимумът в бавната фаза на ИК (I₄) отразява формирането на трансмембранен градиент (Wraight, Crofts, 1971). В този времеви интервал нарастването на U_L е за сметка на Δ pH, докато делът на отворените РЦ не се променя съществено. Друг извод е, че протонният градиент не влияе върху БФ в значителна степен, т.е. наличието на Δ pH само по себе си не е достатъчно, за да се индуцира q_E.

Гасенето на БФ се проявява след точката М, когато луминесцентният потенциал почти не се изменя. Допускаме, че изменението на БФ се дължи в по-голямата си част на фактори, различни от редокс състоянието на Q_A или трансмембранния градиент. Разбира се, възможно е двата компонента на $U_L - E'$ и $\Delta \mu H^+$ да се изменят в противоположна посока така, че тяхната сума да остава постоянна. Сравнението на хода на БФ и ЗФ в този участък показва, че те са идентични. В такъв случай може да се допусне, че гасенето както на БФ, така и на ЗФ, се определя предимно от намаляване на квантовия добив на флуоресценцията (чрез увеличаване на k_d или $k_q[Q]$, вж. уравнение (1) на стр. 39). Това би се отразило еднопосочно на двата вида луминесценция, без да повлияе стойността на U_L . Подобен механизъм е в съгласие с представата за енергетичното гасене, в което участват пигментите от ксантофиловия цикъл (Krause, Weis, 1991; Govindjee, 1995; Kramer, Crofts, 1996).

Кинетика на затихването на 3Ф

Съотношение между бързите и бавните компоненти на затихването по време на индукционния период

Разглежданите досега ИК на 3Ф се регистрират в интегрален режим, при който 3Ф, излъчена във всеки цикъл на фосфороскопа, се отчита като една точка от ИК. Този начин на записване не предоставя информация за компонентния състав на излъчването. Известно е, че по време на индукционния период съотношението между бързите и бавните компоненти се изменя (Itoh, Murata, 1973; Mar et al., 1975). Анализирането на кинетиката на затихването би могло да разкрие допълнителна информация за процесите, протичащи по време на индукционния период и за природата на индукционните максимуми.

Софтуерът за управление на апарата FL-2006, разработен от И. Захариева и П. Чернев, позволява паралелно с ИК да се запишат кривите на затихване на ЗФ. Такива криви, 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. 12. За да се елиминират факторите, които влияят общо върху луминесценцията, а да се илюстрира само изменението във формата на кривите, всяка е нормирана спрямо крайната точка от спада.



Фиг. 12. Криви на тъмнинния спад на 3Ф на контролен грахов лист, регистрирани в един цикъл на фосфороскопа в различни моменти от индукционния период, съответстващи на характеристичните точки на ИК на 3Ф - I₁ (1), I₂ (2), D₂ (3), I₄ (4), I₅ (5) и D₅ (6). Стойностите са нормирани спрямо крайната точка на спада (4,5 ms) за всяка крива съответно.

От лявата графика на фигурата се вижда, че в бързата фаза на индукцията кинетиката на затихване претърпява качествени промени. В затихването на 3Φ приносът на бързите компоненти постепенно намалява в точките I₁, I₂ и D₂. В началото на индукционния период стойността на 3Φ намалява 10 пъти в рамките на 4 ms, а по времето на D₂ спадът е само 2 пъти. Намаляването на бързите компоненти за сметка на бавните, според Маг 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 регистрационния период (1 min) кинетиката на тъмнинния спад остава почти постоянна, въпреки че в този период (D₂– I₄–D₅) са най-големите изменения в интензитета на 3Φ . Известно нарастване на бързата част на кривите се наблюдава в I₅.



Фиг. 13. А - ИК на 3Ф, представена като интегрална стойност (линия) и като отношение между измерената 3Ф 0,5 ms след края на светлинния цикъл към интензитета след 4,5 ms (кръгли символи). Б -Връзка между отношението L_{0,5}/L_{4,5} и БФ в първата секунда от индукционния период.

Приемаме, че затихването на 3Φ в рамките на 5 ms се определя от бързите компоненти на 3Φ , пропорционални на количеството отворени РЦ, а като фон остават секундните компоненти, които се излъчват от затворени РЦ. Тогава може да разглеждаме отношението между 3Φ в началото и в края на кривата на затихване като показател за отвореността на РЦ (приблизителен, защото в края на спада може да има и известно участие на по-дългоживущи компоненти, пропорционални на отворени РЦ). Стойността на 3Φ , измерена 0,5 ms след края на светлинния цикъл на фосфороскопа, отнесена към 3Φ след 4,5 ms, е представена в зависимост от индукционното време на фиг. 13А. За правилността на този подход свидетелства наличието на корелация между това отношение и интензитета на БФ в първата секунда от индукцията (фиг. 13Б), когато нарастването на БФ отразява затварянето на РЦ.

Резултатите, представени на фиг. 12 и фиг. 13, са доказателство, че след първоначалното редуциране на ПХ РЦ на ФС2 остават предимно в затворено състояние в рамките на първата минута от индукционния период. В бавната фаза на индукцията промените на БФ (спадът P–S) и 3Ф (нарастването D_2 –I₄ и спадът I₅–D₅) имат нефотохимична природа. Нарастването на 3Ф може да се обясни с натрупването на трансмембранен протонен градиент, ако се допусне, че той стимулира пропорционално бързите и бавните компоненти на релаксационната кинетика и съответно не влияе върху формата на кривите на затихване. В спада след максимума на 3Ф би могло да има влияние разсейването на електричния градиент чрез вторичния йонен поток (Моргун, Должиков, 1990; Гаевский, Моргун, 1993). Освен това БФ и 3Ф може да спадат в резултат на нефотохимично гасене (напр. намаляване на ϕ_f от зеаксантин), което също не би повлияло на съотношението между кинетичните компоненти на 3Ф.

Все пак известно реокисляване на РЦ се отчита във време 6–8 s, което съответства на максимума I₅. Това е възможно обяснение за наличието на двуфазност в максимума в бавната фаза на ИК на 3Ф.

Разделяне на кинетичните компоненти на затихването

Релаксационната кинетика на 3Ф в милисекунден интервал се описва аналитично с двуекспоненциална функция (Zaharieva, Goltsev, 2003):

$$L = L_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + L_2 \cdot e^{-t/\tau_2} + L_3, \qquad (35)$$

където L_1 и L_2 са амплитудите на експоненциалните компоненти, а τ_1 и τ_2 са характеристичните времена. Константата L_3 отразява компонентите на 3Ф с характеристично време > 10 ms. В нея участва светенето, което е възбудено в предходни периоди на фосфороскопа, но не е успяло да затихне, т.е. рекомбинационно светене от затворени РЦ.

Експерименталните криви на затихване са апроксимирани към функцията (35) по метода на най-малките квадрати, така че за всяка крива се изчисляват амплитудите L_1 , L_2 и L_3 и времената τ_1 и τ_2 . Първият компонент има характеристично време $\tau_1 < 1$ ms (субмилисекунден), а вторият компонент е в границите $\tau_2 = 1,5\div3,5$ ms (милисекунден). Времената на компонентите съответстват на получените по-рано от други автори (Гаевский, Моргун, 1993). Експоненциалните членове могат да се свържат с определени състояния на ФС2, които генерират излъчването. Субмилисекундният компонент веро-

ятно съответства на състоянието $Q_A Q_B^-$, а милисекундният – на $Q_A Q_B^{2-}$ (Zaharieva et al., 2001; Zaharieva, Goltsev, 2003). Амплитудите на тези компоненти – L_1 и L_2 , в даден момент ще бъдат пропорционални на концентрацията на тези състояния. В светлинния цикъл, предхождащ регистрацията, РЦ могат да приемат още един електрон и да се получат състоянията Z⁺P680Q_A⁻Q_B⁻ и Z⁺P680Q_A⁻Q_B²⁻, способни да генерират, съответно, субмилисекундния и милисекундния компонент. Характеристичните времена на компонентите ще зависят от скоростите на изчезване на съответните състояния.



Фиг. 14. Ход на регресионните параметри на кривите на затихване на 3Ф, регистрирани в контролен грахов лист по време на индукционния период и апроксимирани към двуекспоненциален спад (вж. уравнение 35 в текста). А - амплитуди: L₁ (O), L₂ (•) и L₃ (△); Б - характеристични времена: τ₁ (O) и τ₂ (•).

Регресионните параметри – амплитуди и характеристични времена, получени от контролен лист при стайна температура, по време на индукционния период описват хода, показан на фиг. 14. Амплитудите L_1 и L_2 показват два максимума в индукционния период, съответстващи на максимумите в бързата и бавната фаза на ИК на 3Ф. Стръмният спад на L_1 и L_2 до техните минимални стойности, които се достигат във време около 0,6 s, вероятно се дължи на намаляването на концентрацията на съответните "светещи" състояния паралелно с редуцирането на ПХ и преминаването на РЦ в напълно редуцирано състояние $Q_A Q_B^{2-}$.

Стойностите на амплитудите зависят не само от концентрацията на състоянията, способни да рекомбинират, но и от скоростта на излъчвателната рекомбинация, която от своя страна зависи от трансмембранния електрохимичен потенциал (Evans, Crofts, 1973; de Grooth, van Gorkom, 1981). Повишаването на амплитудите по време на индукционния период може да е резултат от натрупването на трансмембранен потенциал. Вероятно на това се дължи вторият максимум на L_1 и L_2 . Константата L_3 , която сумира бавните компоненти на затихването има принос само в този максимум, т.е. в бавната фаза на ИК.

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 пластохиноновия пул. В началото на индукцията, когато ПХ е окислен, $Q_B^{2^-}$ може да се реокисли чрез обратен пренос към Q_A или като дисоциира от Φ C2 и се замени с окислена молекула. Ако се приеме, че милисекундният компонент се излъчва от състояния с $Q_B^{2^-}$, то неговото време на живот ще се увеличи след редуциране на ПХ, тъй като реокисляването на $Q_B^{2^-}$ към ПХ става невъзможно. Изразено чрез скоростните константи на реакциите, характеристичното време на милисекундния компонент при окислен ПХ е $\tau_2 = 1/(k_{pq} + k_{-ab})$, ако k_{pq} е скоростната константа на реокисляване от пула, а k_{-ab} е константата на обратен пренос към Q_A . Ако пулът е изцяло редуциран, то $\tau_2 = 1/k_{-ab}$. В началото на индукционния период τ_2 има стойност 1,8 ms, която след редуциране на ПХ нараства до 3,5 ms. Тогава за скоростните константи k_{-ab} и k_{pq} могат да се изчислят стойностите, съответно 285 s⁻¹ и 270 s⁻¹.

По време на максимума в бавната фаза на ИК на 3Ф характеристичното време на милисекундния компонент (τ_2) не се променя значително, което е индикатор, че скоростната константа на пренос на електрона от $Q_B^{2^-}$ към $Q_A(k_{-ab})$ не зависи от трансмембранния потенциал.

Определяне приноса на отделните компоненти в интегралната ИК

В интегрален режим на регистрация на ИК, всяка точка от получената крива е пропорционална на площта под кривата на затихване на 3Φ (светлосумата) в съответния тъмнинен период на регистрация на фосфороскопа. Кривата на затихване се описва с уравнение (35), а площта може да се изчисли теоретично чрез интегриране от началния момент на регистрация t_0 до крайния t_m :

$$L_{\text{int}} = \int_{t_0}^{t_m} Ldt = L_1 \int_{t_0}^{t_m} e^{-\frac{t}{\tau_1}} dt + L_2 \int_{t_0}^{t_m} e^{-\frac{t}{\tau_2}} dt + L_3 \int_{t_0}^{t_m} dt$$
(36)

$$L_{\rm int} = L_1 \tau_1 \left(e^{-\frac{t_0}{\tau_1}} - e^{-\frac{t_m}{\tau_1}} \right) + L_2 \tau_2 \left(e^{-\frac{t_0}{\tau_2}} - e^{-\frac{t_m}{\tau_2}} \right) + L_3 \left(t_m - t_0 \right)$$
(37)

Трите члена могат да се изчислят поотделно, като се използват параметрите на регресионния анализ на кривите на затихване L_1, L_2, L_3, τ_1 и τ_2 . Техните стойности (фиг. 15, криви 1, 2 и 3) ще отразяват приносите на съответните кинетични компоненти в интегралната ИК. Симулираната ИК, получена като сума от трите компонента, действително наподобява експериментално регистрираните в интегрален режим ИК на ЗФ (с изключение на началния период I₁–I₂).



Фиг. 15. Интегрални стойности на субмилисекундните (1), милисекундните (2) и бавните (3) кинетични компоненти на 3Ф и тяхната сума, изчислени от регресионните параметри на кривите на затихване на 3Ф, регистрирани по време на индукционния период.

От фигурата се вижда, че в максимума в бързата фаза на индукцията участват главно бързите компоненти на затихването, докато бавният максимум се формира практически изцяло за сметка на бавните компоненти, т.е. светенето от затворени РЦ. В този период бавните компоненти нарастват поради две причини – затваряне на РЦ и генериране на трансмембранен протонен градиент.

Минимумът D_2 в интегралната ИК се появява по-рано, отколкото съответните минимуми на бързите компоненти, защото по това време започва нарастването на L_3 . Следователно D_2 не съответства точно на момента на максимално затваряне на РЦ. Това обяснява защо D_2 изпреварва максимума на БФ (Р).

ЕФЕКТИ НА ХЕРБИЦИДИТЕ ВЪРХУ БФ И ЗФ

За разработването на методика за количествена оценка на хербицидния ефект чрез измерване на луминесцентни параметри, ние третирахме грахови листа с разтвори на атразин, диурон и диносеб с различни концентрации в интервала $0-10^{-4}$ М. Сравнението на регистрираните ИК на БФ и 3Ф в присъствие на хербицид с контролните разкрива значителни изменения в БФ и 3Ф. Анализирането на ИК на листа, третирани с нарастващи концентрации от даден хербицид дава възможност да се разграничат тези специфични ефекти върху ИК, чиято величина зависи от концентрацията. Така може емпирично да се подберат параметри, за които е установена корелация с хербицидната концентрация. Тези параметри ще могат впоследствие да се прилагат за количествена оценка на хербицидното действие. Трябва да се отбележи, че тук и в останалата част от текста използваме фразите хербицидно действие, хербициден ефект и хербицидна активност в смисъл, ограничен до първичното действие на използваните агенти – инхибиране на ЕТ на Φ С2, без да имаме предвид физиологичната токсичност на веществата.

При третирането на интактни листа или цели растения от критично значение за реализирането на хербицидния ефект е начинът на приложение на хербицида. Нашата цел беше да разработим методика, позволяваща регистрацията на изменения в хербицидната чувствителност в резултат от действието на допълнителен стресов фактор, напр. температура. Това поставя изискването, от една страна, за точно и възпроизводимо дозиране на хербицидите в концентрации, които не блокират всички РЦ, т.е. не са в излишък, а от друга страна, за количествено регистриране на хербицидния ефект при тези концентрации.

Бяха използвани три метода за приложение на хербицидите, условно наречени листна дифузия, вакуумна инфилтрация и стъблен транспорт, за да се намери найподходящата процедура, която да позволява едновременно постигането на достатъчен инхибиторен ефект и възпроизводими резултати. За всеки от методите варирахме различни фактори в търсене на най-добрите условия за третиране.

В този раздел ще опишем ефектите на диурон, атразин и диносеб, приложени чрез трите метода върху ИК на БФ и ЗФ. Ще бъдат представени параметри на ИК, които могат количествено да характеризират хербицидния ефект и ще бъде направено сравнение на ефективността на трите метода. Накрая ще бъдат обсъдени някои от факторите, за които установихме, че имат съществено влияние върху резултатите от третирането.

Влияние на хербицидите върху ИК на БФ и ЗФ

Влиянието на хербицидите атразин, диурон и диносеб, приложени чрез трите метода за третиране на листа, върху ИК на БФ и ЗФ е представено на фиг. 16-фиг. 24. За подобра прегледност са включени само някои концентрации от изследвания диапазон. Както се вижда, третирането с хербициди води до промени както в общия интензитет на светенето, така и във формата на кривите. Някои от фазите на ИК се оказват почувствителни, а други по-стабилни към хербицидното действие.

Влияние на хербицидите върху ИК на БФ

Най-характерният признак за действието на хербицидите в ИК на БФ е повишаване на относителния интензитет на началната флуоресценция, F_1 , в сравнение с максималния интензитет, F_p . Когато електронният пренос след Q_A е прекъснат, за затваряне на РЦ е достатъчно поглъщането на един квант светлина. 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 F_1 е почти равно на максималното F_p и регистрираната ИК представлява приблизително права хоризонтална линия (вж. 10^{-5} и 10^{-4} М на фиг. 22). При по-ниски концентрации степента на нарастването на F_1 ще се определя от относителния дял на блокираните РЦ.

Абсолютната стойност на F_1 не може да се ползва като мярка за степента на инхибиране, тъй като не следва монотонно приложените концентрации. Това е така, защото хербицидите едновременно влияят върху общия интензитет на БФ. Ако за интерпретация на промените в БФ се изхожда само от редокс състоянието на РЦ, то в насищащи концентрации интензитетът на БФ, $F_1 = F_p$, трябва да бъде равен на максималния интензитет на контролните листа (ако светлината е достатъчно силна за пълно затваряне на ПХ) или по-голям. Във всички случаи, когато е постигнато пълно инхибиране, интензитетът на БФ е по-нисък от контролния. Обикновено с увеличаване на концентрация намалява под контролната. Нарастването на F_p може да се обясни с това, че при използвания светлинен интензитет в контролните листа не се затварят всички РЦ, и с добавянето на инхибитор техният дял се увеличава. Спадът на БФ, особено при насищащи хербицидни концентрации, може да бъде единствено в резултат на нефотохимично гасене.



Фиг. 16. Индукционни криви на БФ (А) и ЗФ (Б) от листа от грах, третирани с различни концентрации атразин чрез листна дифузия. Концентрациите в М са означени срещу съответните криви.



Фиг. 17. Индукционни криви на БФ (А) и ЗФ (Б) от листа от грах, третирани с различни концентрации диурон чрез листна дифузия. Концентрациите в М са означени срещу съответните криви.



Фиг. 18. Индукционни криви на БФ (А) и ЗФ (Б) от листа от грах, третирани с различни концентрации диносеб чрез листна дифузия. Концентрациите в М са означени срещу съответните криви.



Фиг. 19. Индукционни криви на БФ (А) и ЗФ (Б) от листа от грах, третирани с различни концентрации атразин чрез инфилтрация. Концентрациите в М са означени срещу съответните криви.



Фиг. 20. Индукционни криви на БФ (А) и ЗФ (Б) от листа от грах, третирани с различни концентрации диурон чрез инфилтрация. Концентрациите в М са означени срещу съответните криви.



Фиг. 21. Индукционни криви на БФ (А) и ЗФ (Б) от листа от грах, третирани с различни концентрации диносеб чрез инфилтрация. Концентрациите в M са означени срещу съответните криви.



Фиг. 22. 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.



Фиг. 23. Индукционни криви на БФ (А) и ЗФ (Б) от листа от грах, третирани с различни концентрации диурон чрез стъблен транспорт. Концентрациите в М са означени срещу съответните криви.



Фиг. 24. Индукционни криви на БФ (А) и ЗФ (Б) от листа от грах, третирани с различни концентрации диносеб чрез стъблен транспорт. Концентрациите в М са означени срещу съответните криви.

Гасенето на флуоресценцията в присъствие на хербицид е дискутирано и от други автори (Lazár, Pospíšil, 1999; van Rensen et al., 2001). Както беше споменато в литературния преглед, окисленият пластохинон може да бъде причина за 15–20% намаление на максималната флуоресценция (Vernotte et al., 1979). От друга страна, според хипотезата на Vredenberg и съавт. (van Rensen et al., 2001; Vredenberg, Bulychev, 2002), в контролните проби максималната флуоресценция е по-висока вследствие на трансмембранно електрично поле, генерирано вероятно от Φ C1.

Без да отхвърляме възможността част от гасенето да се дължи на споменатите явления, ние смятаме, че те не могат да обяснят изцяло наблюдаваното намаляване на интензитета. Основен аргумент е това, че интензитетът продължава да намалява с увеличаване концентрацията на инхибитора дори над концентрации, при които ЕТ е изцяло блокиран (това е добре изявено и в ОЛР кривите, описани по-долу). Това означава, че самото прекъсване на ЕТ не отговаря изцяло за гасенето на БФ. Друга възможност е хербицидите да влияят върху донорната страна на ФС2, така че да се увеличи времето на живот на P680⁺, който е ефективен гасител (вж. Shinkarev, Govindjee, 1993). Както е известно, за диурона има участък на донорната страна на ФС2, но свързването се проявява при по-високи концентрации (Pfister, Schreiber, 1984), в сравнение с тези, за които се наблюдава гасене. Освен това флуоресценцията намалява след третиране и с останалите два инхибитора, докато за тях действие на донорната страна не е доказано. За обяснение на наблюдаваните явления допускаме, че използваните хербициди имат способността за статично гасене на флуоресценцията (гасене на възбудени състояния на хл.). Най-ефективен гасител на флуоресценцията се оказва хербицидът диносеб, докато при диурона и атразина това действие е относително по-слабо проявено.

В рамките на измерването на ИК стойността на БФ в контролните листа постепенно намалява след F_p като флуоресценцията след 60 s, F_s , може да бъде по-ниска от началната (F_1). При третираните с хербициди проби с увеличаване на концентрацията този спад се проявява по-слабо, но времето в което ИК се отклонява надолу остава постоянно – около 10 s от началото на осветяване, независимо от присъствието на хербицид. Времето за активиране на процесите на гасене не зависи от ЕТ през ФС2, респективно от редокс състоянието на акцепторите между двете фотосистеми.

Както може да се очаква, над определени концентрации гасенето изчезва напълно. От една страна, действието на хербицидите изключва възможността за реокисляване на Q_A чрез изтегляне на електрони от ФС1 – фотохимично гасене. Наред с това при липсата на линеен ЕТ не може да се генерира протонният градиент, необходим за активиране

на ксантофиловия цикъл, съответно енергозависимо гасене. Отсъстват и условия за гасене, свързано с преход в състояние 2, тъй като ПХ пулът остава окислен.

Интересен ефект в ИК на БФ се наблюдава при междинни хербицидни концентрации, напр. 10^{-5} М на фиг. 16, фиг. 17 и фиг. 19, 3.10^{-5} М на фиг. 20 или 3.10^{-6} М на фиг. 23. Още в първата измерена точка, F₁, флуоресценцията е силно повишена спрямо контролата, но не до максималното ниво. По време на индукционния период БФ постепенно нараства (почти линейно в полулогаритмичен мащаб) до F_p. В сравнение с контролата времето на максимума е много по-голямо. При третираните листа БФ продължава бавно да нараства до включване на процесите на гасене.

Това явление би могло да се обясни, ако се приеме, че равновесието между свободните и инхибираните участъци се измества в тъмнинно и в светлинно състояние на фотосинтетичния апарат, така че по време на осветяване се наблюдава инхибирането на тази част от РЦ, които са били свободни на тъмно. От друга страна, бавното покачване на флуоресценцията би могло да отразява затварянето на инхибирани РЦ от субпопулация на Φ C2 с по-малка антена (Melis, Duysens, 1979). В такъв случай покачването ще се наблюдава и при насищащи концентрации. Действително, в повечето експерименти, независимо от използвания хербицид или метод на третиране, дори и при най-високите концентрации се открива тенденция към повишаване на Б Φ с времето (вж. 5.10⁻⁵ М на фиг. 18 и 10⁻⁴ М на фиг. 22). В такива концентрации не се наблюдава никакво гасене и съответно не се достига максимум на Б Φ в периода на измерването.

Влияние на хербицидите върху ИК на 3Ф

Действието на хербицидите атразин, диурон и диносеб се изразява в намаляване интензитета на 3Ф в целия индукционен период. За разлика от БФ, 3Ф намалява монотонно с увеличаване на хербицидната концентрация, така че ефектът на инхибиторите може да се оцени по абсолютната стойност на 3Ф. Наред с общото понижаване на 3Ф се установяват характерни изменения във формата на ИК, най-вече в съотношението между амплитудата на отделните фази (максимуми).

Бързата фаза на ИК ($I_1-I_2-D_2$) като цяло 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). Такова поведение ясно се демонстрира и в настоящата работа. Напр. от фиг. 22, представяща ИК за атразин, приложен чрез стъблен транспорт, се вижда, че концентра-

ция от 10^{-6} М предизвиква слабо понижаване на 3Φ в I₁, както и в останалата част от ИК, докато I₂ е изгубен напълно.

Беше отбелязано, че поведението на максимумите на 3Ф в бързата фаза на ИК се отдава на динамиката на появяване и изчезване на различни редокс състояния на ФС2. Някои от тях могат да произведат излъчвателна рекомбинация – "светещи" състояния, а други не. 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 I₂, и този пик намалява. В неизвестни проби отношението I₂/I₁ би могло да се използва като критерий за оценка ефективността на електронния пренос между Q_A и Q_B . От по-малката стойност на отношението може да се съди за нарушено реокисляване на Q_A^- или за ускорено подаване на електрони към Q_A . Паралелно с I₂ намалява дълбочината на спада I₂–D₂, който в контролните листа отразява редуцирането на ПХ.

Амплитудата на 3Ф 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 приложения агент. Минималната концентрация в която се регистрира спад на 3Ф зависи от типа хербицид и метода на третиране. Много често третирането с по-ниски концентрации има обратно действие, т.е. стимулира интензитета на 3Ф (Doltchinkova et al., 1997).

Отношението на максималния интензитет на 3Φ в бавната фаза (I₄) към този в бързата фаза (I₁ или I₂) 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 трансмембранния електрохимичен градиент, като се има предвид, че интензитетът на излъчената 3Φ зависи експоненциално от величината на трансмембранния потенциал (Wraight, Crofts, 1971).

В контролните листа максимумът на бавната фаза включва два компонента – I₄ и I₅ (за означенията на ИК вж. фиг. 10). Прави впечатление, че двата компонента проявяват различна чувствителност спрямо действието на инхибиторите. С нарастване концентрацията на атразин (фиг. 16, фиг. 19, фиг. 22) или диурон (фиг. 17, фиг. 20, фиг. 23) вторият компонент (I₅) намалява значително по-бързо отколкото първия (I₄). Над определена концентрация (3.10^{-6} М на фиг. 22) ЗФ в бавната фаза на ИК нараства изключително за сметка на I₄. Този пик не изчезва напълно дори при най-високите концентрации, т.е. в напълно инхибирани проби се регистрира определено ниво на максимума, независещо от хербицидната концентрация. Допускаме, че при тези условия ЗФ в I₄ се стимулира от

протонен градиент, генериран от Φ C1. Най-вероятно това става чрез цикличен ET, но е възможно участието на ендогенни електронни донори за Φ C1, като дехидроаскорбат. Интересно е, че минималното ниво на I₄ е по-високо в листа, третирани с атразин, в сравнение с третираните с диурон.

За разлика от останалите два хербицида, фенолният инхибитор диносеб подтиска максимума I_5 в еднаква или в по-голяма степен (фиг. 18) в сравнение с I_4 . При високи концентрации диносебът премахва изцяло бавната фаза и в ИК се наблюдава единствено максимумът I_1 . Тази специфичност вероятно се дължи на разпрягащото действие на фенолните хербициди (Morrod, 1976). Увредените ТМ ще пропускат напомпаните от Φ C1 протони и така факторът, според нас отговорен за появата на I_4 в третираните с диурон или атразин листа, ще липсва при въздействие с диносеб.

Различия в ИК в зависимост от използвания хербицид и начина на приложение

И трите хербицида – атразин, диурон и диносеб – имат сходно влияние върху ИК на БФ и ЗФ и при трите начина на третиране, което е потвърждение, че наблюдаваните ефекти са резултат от инхибирането на ЕТ между Q_A и Q_B. Различията между трите съединения са предимно количествени – сходни ИК се постигат от различни концентрации в зависимост от хербицида. Наред с това се забелязват и някои специфични ефекти, като свойството на диносеб да инхибира напълно както I₅, така и I₄.

Различия в действието на диносеб в сравнение с останалите два хербицида може да се очакват по две причини – първата е, че диносеб е "хистидинов" тип хербицид, т.е. в свързването с хербицидния участък се ангажират различни лиганди (Trebst, 1987). Изменения в конформацията на участъка ще повлияят различно афинитета към хербициди от двете семейства. Втората особеност, която вероятно предопределя разликите в ИК е, че диносеб може да променя свойствата на ТМ като разпрягащ агент. Именно на това предполагаме, че се дължи и слабото инхибиране, когато растенията са третирани през стъблото. Известно е, че фенолните хербициди се транспортират слабо от проводящите тъкани, тъй като тяхното контактно действие ги разрушава (Bandal, Casida, 1972; Ashton, Crafts, 1981).

Ако се сравнят ИК от контролни листа за трите метода на третиране, се вижда, че инфилтрацията сама по себе си води до определени изменения във формата на кривите и за двата вида луминесценция. Забелязва се, че в ИК на БФ максимумът се достига едва в края на "платото" в периода 0,2–10 s. В същото време отношението между интен-

зитета на 3Φ в бързата и бавната фаза на ИК е изместено в полза на бързата фаза. Спадът I₂–D₂ е по-слабо изразен. Известна прилика се открива във формата на ИК на инфилтрираните контролни листа и листата третирани с междинни концентрации диносеб чрез дифузия. Възможно е тези изменения да се дължат на частично нарушаване интегритета на ТМ – механично при инфилтрацията или химично от диносеб. В резултат би се намалил трансмембранният протонен градиент, което да е причината за по-слабото покачване на 3Φ в бавната фаза.

Ход на луминесцентния потенциал в третирани с хербициди листа

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.

Стойностите на луминесцентния потенциал са изчислени по вече описания начин (стр. 74) за листа, третирани с хербициди. Фазовите диаграми $V(U_L)$ и $L(U_L)$ за две концентрации атразин – 1 μ M и 10 μ M – са представени на фиг. 25 и фиг. 26. Концентрация 1 μ M е близо до полуинхибиращата концентрация за атразин, т.е. при нея голяма част от РЦ са блокирани, но въпреки това силната действаща светлина може да активира интензивен ЕТ, съответно протонен градиент и т.н. При 10 μ M атразин ИК на БФ и 3Ф сочат за практически пълно блокиране на ЕТ (вж. фиг. 22).

Фазовите траектории на фиг. 25 запазват някои характеристики, които се откриват в нетретираните листа, но се наблюдават и съществени промени. Началната стойност на U_L е по-ниска – 2,7 единици в сравнение с 4,2 при контролата. В бързата фаза на индукцията (до минимума D на 3Ф) U_L незначително се променя (до 2,5), а след това монотонно нараства до I₄ както и при контролата. По същество първата линейна отсечка на зависимостта $V(U_L)$, която е ясно изразена в контролните листа (О–Р) и се отдава на фотоиндуцираното затваряне на РЦ, се губи при третиране с атразин. Този ефект може да се очаква, тъй като блокираните РЦ се затварят преди първото отчитане и началната стойност на U_L вече е по-ниска за сметка на E'.



Фиг. 25. Ход на промените на относителната вариабилна флуоресценция, V (A) и 3Ф, нормирана спрямо I₄ (Б) в зависимост от луминесцентния потенциал U_L = ln L/F_v в листа, третирани чрез стъблен транспорт с 10⁻⁶ M атразин. Плътните символи и буквите до тях отговарят на характеристичните точки в ИК. Стрелките указват посоката на развитие на фазовата траектория във времето. V, L и U_L са представени в относителни единици.



Фиг. 26. Ход на промените на относителната вариабилна флуоресценция, V (A) и 3Ф, нормирана спрямо I_4 (Б) в зависимост от луминесцентния потенциал $U_L = \ln L/F_v$ в листа, третирани чрез стъблен транспорт с 10^{-5} М атразин. Плътните символи и буквите до тях отговарят на характеристичните точки в ИК. Стрелките указват посоката на развитие на фазовата траектория във времето. V, L и U_L са представени в относителни единици.

Нарастването на U_L между точките D и I₄ на ИК на 3Ф е свързано по същия начин с измененията на БФ и 3Ф, както в контролните листа – БФ е слабо повлияна, а 3Ф зависи експоненциално от U_L . Тези взаимодействия подкрепят хипотезата, че в този период луминесценцията се контролира от генерирането на трансмембранен протонен градиент. В третираните листа обаче се вижда още, че и по време на спадането на I₄ 3Ф следва строго експоненциалната зависимост от U_L , докато в контролата този ефект се заличава поради присъствието на I₅. Следователно спадането на компонента I₄ на бавния максимум на 3Ф отразява релаксацията на протонния градиент. Интерес представлява ходът на 3Ф в първите моменти след осветяването – фазата I₁–D. В този участък кривата $V(U_L)$ има приблизително същия наклон както и във фазата D–I₄, но в обратна посока. Възможно е в този период 3Ф да отразява релаксацията на електричния потенциал, генериран при разделянето на зарядите в РЦ (Bulychev, Vredenberg, 1999). Връзката на първия пик на 3Ф с електричния потенциал се подсказва и от това, че той се проявява дори при пълно инактивиране на ЕТ, но се инхибира силно, ако $\Delta \psi$ е елиминиран с валиномицин (Satoh, Katoh, 1983).

В растенията, третирани с 10^{-5} М атразин, ЕТ е блокиран практически изцяло и РЦ се затварят още в първия цикъл на фосфороскопа. Отношението (1–В)/В остава постоянно по време на измерването, следователно приемаме, че промените на луминесцентния потенциал са обусловени от промени в трансмембранния потенциал. Тогава фазовите диаграми трябва да представляват графики на зависимостта $V = f (\Delta \mu H^+)$ и $L = f (\Delta \mu H^+)$. Фиг. 26 ясно показва, че, независимо в каква посока се изменя U_L , ходът на БФ и 3Ф 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 трансмембранния електричен или протонен градиент. Както беше показано, максимумите, които не изчезват дори и при пълно подтискане на ЕТ, са I₁ и I₄. Предполагаме, че първият е свързан с електричния потенциал, генериран от ФС1.

ОЈІР криви

Флуориметърът HandyPEA регистрира само БФ, но има предимството, че използва светодиоди като източник на светлина, които се включват и изключват практически мигновено. Това позволява да се запишат всички фази на ИК при силна светлина (O–J–I–P). Първата стабилна стойност, отчетена 20 µs от началото на индукционния период, е близка до истинското ниво F_o.

Напоследък се появиха няколко публикации, докладващи за използването на този тип флуоресцентен анализ за оценка ефекта на фотосинтетични хербициди или продукти от тяхната деградация в интактни листа от висши растения (Vani et al., 2001; Dewez et al., 2002; Klem et al., 2002). Установена е стабилна зависимост на нарастването на J (Klem et al., 2002) или вариабилната флуоресценция (Dewez et al., 2002) от концентрацията. Обект на експериментите са водни растения (*Lemna*), чиято анатомия позволява значително по-лесно навлизане на водоразтворими съединения, в сравнение със сухоземните, и това ги прави удобни за третиране.

На фиг. 27-фиг. 29 са представени ОЛР криви, регистрирани в листа от грах, третирани чрез стъблен транспорт с различни концентрации атразин (фиг. 27), диурон (фиг. 28) или диносеб (фиг. 29). И тук времето е в логаритмичен мащаб с цел да се визуализират всички фази. Действието на хербицидите се изразява главно в покачване на флуоресценцията в нивото J (регистрирано 2 ms след началото на осветяването). Пълното инхибиране на РЦ модифицира ИК така, че максималната флуоресценция се достига още в J, както е показано от Strasser и съавт. (Strasser et al., 1995; Guisse et al., 1995). Това е доказателство, че J отразява редукцията на Q_A .

При по-ниски концентрации на хербицидите нивото на БФ в J вероятно отразява броя РЦ, към които е свързана хербицидна молекула. Количеството инхибирани центрове трябва да се разглежда като осреднена във времето концентрация, тъй като съществува динамично равновесие, обусловено от непрестанното свързване с хербицидния участък и дисоциация. Стойността на V_J – относителната вариабилна флуоресценция в J – монотонно нараства с концентрацията и се насища когато J = P или V_J = 1. Този параметър би могъл да служи за оценка на хербицидната активност. В предложения от Klem и съавт. (2002) биотест, ефективността на карбамидния хербицид изопротурон се оценява чрез параметъра V_J. За удобство може да се използва и величината $\psi_0 = 1-V_J$ изведена от Strasser и съавт. (2000) като вероятността (ефективността) за трансфер между Q_A и Q_B (вж. литературния преглед).

В третираните с хербициди листа нивото на началната флуоресценция F_0 нараства. Повишението е слабо, но статистически достоверно, и се открива при всички хербициди и начини на третиране. F_0 би могло да се повиши, ако една част от РЦ са били затворени на тъмно. По принцип обаче това не би трябвало да се очаква след дълга тъмнинна адаптация, защото и в инхибираните РЦ Q_A може да се реокислява чрез рекомбинация с S-състоянията на KOC, която има време на живот 2–3 s (Vasil'ev, Venediktov, 1993). Не е изключено хербицидите да предизвикват промени в антенните комплекси или връзката между антената и РЦ, които да изменят кинетиката на енергетичния пренос и по този начин да намаляват квантовия добив на флуоресценцията от отворени РЦ. Такива изменения биха се отразили върху тъмнинния спад на БФ, но за съжаление не сме срещали подобни публикации.



Фиг. 27. ОЈІР криви, регистрирани с флуориметър HandyPEA от листа, третирани чрез стъблен транспорт с различни концентрации атразин. Концентрациите в M са дадени на графиката срещу съответните криви (означени със стрелки). Б. Криви на относителната вариабилна флуоресценция V = (F – F_o)/(F_m – F_t).



Фиг. 28. ОЈІР криви, регистрирани с флуориметър HandyPEA от листа, третирани чрез стъблен транспорт с различни концентрации диурон. Концентрациите в М са дадени на графиката срещу съответните криви (означени със стрелки). Б. Криви на относителната вариабилна флуоресценция V = (F – F_o)/(F_m – F_t).



Фиг. 29. ОЈІР криви, регистрирани с флуориметър HandyPEA от листа, третирани чрез стъблен транспорт с различни концентрации диносеб. Концентрациите в М са дадени на графиката срещу съответните криви (означени със стрелки). Б. Криви на относителната вариабилна флуоресценция V = (F – F_o)/(F_m – F_t).

Както при ИК на БФ, регистрирани с FL-2006, така и при ОЛР кривите имаше изразено намаляване на БФ при високи хербицидни концентрации. Например, на фиг. 27 личи, че при 3.10^{-6} М концентрация на атразин ЕТ е напълно инхибиран (F_J = F_m) и максималната флуоресценция достига до нивото I на контролата, както е получено от други автори (Lazár, Pospíšil, 1999). При концентрация 3.10^{-5} М кривата напълно запазва формата си (на графиката на относителната вариабилна флуоресценция двете концентрации изглеждат като една крива), но максималната флуоресценция е намалена, статистически достоверно, с 20%. Това поведение потвърждава направените по-горе предположения (вж. стр. 88) относно възможността за гасене на възбудените състояния от хербицидните молекули.

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. ИК на БФ и ЗФ са комплексни криви, съставени от много фази и могат да се характеризират с голям брой параметри, чисто емпирични или такива с ясен биофизичен смисъл. За всяка ИК програмата Indwin изчислява и записва около 30 параметъра, а Biolyzer – над 50. 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 отговарят на следните изисквания:

- да могат точно да се изчисляват от ИК, с минимален субективен фактор;
- да имат стабилни стойности в нормални нетретирани с хербициди листа;
- да бъдат максимално чувствителни спрямо действието на хербицидите;
- ефектът на хербицидите да има едностранно влияние върху тях.

Предвид поставените условия, за количествено охарактеризиране на хербицидния ефект използваме следните параметри: за ИК, регистрирани с FL-2006 – височината на максимумите на 3Ф I₁ и I₄; отношението на вариабилната към максималната БФ $F_v/F_p = (F_p-F_1)/F_p$; за ОЛР кривите, регистрирани с HandyPEA – параметъра $\psi_0 = 1-V_J = (F_m-F_J)/(F_p-F_o)$. Зависимостта на тези параметри от логаритъма на хербицидната концентрация е сигмоидална (фиг. 30, фиг. 31) и може добре да се изрази с болцманова функция:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x - x_0)/dx}} + A_2,$$
(38)

където x е логаритъм от концентрацията, y е нормираната спрямо контролата стойност на съответния параметър, A_1 и A_2 са съответно горната и долната асимптота, x_0 е централната точка на сигмоидата, съответстваща на логаритъм от полуинхибиращата концентрация, а dx определя стръмността на кривата.

Получаването на сигмоидална зависимост се предвижда от това, че съществува строга корелация между свързването на хербицидите с Φ C2 и инхибирането на електронния транспорт (Tischer, Strotmann, 1977). Концентрационните криви на параметри, които зависят пряко от електронния транспорт отразяват зависимостта "доза-отговор" или равновесието между инхибираните и неинхибираните РЦ при дадена концентрация. Кривите "доза-отговор" са стандартен метод за определяне на инхибиращата активност (Streibig, 1988; Jensen et al., 1994; Seefeldt et al., 1995). Построяването и анализирането на такива криви на параметрите на ИК на Б Φ е в основата на публикуваните наскоро методики за оценка на хербицидния ефект (Klem et al., 2002; Hulsen et al., 2002) В интактни проби, ефективността на определена доза хербицид ще се определя от концентрацията му в околността на хербицидния участък, която от своя страна ще зависи от поглъщането, транспорта и разпределението на хербицида между външната среда и различните растителни тъкани и органи (Klem et al., 2002).

Симулираните криви "доза-отговор" са представени на фиг. 30 и фиг. 31. От параметрите на модела, получени чрез регресия по метода на най-малките квадрати, се изчислява концентрацията на полуинхибиране или индексът на полуинхибиране pI₅₀, който представлява отрицателен десетичен логаритъм от концентрацията.

Получената стойност за pI₅₀ се явява крайният резултат от анализа на хербицидното действие чрез луминесцентните методи за изследване. Тя позволява да се сравни ефективността на отделните хербициди или методи на третиране. Освен това, за определяне влиянието на температурата върху ефекта на хербицидите изследванията са правени с установените полуинхибиращи концентрации.



Фиг. 30. Концентрационни зависимости на максимумите I₁ (А) и I₄ (Б) на ИК на листа от растения, третирани 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. 31. Концентрационни криви на параметрите на БФ F_v/F_p (А) и 1–V_J (Б) за растения, третирани 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.

Константа на инхибиране

Методът за определяне на дисоциационната константа на комплекса D1–хербицид чрез, използващ процедурата за линеаризация на Лайнуевър – Бърк от ензимната кинетика (Tischer, Strotmann, 1977), би могъл да се приложи и за изчисляване константата на инхибиране, K_i , на целите растения. В този случай възприемаме растението като единицата, свързваща хербицидните молекули, а K_i ще отразява равновесието между хербицидните молекули в разтвора за третиране и тези, свързани с ФС2. Очевидно, K_i не трябва да се счита като мярка само за афинитета на хербицида към Q_B-мястото, но ще отразява също разпределението му в биомасата на растението. За изчисляването на K_i използваме параметъра V_J, получен от ОЈІР кривите. Относителният дял на инхибираните РЦ може да се даде с израза $[RC_i] = (V_J - V_J^0)/(1 - V_J^0)$, където V_J⁰ е измерено в отсъствие на инхибитор. Делът на свободните центрове ще бъде равен на 1 – $[RC_i]$. Ако се пренебрегнат промените в хербицидната концентрация в разтвора, [*I*], в резултат от свързването, то графиката на 1/ $[RC_i]$ в зависимост от 1/[I], ще бъде права, от чийто наклон се получава константата на инхибиране:

$$K_{i} = \frac{(1 - [RC_{i}])[I]}{[RC_{i}]}; \quad \frac{1 - [RC_{i}]}{[RC_{i}]} = \frac{K_{i}}{I}; \quad \frac{1}{[RC_{i}]} = K_{i}\frac{1}{[I]} + 1$$
(39)

Изчислените по този начин стойности на K_i за растения, третирани с трите хербицида чрез стъблен транспорт, са както следва: 2,3 ± 0,1 µM за диурон, 1,5 ± 0,1 µM за атразин и > 50 µM за диносеб.

Сравнение между ефективностите на атразин, диурон и диносеб

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).

Въпреки че редът на активността се запазва в трите метода на третиране, съотношенията между индексите на полуинхибиране са различни. Така, ефективността на атразин е много близка в сравнение с диурон, когато са подадени през стъблото, но много по-слаба при третирането на листа чрез дифузия. При втория метод атразин и диносеб имат сходна ефективност, докато през стъблото диносеб е много по-слабо ефективен като концентрациите на полуинхибиране са с повече от порядък по-високи. Тези специфични различия между трите хербицида се проявяват въпреки тяхното еднакво принципно действие върху ФС2 и отразяват природата на взаимодействие на хербицидните молекули с растителните тъкани и органи, през които те трябва да преминат преди да достигнат ТМ.

Табл. 1. Индекси на полуинхибиране pl₅₀ на параметрите на 3Ф и БФ l₁, l₄, 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

Сравнение ефективността на трите метода за третиране

Табл. 1 позволява да се направи сравнение на ефективността на трите използвани метода за третиране за всеки хербицид (с изключение на диносеб, за който данните не са пълни). 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 по-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 по-голям брой повторения.

Методът, с който се постига най-ефективно инхибиране от диурон и атразин, е стъбленият транспорт. Друго негово предимство е, че вариацията на данните е найниска 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.

Влияние на хербицидите върху кинетиката на затихване на 3Ф

При изложението на резултатите, получени с контролни листа, беше направено предположението, че съотношението между началната и крайната част на кривите на тъмнинния спад на 3Ф може да служи като показател за отвореността на РЦ. Една проверка на тази хипотеза може да се направи чрез разглеждането на кривите на затихване при насищащи концентрации на инхибитори, при което се предполага пълно блокиране на ЕТ, съответно затваряне на РЦ. В тези условия бързата част на релаксационната крива не се проявява дори и в началото на индукционния период, така че кривите в максимума I₁ и минимума D₂ имат еднаква форма (фиг. 32А).



Фиг. 32. А - криви на тъмнинното затихване на 3Ф в листа от грах, третирани с 30 µМ атразин чрез стъблен транспорт, по време на характеристичните точки I₁ (O) и D₂ (•). Стойностите са нормирани спрямо съответната крайна точка. Б - ИК на 3Ф (линия) и на отношението L_{0.5 ms}/L_{4.5 ms} (символи).

Отношението на началния интензитет на регистрираното затихване (0,5 ms) към крайния (4,5 ms) е 1,5, докато в контролните листа то надвишава 10. Все пак ходът на това отношение във времето на индукционния период показва известно "дозатваряне" на РЦ (фиг. 32Б), което корелира с обсъжданото вече бавно нарастване на БФ. Промените във вида на тъмнинното затихване на ЗФ нямат връзка с наблюдавания максимум в бавната фаза на ИК на ЗФ. Отново се потвърждава изводът, че формата на ИК на ЗФ не е резултат от преходи в окислително-редукционното състояние на акцепторите на ФС2 във времето на индукционния период.

На следващите три фигури е представен времевият ход на параметрите на трите кинетични компонента на затихването на 3Φ за избрани концентрации атразин, диурон и диносеб, приложени чрез стъблен транспорт. И трите хербицида подтискат амплитудите L_1 , L_2 и L_3 в целия времеви диапазон, като ефектът зависи от концентрацията. Амплитудите на субмилисекундния и милисекундния компонент се повлияват по-силно и то най-вече в бързата фаза на индукцията. При достатъчно високи концентрации максимумът на тези параметри в бързата фаза престава да се откроява. Константата L_3 е най-слабо чувствителна към хербицидното действие и с нарастване на концентрацията тя става доминираща. Този ефект е естествен като се има предвид, че в L_3 взема участие излъчването от затворени реакционни центрове, което става в секунден интервал (Mar et al., 1975; Rutherford, Inoue, 1984).

Ефектът на хербицидите върху характеристичното време на милисекундния компонент τ_2 ясно личи от графиките на долния ред на фигурите. С повишаване на концентрацията нарастват стойностите за т₂ в началния период от индукцията, а стойностите в бавната фаза остават непроменени. Ефектът на забавяне на милисекундния компонент изчезва над определени концентрации на инхибиторите. Както беше посочено, характеристичното време на даден компонент зависи от скоростта на процесите, намаляващи относителната концентрация на съответното "светещо" състояние. При нормални условия в началния период след осветяване редуцираните акцептори могат да се реокисляват чрез обратна реакция или чрез редуциране на пластохиноновия пул. При наличие на възможност за изчезване на светещи състояния чрез пренасяне на електроните към ПХ, времето на живот на тези състояния е по-малко, в сравнение със случая, когато ПХ пулът е напълно редуциран или преносът към ПХ е инхибиран. Следователно при блокираните от хербициди РЦ намаляването на характеристичното време в началото на индукцията е елиминирано. По амплитудата на прехода на характеристичното време τ_2 може да се съди за дела на инхибираните реакционни центрове, т.е. за хербицидния ефект.



Фиг. 33. ИК на компонентите на кинетиката на затихване на 3Ф за растения, третирани с атразин чрез стъблен транспорт. Амплитудите L₁, L₂ и L₃ и характеристичните времена τ₁ и τ₂ са изчислени чрез регресия на кривите на затихване в различни времена от ИК. Стойностите са осреднени за 4-6 повторения.



Фиг. 34. ИК на компонентите на кинетиката на затихване на 3Ф за растения, третирани с диурон.



Фиг. 35. ИК на компонентите на кинетиката на затихване на 3Ф за растения, третирани с диносеб.

Фактори, влияещи върху хербицидната активност

Изложените досега резултати са получени след поредица от експерименти, в които са изменяни условията на експеримента, включително избор на растения или листа от едно растение, метод на третиране, условия по време на и след третиране и условия на регистрация. В хода на тези експерименти бяха установени определени корелации между контролираните фактори и отчетения ефект на хербицидите. Стремежът ни беше да се оптимизира протокол за третиране на растенията и измерване на хербицидния ефект, чрез който се получава ефективно и възпроизводимо инхибиране с минимално влияние на самата процедура върху контролните листа.

Светлината по време на третиране чрез листна дифузия

При предварителни тестове беше установено, че в листа, потопени за два часа в разтвор на диурон, ефектът на хербицида зависи от условията на осветяване по време на инкубирането (данните не са показани). Ефектът беше слаб, когато листата бяха поставени на разсеяна светлина (<10 μ mol.m⁻².s⁻¹), и значително по-силен, когато те бяха осветявани с луминесцентни лампи (50 μ mol.m⁻².s⁻¹). За да постигнем още по-добър ефект, приближихме паничките до лампите като постигнахме интензитет 100 μ mol.m⁻².s⁻¹, но се оказа, че при тези условия се инактивира фотосинтетичният апарат дори в контролните листа. Затова при изследванията с листа, третирани с хербициди чрез дифузия, листата бяха инкубирани при интензитет 50 μ mol.m⁻².s⁻¹.

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. Интензитетът на светлината падаща на повърхността на паничките се променя с помощта на хартиен филтър и се измерва с детектор Quantitherm (Hansatech Instruments, Великобритания). За да се избегне нагряването от лампата, на пътя на светлината се поставя прозрачен съд с 10 ст воден стълб. Температурата на разтвора в паничките, отчитана със спиртен термометър, не надвишава 25° С. 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 I₄, F_v/F_p и 1–V_J, изчислени от ИК на БФ и 3Ф на листа инкубирани 2 h във вода или в 0,6 µМ диурон на тъмно или при осветяване с два светлинни интензитета. Както при контролните, така и при третираните с диурон листа с увеличаване на светлинния интензитет височината на максимума на 3Ф I₄ нараства, а максималната вариабилна флуоресценция F_v/F_p намалява. Това означа-

ва, че по време на осветяването във фотосинтетичния апарат настъпват бавно релаксиращи конформационни промени, които се отразяват на луминесцентните характеристики дори и след едночасова тъмнинна адаптация. 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. Най-добре това проличава в параметъра 1–V_J.

Тези резултати потвърждават, че проникването на хербицида през листната повърхност зависи от светлината. Вероятната причина за тази зависимост е, че при осветяване активната фотосинтеза води до отваряне на устицата и през тях хербицидът навлиза в междуклетъчните пространства на паренхима, избягвайки трудно преодолимата кутикула.

Табл. 2. Влияние на интензитета на светлината по време на инкубиране върху параметрите I₄, F_v/F_p и 1-V_J в листа потопени във вода или в 0,6 µМ диурон. Листата са осветявани 2 h, след което са адаптирани за 1 h на тъмно.

Интензитет	I_4		F _v /	Έp	$1-V_J$		
$\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	контрола	диурон	контрола	диурон	контрола	диурон	
0	74 ± 5	70 ± 9	$0,73 \pm 0,01$	$0,\!68 \pm 0,\!01$	$0,\!449 \pm 0,\!004$	$0,\!448 \pm 0,\!010$	
100	83 ± 2	71 ± 8	$0,\!70\pm0,\!00$	$0,\!63\pm\!0,\!04$	$0,\!506\pm0,\!005$	$0,\!395\pm0,\!042$	
500	112 ± 14	83 ± 7	$0{,}60 \pm 0{,}02$	$0,\!54\pm\!0,\!03$	$0,\!457 \pm 0,\!013$	$0,\!258\pm0,\!058$	

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. 36 показва, че възрастта на листата оказва влияние върху инхибиращата ефективност на диурон. По-младите листа (3-ти лист) са по-чувствителни в сравнение с постарите (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. 36. Индекси на полуинхибиране pl₅₀ 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-Hoie, 1969; Vostral et al., 1970). Предполагаме, че тези процеси предопределят установените различия в хербицидния 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 хербицидния участък ще бъдат по-високи и индексът на полуинхибиране – по-нисък.

С активността на фотосинтезата може да се обясни защо по-младите листа са повъзприемчиви 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 хербицидния 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

Едно от предимствата на метода на инфилтрация пред дифузионното прилагане на веществата е бързото му изпълнение. Навлизането на разтвора в листната тъкан става по време на самата процедура. Затова и в публикациите обикновено не се споменава периодът между инфилтрацията и самото измерване (Malkin et al., 1992). Самото инфилтриране обаче не гарантира, че молекулите на изследваното вещество са достигнали своята мишена на действие. Ако механичният шок не е толкова силен, че да разруши всички прегради, то визуалната полупрозрачност, белег на успешното инфилтриране, може да означава просто, че разтворът е изместил въздуха от междуклетъчните пространства на гъбчестия мезофил. С това основните бариери – кутикулата и епидермисът – са преодолени, но за дифузията на хербицида до тилакоидните мембрани през клетъчната стена, плазмалемата, външната хлоропластна мембрана, може да е необходимо още време.

За да определим дали и колко време е необходимо да престоят инфилтрираните листа до уравновесяване на хербицидната концентрация в ТМ, бе проведен следният експеримент. Един лист се инфилтрира по описаната процедура 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 3Ф – в продължение на 1 h на всеки 5 min се прави едно измерване за 5 s.

Кинетиката на инхибирането може да се проследи от зависимостта на максимума I₁ на 3Ф от времето (фиг. 37). Нормираните към контролата стойности за атразин и диурон са апроксимирани към експоненциална функция, $y = A.e^{-x/\tau} + A_0$, където y = е стойността на параметъра, а x – времето след инфилтрация. Характеристичното време на инхибиране на I₁ 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 реализирането на инхибиращ ефект са нужни поне няколко минути. Определеното характеристично време показва, че проницаемостта на скоростоопределящата 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 уравновеси концентрацията в хлоропластите и да се получи стабилен, възпроизводим ефект на хербицидите.


Фиг. 37. Динамика на инхибирането на максимума I₁ на ИК на 3Ф след инфилтриране на листа с 10⁻⁵ М диурон или атразин. Веднага след инфилтрирането листата са поставени в камерата на фосфороскопа и са измервани ИК за интервал от 5 s на всеки 5 min. Стойностите за двата хербицида са нормирани спрямо контролата (вж. легендата). Кривите представят най-добро апроксимиране към експоненциален спад, *y* = *A*.*e*^{-x/τ} + *A*₀. На вмъкнатата графика са представени изходните (ненормирани) стойности.

Статистическо разпределение на параметрите

Въпреки че третирането с хербициди повлиява параметрите на БФ и ЗФ по закономерен и предвидим начин, статистическите отклонения на третираните проби обикновено са далеч по-големи, отколкото на контролните. При това дисперсията е най-голяма около концентрациите на полуинхибиране. Дисперсията на данните обуславя грешката при определяне на средната стойност и ограничава възможните методи за статистическа обработка на резултатите. Често флуоресцентните параметри не се подчиняват на закона за нормалното разпределение (Lazár, Nauš, 1998) и стандартните параметрични методи за статистически анализ са неподходящи. От друга страна, честотното разпределение на ефектите е потенциален източник на информация за отговора на индивидите към стресовия фактор (Burke et al., 1988).

Благодарение на бързите (1 s) измервания с флуориметъра HandyPEA бе възможно да се проведе експеримент за установяване честотното разпределение на данните след третиране с диурон. Чрез листна дифузия бяха третирани общо 570 листа, разделени в 9 групи – според концентрацията (контрола, 10 µM и 30 µM) и според листния етаж (2, 3 и 4-ти лист). Хистограмите на честотното разпределение на параметъра на БФ 1–V_J в различните експериментални групи са представени на фиг. 38.



Фиг. 38. Хистограми на честотното разпределение на параметъра 1–V_J на ОЈІР криви, регистрирани от листа, третирани чрез листна дифузия с диурон (10 и 30 µМ). Трите колони сравняват разпределенията на параметъра във втори, трети и четвърти лист, съответно. Съответният разтвор за третиране е посочен на графиките.

Хистограмите на контролните листа показват нормално разпределение на този параметър. С добавянето на диурон разпределението силно се разширява, т.е. стандартното отклонение нараства неколкократно. 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 µМ 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

Стандартните методи за изследване на БФ или ЗФ в интактни листа, при които излъчването се регистрира от единичен детектор, имат ограничението, че в едно измерване се отчита средната стойност на флуоресценцията от избран участък, обикновено много по-малък от самия лист. Приема се, че фотосинтетичните характеристики са еднакви по цялата листна повърхност. Това обаче невинаги е така. В определени случаи локални смущения или градиенти на флуоресценцията могат да бъдат ранни индикатори за наличието на стрес (Lichtenthaler et al., 1998). Изследването на флуоресценцията само в една точка от третиран с хербициди лист би могло да даде подвеждащ резултат, ако концентрацията на хербицида не е равномерно разпределена в листа и детекторът попадне над неинхибиран участък.

Една наскоро развита техника за флуоресцентен анализ е генерирането на изображения на флуоресценцията (стационарна или вариабилна) от цели листа. Чрез флуоресцентни образи е визуализирана пространствената хетерогенност в инхибирането на фотосинтезата от SO_2 (Omasa et al., 1987), изменението на нефотохимичното гасене след прилагане на абсцисиева киселина (Daley et al., 1989); инкорпорирането на диурон в хлоропластите (Fenton, Crofts, 1990; Genty, Meyer, 1994; Lichtenthaler et al., 1997) и други видове стрес (Lichtenthaler et al., 1996).

Използвахме техниката на флуоресцентните образи, за да се визуализира проникването на хербицидите в граховите растения и динамиката на инхибиране на фотосинтетичния ЕТ в листата от различни етажи. Експериментите бяха осъществени съвместно с проф. Рето Страсер и Роналд Малдонадо-Родригез с помощта на специална апаратура за флуоресцентни образи 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. 39 са показани флуоресцентни образи на контролно и потопено в 6 µМ 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. 39Б) се виждат ясно инхибираните места, които се характеризират с по-интензивна флуоресценция (Fenton, Crofts, 1990; Genty, Meyer, 1994; Lichtenthaler et al., 1997). Прави впечатление остротата на контура между инхибираните и неинхиби-

раните площи, която потвърждава, че 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. 39. Флуоресцентни образи на грахови растения, потопени във вода или в 6 μМ 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.I., Чехия). Флуоресценцията се възбужда с непрекъсната светлина с λ = 635 nm и след като премине през 700 nm интерференчен филтър се изобразява върху ССD камера, свързана с компютър.

Съчетаването на широкоъгълен обектив и високочувствителна видеокамера позволява да се визуализира не само движението на хербицидите в рамките на един лист, но да се проследи транспортът им в цялото растение и да се сравни скоростта на разпространение в отделните листа. При прегледа на видеозаписите се установи, че диуронът се транспортира възходящо по стъблото без да навлиза в листата, докато не достигне апикалната част на растението, което става в рамките на 20 min. Много 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. 39 – 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 съответстват на 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-Hoie, 1969; Vostral et al., 1970).

Трябва да се отбележи, че зависимостта на скоростта на инхибиране от възрастта на листата засяга и най-младите, още неразвити листа, за които не е характерна поинтензивна фотосинтеза или транспирация (по наши непубликувани данни). Предполагаме, че това се дължи на физиологичните особености на епигенезата. Младите листа са атрагираща зона за метаболити и асимилати. В тях активно се синтезират ауксини, които стимулират създаването на осмотичен градиент (Полевой, 1989). В резултат се привлича постоянен приток както на флоемен сок, така и на вода от ксилема, съответно разтвор на хербициди.

Сравнявайки транслокацията на двата хербицида забелязахме, че атразинът се движи по-бързо в сравнение с диурона, както беше установено и в инфилтрираните листа. Динамиката на разпространение на хербицидите може да се проследи с помощта на специално разработената процедура за количествено определяне на относителната инхибирана площ.

Цифровата обработка на изображенията е правена с програмата SigmaScan Pro (SPSS, Германия). За всеки кадър относителната инхибирана площ се изчислява като площта, заемана от ярките области, разделена на площта на цялото растение. Площта на цялото растение се изчислява като се интегрират всички пиксели с интензитет над определен праг (прагово маркиране). За да се идентифицират тези участъци, които са вече инхибирани, се прави сравнение на текущия кадър с първия заснет кадър, в който все още няма инхибиране. По същество интензитетът на всеки пиксел в първия кадър се изважда от съответния пиксел в текущия кадър. В резултат на това се получава изображение само на тези пиксели, които са станали по-ярки с течение на времето. Тяхната сума дава инхибираната площ.

Този метод е приложим само, ако растенията са достатъчно добре фиксирани върху подложката, така че да не се движат по време на видеозаписа, и за изтеклия период техният растеж е пренебрежим. В противен случай инхибираната площ може да се изчисли с прагово маркиране на пиксели. Адекватното калибриране на прага на интензивност обаче изисква яркостта на образа да бъде сравнително равномерна.

Изменението на относителната инхибирана площ във времето е показано на фиг. 40 за растения, третирани с диурон и атразин. Получените криви имат сигмоидална форма, обусловена от наличието на лаг фаза в първите часове от третирането, след която скоростта на инхибиране се увеличава, като максималната скорост е след 12-тия час. В края на изследвания период, когато горните листа са напълно инхибирани, скоростта на увеличаване на инхибираната площ отново намалява. Кривите показват също различието в скоростта на придвижване на двата хербицида – 50% инхибиране за растенията, потопени в диурон, се достига след 16 h, а за атразин това време е 13 h.

За разлика от диурон и атразин, третирането с диносеб не доведе до нарастване на флуоресценцията в листата. Образи, подобни на показаните за диурон, не бяха постигнати дори, когато хербицидът беше приложен в десеткратно по-висока концентрация $(6 \times 10^{-5} \text{ M})$. Очевидно е, че диносебът много слабо се транспортира с възходящия ксилемен поток.



Фиг. 40. Динамика на инхибирането на електронния транспорт в растения, потопени в 6 µМ атразин или диурон. Стойностите са изчислени чрез измерване площта на областите с висока флуоресценция от флуоресцентните образи и отнасяне към цялата площ на растението. Флуоресцентните образи са получени както при фиг. 39. Линиите представляват сигмоидална регресия.

ВЛИЯНИЕ НА НИСКИ И ВИСОКИ ТЕМПЕРАТУРИ ВЪРХУ ХЕРБИЦИДНИЯ ЕФЕКТ

Температурата е фактор, който въздейства практически всички процеси в живите организми. Температурата във физиологичен диапазон от стойности повлиява не само скоростите на реакциите, но и конформацията на биологичните макромолекули. Може да се допусне, че свързването на хербициди с Φ C2, съответно техният инхибиращ ефект, ще зависи от температурното влияние върху пространствената структура на Φ C2. В този раздел ще изложим резултатите от изследването на луминесцентните характеристики, регистрирани при температури в интервала от 5 до 40°C, в контролни и третирани с хербициди листа. Хербицидите са приложени чрез стъблен транспорт в определените полуинхибиращи концентрации. Температурното въздействие върху ИК на БФ и 3Ф, измерени с флуориметъра FL-2006, потвърждава някои вече известни зависимости, получени в други растителни видове. Зависимостта на бързата част на ИК на БФ – преходът ОЛР – от температурата на регистрация се изследва за пръв път. Не е разглеждано досега влиянието на температурата на регистрация върху ИК на БФ и 3Ф на интактни листа в присъствие на хербициди.

ИК на БФ и 3Ф, регистрирани с FL-2006

Температурата влияе едновременно върху характеристиките на Б Φ и на З Φ (Cajanek et al., 1998). Ефектите върху Б Φ са сравнително по-добре изучени (Larcher et al., 1990; Georgieva, Yordanov, 1993; Georgieva, Yordanov, 1994).

Много изследвания са показали, че високотемпературният стрес при растенията води до понижаване на вариабилната флуоресценция (Bilger et al., 1984; Bilger, Schreiber, 1990; Georgieva, Yordanov, 1994). Действието на високите температури е свързано с нарушения както в донорната, така и в акцепторната страна на Φ C2 (Cajanek et al., 1998). Нарастването на началната флуоресценция, F_o, открито от Schreiber и Berry (1977), се отдава на дисоциация на CCK2 (Schreiber, Armond, 1978; Armond et al., 1980) и на блокиране на ЕТ в акцепторната страна на Φ C2 (Bukhov, Mohanty, 1993; Yamane et al., 1997). Смята се, че гасенето на F_m при високи температури е следствие от инактивиране на кислородното отделяне (Schreiber, Neubauer, 1987) и денатуриране на хлорофилбелтъчните комплекси (Yamane et al., 1997). Денатурираните комплекси мигрират в стромалната част на TM и имат по-слабо флуоресцентно излъчване (Misra, Biswal, 2000).

Променяйки едновременно скоростите на правите и обратните реакции на електронния пренос, околната температура оказва разностранно влияние върху 3Ф. Върху общия ефект се наслагва зависимостта на 3Ф от трансмембранния потенциал (Marković et al., 1999), който зависи едновременно от скоростта на електронния транспорт и от проницаемостта на ТМ. Влиянието на температурата върху ИК на 3Ф е изследвано от Бухов и съавт. (1987), Веселовский и Веселова (1990) и Marković и съавт. (1999). След предварителна термоинактивация на фотосинтезата в листа от грах, амплитудата и формата на ИК на 3Ф се изменят значително (Бухов и съавт., 1987) – след третиране с температури над 40°С се подтиска светенето, особено в бавната фаза на ИК. От друга страна, умерено повишаване на температурата стимулира амплитудата на 3Ф (Веселовский, Веселова, 1990). Marković и съавт. (1999) описват зависимостта на 3Ф от температурита с намаляване на активационната бариера на обратния електронен пренос и с температурито увеличаване на протонния градиент. По-детайлно е изучено влиянието на температурите върху ИК на 3Ф в листа от ечемик (Zaharieva et al., 1999) и *A. thaliana* (Zaharieva et al., 2001). Тези резултати могат да се сравнят с настоящата работа.

Влияние на температурата върху ИК на контролни листа

ИК на БФ и 3Ф, регистрирани при ниски (5–20°С) и високи (25–40°С) температури в листа от грах, с или без добавен атразин (1 μ M), са показани на фиг. 41 и фиг. 42. ИК на 3Ф в необработени с хербициди листа разкриват следните ефекти с увеличаване на температурата в интервала 5–30°С: 1) намалява амплитудата на бързата фаза (I₁–I₂), а се увеличава амплитудата на бавната фаза (D₂–I₄–I₅); 2) съотношението между максимумите в бързата фаза I₁ и I₂ се измества полза на I₂; 3) времето за достигане на максимумите на 3Ф, особено в бавната фаза, постепенно намалява (от 10 s до 0,5 s за I₄). Нагряването до 40°С модифицира силно ИК на 3Ф – пикът I₂ не се открива и интензитетът на светенето в бавната фаза на ИК е намален.

ИК на БФ също проявяват характерна температурна зависимост (долния ред на фиг. 41 и фиг. 42): при ниски температури наклонът на кривата във фазата О–Р е полегат и се увеличава с температурата, респективно при ниски температури е нужно повече време за достигане на максимума Р. При 5 и 10°С в ИК на БФ се откроява рамо във време 0,1 s (вероятно фазата I), което съвпада с пика I₁ на 3Ф. При по-високи температури тази фаза или изчезва, или се появява твърде рано, за да се види на регистрираната крива.



Фиг. 41. ИК на 3Ф (горе) и БФ (долу), регистрирани от контролни листа (непрекъснати линии) или третирани с 1 µМ атразин (пунктирани линии) при различни температури в интервала 5-20°С. Представени са средни криви от 6-10 повторения.



Фиг. 42. ИК на 3Ф (горе) и БФ (долу), регистрирани от контролни листа (непрекъснати линии) или третирани с 1 µМ атразин (пунктирани линии) при различни температури в интервала 25-40°С. Представени са средни криви от 6-10 повторения.

С увеличаване на температурата се ускорява също включването на гасенето на БФ след максимума. Амплитудата на вариабилната флуоресценция слабо се влияе от температурата в интервала 5–30°С. При 35°С се установява леко покачване на началната измерена флуоресценция, а при 40°С вариабилната флуоресценция чувствително намалява за сметка на по-ниското ниво F_p. Тази температура повлиява

лява за сметка на по-ниското ниво F_p. Тази температура повлиява еднакво амплитудата на БФ и ЗФ.

Повечето от наблюдаваните температурни ефекти върху ИК на БФ и ЗФ могат да се обяснят с промяна на скоростта на фотосинтетичните реакции. 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 Δ pH от температурата (Marković et al., 1999). И двата показателя нарастват до 30°С, така че тази температура може да се счита като оптимална, при която скоростта на междусистемния ЕТ е максимална.

Подтискането на БФ и 3Ф над 35°С 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 I₂. Прави впечатление, че в бавната фаза на ИК на 3Ф, регистрирана при 35°С и особено при 40°С, доминира пикът I₅ за сметка на I₄. Този резултат може да бъде обяснен, ако се следва направеното по-рано предположение, че I₅ е свързан с отваряне на РЦ, а I₄ 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 I₅.

ИК на БФ и ЗФ в присъствие на хербициди

С пунктирани линии на фиг. 41 и фиг. 42 са изобразени ИК, регистрирани от третирани с атразин листа. Избран е стъбленият транспорт като метод за прилагане на хербицида, в съответствие с предварително направеното сравнително изследване на приложимостта на различните методи. Растенията са поставяни върху разтвор с концентрация 1 µM, която е близка до определената средна концентрация на полуинхибиране на луминесцентните параметри. Аналогично, за третирането с диурон (ИК не са показани) е избрана концентрация 0,6 µM.

Специфичните ефекти на хербицидите на Φ C2 върху ИК на Б Φ и 3 Φ , които бяха описани в предишния раздел, се откриват в третираните растения при всички температури на регистрация. Интензитетът на 3 Φ в присъствие на атразин е понижен в целия индукционен период; пикът I₂ е отслабен спрямо I₁; в бавната фаза на ИК се подтиска в по-голяма степен I₅. Ефектът на атразина върху ИК на Б Φ се изразява в покачване на

началното ниво, съответно намаляване на вариабилната флуоресценция. Върху тези ефекти се наслагва 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 някои особености. Най-очевидната е, че при ниски температури атразинът подтиска много по-силно бързата фаза на ИК на 3Ф, отколкото бавната. Обратно, над 30°С между контролните и третираните листа няма разлика в нивото I₁, а само в I₄–I₅. 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. 43 и фиг. 44, съответно за атразин и диурон. Експериментите с двата хербицида са правени с растения от различна генерация, затова за всеки от тях има отделна контрола.

Ефекти върху индукционните параметри в контролни листа

Фигурите ясно показват противоположната зависимост на бързия (А) и бавния (Б) максимум на ИК на 3Ф от температурата по време на регистрация в интервала 5–30°С. Аналогичен ефект е наблюдаван в ечемик и *Arabidopsis* (Zaharieva et al., 1999; Zaharieva et al., 2001). Посочена е възможната връзка между намаляването на I₁ и ускоряването на електронния поток в участъка Q_A-Q_B от електронтранспортната верига. Срещуположният ход на максимумите в бързата и бавната фаза води до изменение на съотношението между тях, което е показано на фиг. 43Е и фиг. 44Е. Отношението I₄/I₁ монотонно нараства с температурата до 40°С, въпреки че интензитетът на 3Ф при тази температура общо намалява.

Отношението I_2/I_1 (фиг. 43Д, фиг. 44Д) може да служи като показател за скоростта на ЕТ в акцепторната страна на ФС2 (Goltsev et al., 1998). Този параметър също нараства с температурата, но не в целия изследван диапазон. За разлика от останалите параметри, чиято температурна зависимост е идентична в отделните експерименти, I_2/I_1 има максимум, който варира между 20 и 30°С.



Фиг. 43. Зависимост на параметрите на БФ и ЗФ, изчислени за контролни листа (•) и третирани с 1 µМ атразин чрез стъблен транспорт (0), от температурата на регистрация. А - I₁; Б - I₄; В - F_v/F_p; Г - F_p/F_s; Д - I₂/I₁; Е - I₄/I₁. Представени са средни стойности от 6-10 повторения; вертикалните черти изобразяват стандартната грешка.



Фиг. 44. Зависимост на параметрите на БФ и ЗФ, изчислени за контролни листа (●) и третирани с 0,6 µМ диурон чрез стъблен транспорт (○), от температурата на регистрация. А - I₁; Б - I₄; В - F_v/F_p; Г - F_p/F_s; Д - I₂/I₁; Е - I₄/I₁. Представени са средни стойности от 6-10 повторения; вертикалните черти изобразяват стандартната грешка.

В сравнение с параметрите на 3Ф, максималната вариабилна флуоресценция F_v/F_p (фиг. 43В, фиг. 44В) е по-слабо чувствителна към температурното действие. Все пак при 40°С се отчита известна инактивация на ФС2. Постепенното намаляване на вариабилната флуоресценция в целия температурен интервал би могло да се дължи на това, че с увеличаване на температурата се ускорява фотоиндуцираното нарастване на БФ, съответно нивото на БФ в началото на регистрацията се повишава. Сходно поведение на F_v обаче е получено и от други автори, използвали модулирана възбуждаща светлина (Georgieva, Yordanov, 1993; Yamane et al., 1998). При това измененията на F_v са и резултат от нарастването на F_p с понижаване на температурата. Предположено е, че ниската температура повишава F_v , лимитирайки скоростта на реокисление на Q_A^- поради забавяне синтеза на редуциран НАДФ и АТФ (Janssen, van Hasselt, 1988). Възможно е с увеличаване на температурата гасенето на БФ, свързано с активиране на ФС1, да се включва по-рано и така БФ да не достига максимума при ниски температури. За това свидетелства и формата на платото на ИК на БФ (фиг. 41 и фиг. 42).

Температурна зависимост на индукционните параметри след предварително третиране с хербициди

Луминесцентните параметри, представени на фиг. 43 и фиг. 44, като цяло имат сходни температурни зависимости в контролните и третираните с атразин или диурон растения. Основните показатели за хербицидното действие – максимумът I₄ и отношението F_v/F_p – доказват наличието на инхибиране в целия температурен диапазон от 5 до 40°C, с изключение единствено на третираните с диурон листа при 40°C. С други думи, ефективността на хербицидите изглежда не се променя драстично с температурата. Въпреки това, температурните зависимости на някои от останалите параметри имат забележимо различен ход в третираните проби, в сравнение с контролните. Така, нарастването на I₁ с понижаване на температурата, което е добре изразено в контролата, почти отсъства след третиране с атразин или диурон. Възниква въпросът дали това поведение е индикатор, че инхибиращата способност на хербицидите се влияе от температурата.

Действително, относителният ефект на атразина върху I₁ намалява от 60% при 10°C до отрицателни стойности над 35°C (табл. 3). По същия начин влияе и ефектът на диурона. Не е изключено във формирането на I₁ да участва повече от един процес, като единият е нечувствителен към хербицидното действие и температурата. В такъв случай при високите температури този компонент ще бъде определящ амплитудата на I₁ и в двете експериментални групи. Възможно е с повишаване на температурата за формиране на I₁

не на I_1 да придобива по-голяма роля електричният градиент, генериран при разделянето на зарядите от двете фотосистеми. Въпреки, че ефектът на подтискане на I_1 зависи от температурата, този показател не е доказателство за влияние на температурата върху ефективността на свързване на хербицидите.

Табл. 3. Относителен ефект на атразина в %, приложен чрез стъблен транспорт в концентрация 1 µМ, върху индукционните параметри на БФ и 3Ф при различни температури на регистрация. Ефектите са изчислени от израза (*C*-*A*)/*C*.100, където *C* е средната стойност на съответния параметър в контролните листа, а *A* - в третираните. Данните са от фиг. 43.

Т, ° С	I ₁	I_4	F_v/F_p	F _p /F _s	I_2/I_1	I_4/I_1
5	57	35	50	0	-10	-65
10	60	22	51	-4	-16	-100
15	48	26	55	-8	6	-48
20	26	27	34	5	-1	-3
25	22	30	49	17	17	10
30	12	23	57	26	23	14
35	-11	28	57	29	22	36
40	-10	48	81	27	38	54

Справка с табл. 3 показва, че подтискането на I_4 от атразина се изменя немонотонно в границите от 22% до 48%, но все пак се открива тенденция към нарастване на ефекта с увеличаване на температурата между 10 и 25°С. Такова влияние на температурата е ясно изразено при диурон над 20°С. В резултат на противоположната зависимост на ефекта на хербицидите върху I_1 и I_4 от температурата, ефектът върху отношението I_4/I_1 силно се увеличава с повишаване на температурата.

Температурната зависимост на I_2/I_1 в третираните проби е сходна с контролната, а разликите са незначителни при интервала 5–25°С. С по-нататъшно повишаване на температурата обаче хербицидите подтискат по-ефективно параметъра, което сочи, че ЕТ е инхибиран в по-голяма степен. Увеличаването на хербицидния ефект с температурата се вижда добре в третираните с атразин проби (фиг. 43Д, табл. 3).

Влияние на температурата се наблюдава и в ефекта на хербицидите върху параметрите на БФ. То е особено изразено при гасенето на БФ след максимума, изразено чрез отношението F_p/F_s . И двата хербицида инхибират параметъра едва над 20°С, като максимумът за атразин е при 35°С, а за диурон при 30°С. Трябва да се има предвид обаче, че F_s не съответства на стационарната стойност на БФ, а представлява интензитета, регистриран 1 min след началото на индукционния период. При ниски температури процесите, гасящи флуоресценцията, се включват по-късно и в периода на регистрация на ИК гасенето все още е незначително. Затова не считаме липсата на

ИК гасенето все още е незначително. Затова не считаме липсата на ефект на хербицидите върху F_p/F_s при температури под 25°C за действителен критерий за тяхното действие. Вероятно температурната зависимост на параметъра би изглеждала различно, ако F_s се отчита след по-дълъг период на осветяване.

Въпреки че на пръв поглед отношението F_v/F_p не дава основание да се направи изводът, че хербицидното действие се влияе от температурата, сравнение на относителните ефекти на диурон и атразин показва, че те се повишават при температури около 30°C. Както и при останалите параметри, инхибирането от атразин е още по-силно при 40°C, докато ефектът на диурона при тази температура изчезва. Необходими са повече експериментални данни, за да се определи със сигурност дали това е случайно или породено от различия в свойствата на двата инхибитора.

От изложеното дотук следва да се заключи, че температурата, макар и да няма решаващо значение за проявата на инхибиторния ефект на диурон и атразин, 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. Резултатите са обобщени в табл. 4. Както се вижда, за повечето параметри взаимодействието е достоверно при ниво на значимост $\alpha = 0,01$. Единствено за I4 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.

Табл. 4. Резултати от ANOVA - достоверност на взаимодействието между ефектите на температурата и хербицидите върху различните параметри на БФ и 3Ф. Представени са р-стойностите на теста.

Параметър	Атразин	Диурон	Параметър	Атразин	Диурон
I ₁	< 0,001	< 0,001	I_4/I_1	< 0,001	0,001
I_4	0,232	< 0,001	F_v/F_p	0,013	< 0,001
I_2/I_1	< 0,001	0,019	F _p /F _s	< 0,001	0,003

Кинетични компоненти на затихването на 3Ф

Беше посочено, че температурата на регистрация оказва различно влияние върху максимумите на бързата и бавната фаза на ИК на 3Φ – амплитудата на бързите намалява, а на бавните се увеличава с повишаване на температурата. От друга страна, в предишния раздел бе направен анализ на кинетичните компоненти на 3Φ , който показа, че в двете фази на индукцията преобладават различни компоненти на затихването на 3Φ . Следователно причина за различното поведение на максимумите на ИК може да бъде нееднаквото влияние на температурата върху компонентите на затихването. Разглеждането на температурната зависимост на отделните компоненти на 3Φ би трябвало да хвърли повече светлина по влиянието на температурата върху ИК на 3Φ и ефекта на хербицидите върху параметрите на 3Φ .



Температурна зависимост на амплитудите L₁, L₂ и L₃

Фиг. 45. Температурна зависимост на амплитудите L₁ (A, Γ), L₂ (Б, Д) и L₃ (B, E) на кривите на затихването на 3Ф, регистрирани в бързия (А, Б, В) и бавния (Г, Д, Е) максимум на ИК, в контролни грахови листа (•) и третирани с 1 μM атразин (0).

На фиг. 45 са представени температурните зависимости на амплитудите на субмилисекундните (L_1), милисекундните (L_2) и бавните (L_3) компоненти на 3Ф, получени чрез регресионен анализ на кривите на тъмнинното затихване в контролни и третирани листа. На горния ред (панели A, Б и B) са изобразени стойностите на амплитудите в бързия максимум на ИК (100 ms от началото на индукционния период), а долният ред (Г, Д, Е) представя амплитудите в регистрирания бавен максимум на ИК (5–15 s).

Горните три графики на фиг. 45 разкриват кинетичния състав на бързия максимум на ИК според температурата на регистрация. Температурните зависимости на трите амплитуди и най-вече на субмилисекундния и милисекундния компонент, които имат главна роля в началото на индукцията, съществено се различават. Докато L_1 има максимум при 25°C и намалява при други температури, L_2 има монотонна зависимост от температурата. Става ясно, че нарастването на 3Ф в бързата фаза на ИК с понижаване на температурата е за сметка на милисекундния компонент, който е доминиращ в общото светене, регистрирано при 5–10°C. Влиянието на температурата в бързата фаза на ИК може да се дължи както на промени в квантовата ефективност на излъчвателната рекомбинация, така и в съотношението между различните окислително-редукционни форми на РЦ, които са предшественици на отделни кинетични компоненти.

Нарастването на L_2 е забелязано и в предишни експерименти (Zaharieva et al., 2001), но засега е трудно да се определи със сигурност причината за това явление. Би могло да се предположи, че при ниски температури се забавя обменът между $Q_B^{2^-}$ и ПХ пула и се създава по-голяма концентрация на състоянията $Q_A Q_B^{2^-}$, които са предшественици на милисекундното светене. От друга страна, така би се увеличил и делът на затворените РЦ, $Q_A^- Q_B^{2^-}$, освен ако ниските температури не ускоряват реокисляването на Q_A^- , например чрез безизлъчвателна рекомбинация със Z^+ .

Влиянието на атразина върху отделните амплитуди в бързата фаза на ИК е силно различно. При високи температури инхибиторът подтиска в по-голяма степен L_1 , отколкото L_2 . Обратно, при ниски температури третирането с атразин води до чувствително подтискане на L_2 . Точно тази е причината за изявения ефект на хербицидите върху бързата фаза на ИК при температури под стайната. Това е доказателство, че стимулиращият ефект на ниската температура върху L_2 е зависим от наличието на ЕТ между Q_A и Q_B и се съгласува с хипотезата, че амплитудата на милисекундния компонент е свързана с концентрацията на състояния $Q_A Q_B^{2^-}$.

И трите компонента на светенето в бавния максимум на ИК (фиг. 45, графики Г, Д, Е) имат еднаква температурна зависимост, при това тя се запазва както в контролните, така и в обработените с атразин листа и се припокрива със зависимостта на интегралния интензитет в I₄ (сравни с фиг. 44Б). Съотношението между кинетичните компоненти в бавната фаза на индукцията не зависи от температурата, а зависимостта на интензитета на 3Ф се определя от процес, който модифицира еднакво амплитудите и на трите

компонента. Най-вероятно кривите отразяват зависимостта на трансмембранния електрохимичен протонен градиент от температурата.

Положителното влияние на температурата върху стойността на протонния градиент на пръв поглед може да противоречи с известната зависимост на нефотохимичното гасене на БФ, която сочи, че с понижаване на температурата под стайната, енергизацията на ТМ се увеличава до максимум около 5°С (Larcher et al., 1990). Трябва да се подчертае, че в този случай се касае за стационарното ниво на Δ pH в светлинно адаптирано състояние, докато I₄ отразява преходното натрупване на потенциала преди да се активира напълно синтезът на АТФ и консумацията му от тъмнинните реакции. Стойността на Δ pH в даден момент се определя както от скоростта на ЕТ, така и от протонната проницаемост на мембраната. За стационарното ниво по-голямо значение явно има вторият фактор, затова с понижаване на температурата, то се повишава поради забавяне консумацията на АТФ и НАДФ.Н₂, свързана с цикъла на Калвин – Бенсон (Krause et al., 1988). Квазистационарната стойност на Δ pH в индукционния период по-скоро ще се определя от скоростта на ЕТ, който също се забавя с понижаване на температурата.

Добавянето на инхибитор се отразява различно на кинетичните компоненти в бавния максимум на ИК, като най-силно се подтиска L_2 , относително по-слабо L_1 , а амплитудата на бавните компоненти почти не се влияе. Относителният ефект на хербицида върху L_1 , и особено върху L_2 , категорично зависи от температурата. Минимален ефект върху L_2 се реализира при 15 и 20°С – 20%, а с повишаване на температурата нараства – 24%, 27%, 34%, 45%, съответно при температури 25, 30, 35, 40°С.

Ефекти в характеристичното време на милисекундния компонент т₂

По време на индукционния период характеристичното време на милисекундния компонент τ_2 претърпява преход (забавяне), който се свързва с редуцирането на ПХ пула и изчезването на възможността за реокисляване на $Q_B^{2^-}$ в права посока. В условия на прекъснат ЕТ към ПХ (в присъствие на инхибитор) преходът не се наблюдава и τ_2 има максимална стойност още в началото на ИК. Разликата между характеристичното време в началото на индукцията и след затварянето на ПХ пула, $\Delta \tau_2$, може да служи като сравнителен показател за броя молекули ПХ, които се редуцират по време на индукционния период.



Фиг. 46. Температурна зависимост на параметъра Δτ₂, представляващ разликата между характеристичното време τ₂ в бавната част и в бързата част на ИК, в контролни листа (•) и третирани с 1 µМ атразин (0).

С повишаване на температурата в контролни листа амплитудата на прехода $\Delta \tau_2$ (фиг. 46) леко намалява за сметка на покачване в началната стойност на τ_2 . Причина за това може да е намаляване броя на леснодостъпните ПХ молекули, поради намаляване степента на агрегация на ТМ. В допълнение на това, според Yamane и съавт. (2000), при висока температура се активира нефотохимичен ензимен път за редуциране на ПХ.

Обработката с 1 μ M атразин понижава $\Delta \tau_2$ в целия диапазон от изследвани температури, но с повишаване на температурата над 20°C амплитудата на прехода спада много по-рязко, отколкото в контролата, т.е. относителният ефект на хербицида се увеличава. Точно този параметър на 3 Φ , който е пряко свързан с ЕТ след Q_A, показва най-ясно наличието на зависимост на хербицидния ефект от температурата.

Направеният дотук анализ 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 мишена и за проява на тяхното инхибиращо действие, но има определено влияние върху степента на получения 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 D_1 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.

OJIP криви

С помощта на специално конструиран прибор за термостатиране (вж. Материали и методи) беше възможно измерването на ОЛР криви с флуориметъра HandyPEA при поддържане на различна температура на изследваните листа. Получените криви са изобразени на фиг. 47 за контролни листа и третирани чрез стъблен транспорт с диурон в концентрация 0,6 µМ. Както се вижда, в изследвания температурен интервал ИК запазват характерния си ход без да претърпяват драстични качествени или количествени промени и в контролните, и в обработените листа. От една страна, това е индикатор, че функцията на ФС2 се запазва и не настъпват сериозни увреждания, а от друга, че инхибиращото действие на диурона се проявява при всички температури.



Фиг. 47. ОЛР криви регистрирани при различни температури от контролни листа (непрекъснати линии) или третирани с 0,6 µМ диурон чрез стъблен транспорт. Представени са средни криви от 4-6 повторения.

Влиянието на температурата в бързата фаза на ИК илюстрира по-добре от параметрите на JIP теста, представени на фиг. 48. Параметрите ABS/RC, TR₀/RC, ET₀/RC и DI₀/RC, които са изрази на скоростите на енергетичните потоци през РЦ на Φ C2 (Strasser et al., 2000) общо нарастват с увеличаване на температурата, докато ефективностите на фотохимичната реакция и електронния транспорт ϕ_{Po} и ψ_0 имат различна температурна зависимост. Параметърът ϕ_{Po} , изчислен като отношението F_v/F_m, намалява с температурата, в съгласие с отношението F_v/F_p, получено с флуориметъра FL-2006. Ефективността на електронния пренос $\psi_0 = 1-V_J$ има оптимум около 25°C и темпера-

турната зависимост на този параметър е определяща за зависимостите на общите показатели за функционалното състояние на пробата – PI (индекс на производителност) и DF (движеща сила).

Съвсем естествено е, че третирането с диурон не се отразява значително върху параметрите, свързани с потока на абсорбираната и фотохимично уловената енергия – ABS/RC и TR₀/RC, а инхибиторът специфично инхибира ефективността на ET ψ_0 и максималната скорост на преноса между Q_A и Q_B – ET₀/RC. В резултат на прекъсване на ET, общите индикатори за фотосинтезата PI и DF също се подтискат в значителна степен.



Фиг. 48. Зависимост на параметрите на JIP теста, изчислени за контролни листа (•) и третирани с 0,6 μМ диурон чрез стъблен транспорт (0), от температурата на регистрация. А - ABS/RC; Б - TR_o/RC; В - ET₀/RC; Γ - Dl_o/RC; Д - Sm; Е - φ_{Po}; Ж - ψ₀; З - Pl_{abs} (*performance index*); И - DF (*driving force*). Представени са средни стойности от 4-6 повторения; вертикалните черти изобразяват стандартната грешка.

При сравнение на температурната зависимост на показателите за ЕТ в контролни и третирани листа изникват интересни различия. Температурата ускорява ЕТ до 35°С и едновременно влияе върху ефективността на преноса само в контролата, докато параметрите на третираните листа изглежда са по-слабо чувствителни към температурата. Максимален ефект на хербицида се реализира при температура 25°С, а с понижаване на температурата ефектът чувствително намалява.

Направените наблюдения на зависимостта на хербицидния ефект в ОЛР прехода на БФ от температурата са в съгласие с останалите резултати от луминесцентните изследвания. Трябва да се има предвид обаче, че температурната зависимост на хербицидния ефект върху ЛР параметрите не е статистически достоверна, заради вариацията на данните в третираните листа.

Температурни криви на стационарната БФ и 3Ф

Температурните криви (термограми) на F_o , получени при постепенно нагряване на фотосинтетична проба с постоянна скорост и същевременно записване на флуоресценцията, възбуждана със слаб аналитичен източник, са използвани като метод за определяне топлинната устойчивост на фотосинтетичния апарат (Schreiber, Berry, 1977; Schreiber, Armond, 1978; Bilger et al., 1984; Yordanov, Weis, 1984). Инактивацията на Φ C2 предизвиква стръмно нарастване на БФ над 40°C, което се обяснява с дисоциация на ССК2 или с блокиране на ЕТ от редуциращата страна на Φ C2 (Schreiber, Armond, 1978; Bukhov et al., 1990). БФ нараства до максимум, след който интензитетът рязко спада в резултат на необратимо разрушаване на хлорофил-белтъчните комплекси.

Обикновено като критерий за стабилността на ФС2 се използва температурата T_{κ} , при която продължението на правата, описваща нарастването на БФ, пресича правата, съответстваща на БФ при стайна температура. Този температурен праг зависи от генотипа на растенията (Schreiber, Berry, 1977; Bilger et al., 1984) и от температурата на отглеждане (Armond et al., 1978). T_{κ} е свързана с други показатели като температурата, предизвикваща 50% некротизиране на листната повърхност (Bilger et al., 1984) или температурата на поява на K пик в бързата фаза на ИК (Lazár, Ilík, 1997).



Фиг. 49. Температурни криви на стационарната БФ (А) и ЗФ (Б), регистрирани в сканиращ режим на флуориметъра FL-2006 с постепенно нагряване на светлинно адаптиран лист със скорост около 3°C/min. С плътна и пунктирана линия са изобразени кривите, съответно, за контролно растение и за предварително третирано с 6 µМ диурон.

Флуориметърът FL-2006 позволява записването на температурни криви на стационарната БФ и ЗФ при постепенно нагряване на листа със скорост около 3°С/тіп. Ходът на температурните криви на F_s в контролни листа от грах (фиг. 49А) е сходен със зависимостта на F_o. Получената критична температура T_к на нарастване на БФ е 47°С, а температурата на максимума – 56°С. В интервала 5–30°С с понижаване на температурата БФ нараства, което вероятно отразява забавянето на тъмнинните реакции на фотосинтезата и оттам увеличаване нивото на Q_A⁻. Когато ЕТ е инхибиран с насищащи концентрации диурон (пунктираната линия на фиг. 49), термограмата на БФ няма максимум, а постоянно спада с нарастване на температурата, подобно на температурната зависимост на F_m (Pospíšil et al., 1998).

Температурните криви на стационарната 3Φ също могат да служат като показател за топлоустойчивостта на растенията (Веселовский, Веселова, 1990). Характерът на термограмите зависи от условията на отглеждане (температура, осветеност, минерално хранене), предварителната аклимация, възрастта на листата и др. Спадът на 3Φ при температури над 40°C, който се съгласува с покачването на Б Φ , се свързва с нарушаване на ЕТ от донорната страна на Φ C2, което произтича при инактивиране на КОС. Индикатор за топлоустойчивостта на КОС е положението на максимума на 3Φ или температурата, при която 3Φ е понижена двукратно.

Температурните криви на 3Ф, получени с флуориметъра FL-2006 (фиг. 49Б) нямат характерния високотемпературен максимум, който се проявява, когато 3Ф се отчита с фосфороскоп с по-продължителен тъмнинен период. Температурата на полуспада в

контролни листа е 51°С. Третирането с диурон силно променя формата на температурната крива на 3Ф. Вижда се, че спадът на 3Ф започва при по-ниски температури в сравнение с контролната проба, като 50% се достигат при 45,3°С, т.е. с почти 6°С по-рано. Веселовский и Веселова (1990) третират този въпрос във връзка с други данни, които сочат, че активността на ЕТ през ФС2 предпазва КОС от топлинна дезинтеграция. В тази светлина може да се разглеждат и работите на Наvaux и съавт. (Havaux et al., 1991; Havaux, Strasser, 1992а), които установяват, че топлинното инхибиране на ФС2 е значително намалено, ако листата се осветяват с умерен интензитет по време на третирането.

Ходът на термограмите на 3Ф за контролните и инхибираните листа се различава най-силно в интервала 5–40°С като резултат от това, че диуронът премахва светенето при по-ниските температури. С понижаване на температурата изчезват бавните компоненти на 3Ф, а излъчването се определя предимно от милисекундните компоненти, които са зависими от ЕТ в отворени РЦ. При регистриране на температурни криви с FL-2006 се съхраняват не само интегралните стойности на 3Ф, но и съответните криви на тъмнинна релаксация. Това позволява да се построят термограми на отделните кинетични компоненти, разделени чрез регресионен анализ на кривите на затихване. Фиг. 50 изобразява температурните зависимости на амплитудите L_1 , L_2 и L_3 в отсъствие и присъствие на 6 µM диурон. Амплитудите на субмилисекундния и милисекундния компонент в контролни листа имат превес над бавните компоненти, което е разбираемо, като се има предвид, че стационарната концентрация на затворените РЦ е ниска.



Фиг. 50. Температурни криви на амплитудите на кинетичните компоненти на стационарната 3Ф L₁ (1), L₂ (2) и L₃ (3), регистрирани в сканиращ режим на флуориметъра FL-2006 с постепенно нагряване на светлинно адаптиран лист със скорост около 3°C/min. А - контрола; Б - 6 µМ диурон.

Прави впечатление, че в интервала 20–40°С преобладава субмилисекундният компонент, но при по-ниски температури той намалява, а светенето се обуславя от L_2 – резултат, който беше получен и при анализа на ИК на 3Ф. Ако се приеме, че амплитудите на двата компонента представят концентрациите на определени състояния на РЦ – $Q_A Q_B^-$ и $Q_A Q_B^{2^-}$, то взаимният ход на термограмите на L_1 и L_2 би могъл да се интерпретира като превръщане на стационарната концентрация на Q_B^- в $Q_B^{2^-}$ с понижаване на температурата под 20°С.

От фиг. 50Б се вижда, че при инхибиран ЕТ съотношението между кинетичните компоненти е обратното и термограмата се определя изключително от температурната зависимост на бавните компоненти на 3Ф, докато бързите имат незначителен принос. В амплитудата L_3 при тези условия най-голям дял има секундното светене, което се излъчва в резултат на рекомбинация на зарядите между Q_A^- и КОС в състояние $S_{2(3)}$ (Rutherford, Inoue, 1984). L_3 , а оттам и общият интензитет на 3Ф в инхибираните листа, бързо спада с понижаване на температурата, докато 3Ф на контролните листа, в която преобладават бързите компоненти, нараства.

ВЛИЯНИЕ НА РН ВЪРХУ ХЕРБИЦИДНИЯ ЕФЕКТ

ИК на БФ и ЗФ на тилакоидни мембранни при различно рН

Едновременно регистрираните ИК на БФ и ЗФ от изолирани ТМ на грах, суспендирани в среди с различно рН, са изобразени на фиг. 51. По принцип в ИК на изолирани хлоропласти се откриват характерни различия в сравнение с интактни листа. Нарастването на БФ до максимума става по-бавно и времето както на максимума, така и на началото на гасенето в бавната фаза е по-голямо. Назад във времето се изместват и максимумите на ЗФ. Освен това двата пика в бързата фаза – I_1 и I_2 в изолирани хлоропласти са неразличими един от друг. Същото се отнася за I_4 и I_5 . С изключение на тези особености, ходът на ИК на БФ и ЗФ следва едни и същи закономерности както в целите листа, така и в суспензии от ТМ.



Фиг. 51. Индукционни криви на БФ (А) и 3Ф (Б) от контролни ТМ в среди с различно pH. Тилакоидите са суспендирани в среда съдържаща 25 mM MES/HEPES, 5 mM MgCl₂, концентрация на хлорофила 30 µg.ml⁻¹.

С промяната на pH и началното, и максималното ниво на БФ (фиг. 51А) се променят немонотонно. При това относителните изменения на тези стойности са пропорционални, така че отношението $F_v/F_p = (F_p-F_1)/F_p$ остава приблизително постоянно в целия диапазон pH. По-съществено влияние има pH върху ИК на 3Ф (фиг. 51Б). Общият интензитет на светенето е най-силен при pH 6,3 и намалява с промяна реакцията на средата към по-кисела или по-алкална. В най-киселата изследвана среда – pH 5,5 – понижението е 2,3 пъти, а при pH 8,0 – 6 пъти спрямо максималната стойност. Зависимостта на интензитета на 3Ф от pH съответства с публикуваните изследвания (Haveman, Lavorel, 1975).

Влиянието на pH върху 3Ф не е еднакво в целия индукционен период, в резултат на което се изменя формата на ИК. Най-чувствителен се оказва максимумът в бавната фаза – I₄. Амплитудата на I₄ е с 50% по-висока спрямо I₂ при pH 6,3, докато при стойности на pH под 6 и над 7,5 съотношението между двата максимума е в полза на I₂.

БФ и ЗФ могат да реагират на киселинността на външната среда чрез различни преки или непреки механизми. Една възможност е, например, директно въздействие на pH върху излъчващите хлорофили. Известно е, че хл. се превръщат в съответните неметални форми – феофитини, при ниско pH (van Gorkom et al., 1976; Lichtenthaler, 1987). Този ефект обаче се проявява при pH под 2 (van Gorkom et al., 1976). Енергозависимото гасене на флуоресценцията, което съпътства киселата реакция на лумена, може да е резултат от протониране на белтъците, което, индуцирайки конформационни изменения в тях, ги прави по-достъпни за гасители на флуоресценцията (Ruban, Horton, 1999).

Повърхностните електрични свойства на ТМ контролират редица фотосинтетични явления, включително флуоресценцията и електронния транспорт (Barber, 1980). pH влияе върху тези свойства главно като неутрализира повърхностния електричен заряд на мембраните (Scoufflaire et al., 1982), вследствие на което ТМ агрегират в грани. При pH-индуцираната агрегация на ТМ обаче е наблюдавано, че ФС1 и ФС2 остават хомогенно разпределени, както в неагрегираните тилакоиди (Barber, 1980; Karukstis, Sauer, 1985). Освен това, неутрализирането на зарядите не променя вариабилната флуоресценция така отчетливо както тяхното екраниране с катиони, вероятно заради запазения енергетичен пренос между ФС1 и ФС2 (Barber, 1980).

Отсъствието на ефект на pH върху относителната вариабилна флуоресценция (F_v/F_p) е в съгласие с известния факт, че в областта 2,5–8 ефективността на първичната фотохимична реакция и броят на активните реакционни центрове не зависят от pH (van Gorkom et al., 1976; Schatz, Witt, 1984). Също така е известно, че скоростта на ET зависи от pH и тя е максимална при стойности на pH 6–7 (Ben-Hayyim et al., 1976; Barr, Crane, 1980), където измерената 3Φ е с най-голям интензитет.

Тези реакции, в които участват протони като субстрат или продукт, е очевидно, че ще зависят от pH – напр. протонирането на ПХ. Прякото участие на протони обаче не е задължително, за да се влияе една реакция от pH. Протониране, респективно депротониране на белтъчни групи може да предизвика конформационни промени, вследствие

на които да се модифицира окислително-редукционния потенциал на определени електронни преносители (Demeter, Sallai, 1986). В отговор биха се изменили скоростите на правата и най-вече на обратната реакция. Възможно е умереното подкиселяване на средата да ускорява рекомбинацията на разделените заряди в РЦ и така да стимулира излъчването на ЗФ.

Интензитетът на 3Ф пряко зависи от Δ pH и следователно от влиянието на pH на средата върху Δ pH. Скоростта на ET, която се влияе от концентрацията на протоните, от своя страна контролира стойността на Δ pH. Буферният капацитет на вътретилакоидното пространство също зависи от pH. Тези фактори определят поведението на 3Ф и найвече на максимума в бавната фаза I₄.

Влияние на рН върху времето на затихване на 3Ф

Допълнителна информация за влиянието на pH върху реакциите, протичащи в акцепторната страна на Φ C2, може да се получи от анализа на тъмнинния спад на 3 Φ . Характеристичното време на милисекундния компонент (τ_2) на кинетиката на затихване претърпява характерния преход по време на индукционния период, наблюдаван и в интактни листа. И тук следва да се предположи, че забавянето на милисекундния компонент е свързано с редуцирането на ПХ пула, в резултат на което изчезва възможността за реокисляване на Q_B^{2-} и времето на живот на това състояние нараства.

От фиг. 52 се вижда, че pH не оказва никакво влияние върху 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 pH. Липсата на ефект в бавната фаза на индукцията може да се изтълкува с това, че pH 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 протонната концентрация. Допускаме, че повишаването на τ_2 в началото на индукцията с алкализиране на средата е отражение на забавеното протониране на Q_B с намаляване на концентрацията на протоните.



Фиг. 52. Влияние на pH върху характеристичното време на милисекундния компонент на 3Ф т₂, изчислен чрез регресия на кривите на тъмнинно затихване на 3Ф, регистрирани по време на индукционния период в контролни хлоропласти от грах.

Ефекти на хербицидите върху ИК на ТМ

Мястото за свързване на хербицидите и Q_B във ФС2 се състои от аминокиселинни остатъци 211 до 275 на D_1 белтъка (Trebst, 1987; Bowyer et al., 1991). Този участък е разположен близо до стромалната повърхност на ТМ. Може да се очаква, че структурата (конформацията) му ще зависи от протонната концентрация в стромата. Промени в конформацията на Q_B -участъка може да бъдат причина за влиянието на рН върху скоростта на ЕТ и характеристиките на ЗФ. В такъв случай би се повлияло свързването на хербицидите и реализирането на техния ефект.

Хербицидите атразин, диурон и диносеб бяха добавяни към хлоропластната суспензия 3 min преди измерването на ИК в концентрация 10^{-6} М за атразин и диурон и 10^{-5} М за диносеб. Ефектът на трите хербицида върху ИК на БФ и 3Ф в неутрална среда е показан на фиг. 53. Стойността на БФ в първата измерена точка от ИК в присъствие на хербициди е повишена драстично. В резултат на това вариабилната флуоресценция и отношението F_v/F_p намаляват. Забавената флуоресценция се подтиска в целия индукционен период и особено в бавната фаза, която при някои рН изчезва напълно.

Тези резултати показват, че в ИК на БФ и ЗФ от изолирани ТМ се проявават същите характерни ефекти на хербицидите, както и в ИК на интактни листа. Налага се изводът, че действието на хербицидите е локализирано изключително в ТМ. Респективно, промените в ИК на цели листа, третирани с хербициди, отразяват именно това специфично действие. Сравнението между ефектите на хербицидите в листа и в ТМ е необходим тест за адекватността и приложимостта на метода *in vivo*.



Фиг. 53. Индукционни криви на БФ (А) и ЗФ (Б) от тилакоидни мембрани, суспендирани в среда с рН 7. 1 - контрола; 2 -10⁻⁶ М атразин; 3 - 10⁻⁶ М диурон; 4 - 10⁻⁵ М диносеб.

Зависимост на ефекта на хербицидите върху параметрите на ИК от рН

Параметрите на ИК на БФ и ЗФ за тилакоиди, третирани с атразин, диурон и диносеб, са представени на фиг. 54-фиг. 57 като функция от рН на средата. Навсякъде стойностите са нормирани спрямо контролните (без хербицид), така че по-ниските стойности означават по-силен инхибиращ ефект на хербицидите върху съответния параметър.

Зависимостта на амплитудата на максимума I_2 на 3 Φ се вижда на фиг. 54. Напомняме, че този параметър включва едновременно и светенето, свързано с I_1 , тъй като в ИК на изолирани ТМ тези два прехода се сливат. И трите изследвани вещества понижават I_2 при всички стойности на pH, но кривите показват, че ефектът силно зависи от реакцията на средата.

Хербицидите атразин и диурон понижават стойността на I_2 най-силно в алкална среда – pH 8, като този ефект намалява с намаляването на pH. Ефектът на диурон е минимален при pH 6,3, а на атразин – при pH 6,5, но ходът на pH-кривата е подобен за двата инхибитора. Кривата, съответстваща на третирани с диносеб TM има форма, почти огледална по отношение на pH в сравнение с останалите две. Най-силно подтискане на I_2 се установява при кисели pH, а минималното отклонение от контролата е при pH 7,5.



Фиг. 54. Влияние на pH върху максимума на 3Ф 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.

Ще вметнем, че вече добре известният ред на активността – диурон > атразин > диносеб, се повтаря и в тези експерименти. Максималното подтискане на I_2 за диурон е 88%, за атразин – 78%, а за диносеб (в десет пъти по-голяма концентрация) – 91%.

Зависимостта на хербицидния ефект върху максимума в бавната фаза на ИК на ЗФ от pH (фиг. 55, фиг. 56) има доста различен ход в сравнение с I_2 , изразяващ се в монотонно нарастване на параметъра (намаляване на ефекта) с увеличаване на pH. Относителната амплитуда на този пик или отношението $(I_4-D_2)/D_2$ може да се разглежда като мярка за величината на протонния градиент. От фиг. 56 се вижда, че и трите хербицида инхибират изцяло генерирането на протонен градиент при pH 5,5, докато в контролните TM, макар и относително по-малък, пикът I₄ е ясно изразен (фиг. 51б).



Фиг. 55. Влияние на pH върху максимума на 3Ф 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.



Фиг. 56. Влияние на pH върху параметъра (I₄-D₂)/D₂, изчислен от ИК на 3Ф от тилакоидни мембрани, суспендирани в 10⁻⁶ М атразин, 10⁻⁶ М диурон или 10⁻⁵ М диносеб. Данните са нормирани спрямо контролата. Вертикалните черти представят стандартни грешки, изчислени от 3-5 повторения.

Ефектът на инхибиторите върху отношението F_v/F_p (фиг. 57) се променя с pH, описвайки криви, подобни на тези за I₂. Разликите от контролата, индуцирани от диурон и атразин, са най-малки в кисела среда и се задълбочават с нарастване на pH. Най-силно подтискане на вариабилната флуоресценция се установява при pH 8 – около 50% за двата хербицида. pH-зависимостта на ефекта на диносеб съществено се различава – и този параметър най-силно се инхибира при pH 5,5 и най-слабо при pH 7–7,5.



Фиг. 57. Влияние на pH върху отношението F_v/F_p, изчислено от ИК на БФ от тилакоидни мембрани, суспендирани в 10⁻⁶ М атразин, 10⁻⁶ М диурон или 10⁻⁵ М диносеб. Данните са нормирани спрямо контролата (без хербицид). Вертикалните черти представят стандартни грешки, изчислени от 3-5 повторения.

Представените резултати доказват, че ефектът на хербицидите в ТМ зависи от рН на външната среда. Потенциално средата би могла да влияе върху хербицидния ефект, индуцирайки изменения в самите хербициди. Изключваме тази причина като възможно обяснение на резултатите, предвид това, че стойностите на рКа за молекулите на атразин, диурон и диносеб са твърде ниски, далече от изследвания диапазон рН (Montgomery, 1993). Предполагаме, че в основата на влиянието на рН лежат конформационни промени в белтъците на Φ C2, най-вече засягащи Q_B-участъка на D1. Промяна в конформацията на хербицидния 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. С отдалечаване от тази специфична стойност на рH, сродството с хербицидните молекули нараства и те проявяват своя инхибиращ ефект. Това се изразява в камбановидната форма на зависимостта на параметрите I₂ и F_v/F_p от pH в третирани с хербициди хлоропласти.

Стойността на pH, 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. Доказателство за това е следното – атразин и диурон, които са от едно семейство – Ser₂₆₄, имат еднаква pH-зависимост на ефекта върху луминесцентните параметри. Ефектът на диносеб, който се отнася към свързващите се с His₂₁₅ хербициди, зависи твърде различно от pH. Хербицидите от "серинов" тип инхибират ET най-ефективно в алкална среда, а от "хистидинов" тип – в кисела. Обратно, TM имат максимаксимална устойчивост към диурон и атразин при pH 6–6,5, а към диносеб – при pH 7,5. Минимален ефект на диурон върху луминесценцията на TM при pH 5–6 е докладван и от други автори (Demeter, Sallai, 1986; Vasil'ev, Venediktov, 1993), които споменават наличието на нечувствителни към инхибиторите центрове на ФС2 при тези pH.

Ходът на pH кривите на максимума I₄ (фиг. 55, фиг. 56) се различава съществено от останалите параметри. В присъствие на инхибитори като цяло се подтиска генерирането на трансмембранен протонен градиент. Скоростта на ET и Δ pH обаче не са линейно свързани. Дори и при значително инхибиране на ET, Δ pH може да се образува от оставащата част преминали между двете фотосистеми електрони, или от цикличен ET около Φ C1. В такъв случай енергизацията на мембраната, съответно височината на I₄ ще зависи силно от pH на средата. Отношението (I₄–D₂)/D₂ нараства почти експоненциално с увеличаване на pH (броят електрони, необходим за генериране на Δ pH, намалява с порядък при увеличаване на pH с 1).



Фиг. 58. Схематичен модел на влиянието на pH върху ефекта на хербицидите атразин, диурон и диносеб в тилакоидните мембрани. Конфигурацията на хербицидното място и ориентацията на хербицидните молекули в него е фиктивна и не цели да представи реалната геометрия. pH изменя конформацията на Q_B-участъка на ФС2 (ограден в кръг), в резултат на което се променя сродството към един или друг тип хербициди. В алкална среда конформацията обуславя максимален ефект на "серинов" тип съединения като атразин и диурон, и в същото време ограничава свързването на "хистидинов" тип инхибитори като диносеб. В кисела среда се наблюдава обратното.

Предложената хипотеза за обяснение различното влияние на pH върху ефектите на атразин, диурон и диносеб е схематизирана на фиг. 58. Като обобщение може да се каже, че ефективността на инхибиторите на ФС2 зависи от моментната конформация на Q_B-участъка. Различни фактори са способни да предизвикат промени в конформацията, които да се отразят върху ефективността на хербицидите. Такива са температурата или pH. Тъй като хербицидите се свързват с различни групи в Q_B-участъка, то модифицирането на конформацията би се отразило по различен начин върху афинитета към тях. Тези взаимодействия могат успешно да се изучават с помощта на луминесцентните методи.

ИЗВОДИ

- 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.
- Анализът на хербицидното действие върху ИК на БФ и 3Φ показва, че максимумите I₁ и I₄ са зависими от трансмембранния потенциал, а в I₂ и частично в I₅ има влияние ЕТ и окислително-редукционното състояние на електронните акцептори на ΦC2.
- 3. Действието на хербициди на ФС2 може да се определи количествено в интактни листа чрез анализ на ИК на БФ и 3Ф. Параметрите I₄, 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.
- 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.
- Параметрите на БФ и ЗФ в контролни листа и относителният ефект на хербицидите върху тях зависят от температурата на регистрация. Общо се наблюдава усилване на хербицидната активност около стайната температура.

 9. Инхибиращият ефект на хербицидите в изолирани тилакоидни мембрани се модифицира от pH на суспензионната среда. Зависимостта на хербицидния ефект от pH е еднаква за хербицидите, свързващи се със Ser₂₆₄, и различна за двете суперфамилии – Ser₂₆₄ и His₂₁₅.
ЛИТЕРАТУРА

- 1. Abrahams J., Leslie A. G. W., Lutter R., Walker J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 621-628
- Ahlbrink R., Haumann M., Cherepanov D. A., Mulkidjanian A., Junge W. (1998) Function of tyrosine Z in water oxidation by Photosystem II: electrostatical promotor instead of hydrogen abstractor. *Biochemistry* 37: 1131-1142
- 3. Albertsson P.-A. (1995) The structure and function of the chloroplast photosynthetic membrane a model for the domain organization. *Photosynth. Res.* 46: 141-149
- 4. Alexandrov V. Y. (1964) Cytophysiological and cytoecological investigations of resistance of plant cells toward the action of high and low temperature. *Q. Rev. Biol.* 39: 35-77
- 5. Alexandrov V. Y. (1977) Cells, molecules and temperature. Conformational flexibility of macromolecules and ecological adaptation. Springer, Berlin.
- Allen D. J., Ort D. R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Sci.* 6: 36-42
- 7. Allen J. F., Duysen M. E., Staehelin L. A. (1988) Biogenesis of thylakoid membranes is controlled by light intensity in the conditional chlorophyll *b*-deficient CD3 mutant of wheat. *J. Cell. Biol.* 107: 907-919
- Allen J. F., Forsberg J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* 6: 317-326
- Amesz J., van Gorkom H. J. (1978) Delayed fluorescence in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29: 47-66
- Anderson J. M. (1986) Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 37: 93
- 11. Anderson J. M. (1992) Cytochrome b₆f complex: Dynamic molecular organization, function and acclimation. *Photosynth. Res.* 34: 341-357
- Anderson J. M., Andersson B. (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends Biochem. Sci.* 13: 351-355
- 13. Anderson J. M., Park Y.-I., Soon W. S. (1998) Unifying model for the photoinactivation of photosystem II in vivo under steady-state photosynthesis. *Photosynth. Res.* 56: 1-13
- Andersson B., Anderson J. M. (1980) Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 593: 427-440
- Armond P. A., Björkman O., Staehelin L. A. (1980) Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 601: 433-442
- Armond P. A., Schreiber U., Björkman O. (1978) Photosynthetic acclimation to temperature in the desert shrub, *Larrea divaricata*. II. Light-harvesting efficiency and electron transport. *Plant Physiol*. 61: 411-415
- 17. Armond P. A., Staehelin L. A. (1979) Lateral and vertical displacement of integral membrane proteins during lipid phase transition in *Anacystis nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1901-1905
- Arnold W. A., Davidson J. B. (1954) The identity of the fluorescent and delayed light emission spectra in Chlorella. J. Gen. Physiol. 37: 677-681
- 19. Arnold W., Azzi J. (1971) The mechanism of delayed light production by photosynthetic organisms and a new effect of electric fields on chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 14: 233-240
- Arntzen C. J. (1978) Dynamic structural features of chloroplast lamellae. In: L. Vernon, R. Sanadi (Eds), Current Topics in Bioenergetics, Academic Press, New York, pp. 111-160
- 21. Aro E.-M., Virgin I., Andersson B. (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-134
- 22. Arvidsson P.-O., Sundby C. (1999) A model for the topology of the chloroplast thylakoid membrane. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 687-694
- 23. Ashton F. M., Crafts A. S. (1981) Mode of Action of Herbicides. John Wiley and Sons, New York.
- 24. Avron M., Fork D. C. (1977) The rate of proton gradient decay in chloroplasts as an indicator of membrane parameters. *Carnegie Inst. Washington Yearb.* 76: 231-235

- Babu T. S., Sabat S. C., Mohanty P. (1992) Heat induced alterations in the photosynthetic electron transport and emission properties of cyanobacterium *Spirulina platensis*. J. Photochem. Photobiol. B-Biol. 12: 161-172
- 26. Bandal S. K., Casida J. E. (1972) Metabolism and photoalteration of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (DNBP herbicide) and its isopropyl carbonate derivative (dinobuton acariade). J. Agr. Food Chem. 20: 1235-1245
- 27. Barber J. (1980) Membrane surface charges and potentials in relation to photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 594: 253-308
- 28. Barber J. (1998) Photosystem two. Biochim. Biophys. Acta 1365: 269-277
- Barber J., Kraan P. B. G. (1970) Salt-induced light emission from chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 197: 49-59
- 30. Barber J., Kühlbrandt W. (1999) Photosystem II. Curr. Opin. Struct. Biol. 9: 469-475
- Barber J., Morris E. P., Büchel C. (2000) Revealing the structure of the photosystem II chlorophyll binding proteins, CP43 and CP47. *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 239-247
- Barber J., Nield N., Morris E. P., Hankamer B. (1999) Subunit positioning in photosystem II revisited. *Trends Biochem. Sci.* 24: 43-45
- 33. Barr R., Crane F. L. (1980) Two possible 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea-insensitive sites in photosystem II of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 591: 127-134
- 34. Barthelemy X., Popovic R., Franck F. (1997) J. Photochem. Photobiol. B-Biol. 39: 213-218
- 35. Bauer H. (1979) Photosynthesis of ivy leaves (*Hedera helix* L.) after heat stress. I. CO₂ gas exchange and diffusion resistances. *Physiol. Plant.* 44: 400-406
- 36. Bayer D. E., Yamaguchi S. (1965) Absorption of ¹⁴C-diuron. Weeds 13: 232-235
- Ben-Hayyim G., Drechsler Z., Neumann J. (1976) Photosystem 2 mediated electron transport and phosphorylation with ferricyanide and dibromothymoquinone. The uncoupling activity of dibromothymoquinone. *Plant Sci. Lett.* 7: 171-178
- 38. Bennet J. (1977) Phosphorylation of chloroplast membrane proteins. Nature 269: 344-346
- 39. Bennet J. (1991) Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. Annu. Rev. Plant Physiol. 42: 281-311
- Berry E. A., Guergova-Kuras M., Huang L. S., Crofts A. R. (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes. Annu. Rev. Biochem. 69: 1005-1075
- 41. Berry M. C., Björkman O. (1980) Photosynthetic responce and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 491-543
- 42. Bertsch. W. F., Azzi J. R., Davidson J. B. (1967) Identification of the oxygen-evolving photoreaction as the delayed light emitter in mutant of Scenedesmus obliques. *Biochim. Biophys. Acta* 143: 129-143
- 43. Bilger W., Schreiber U. (1989) Modulation of millisecond chlorophyll luminescence by non-photochemical fluorescence quenching. *Z. Naturforsch.* 44c: 966-970
- 44. Bilger W., Schreiber U. (1990) Chlorophyll luminescence as an indicator of stress-induced damage to the photosynthetic apparatus. Effects of heat-stress in isolated chloroplasts. *Photosynth. Res.* 25: 161-171
- 45. Bilger W., Schreiber U., Lange O. L. (1984) Determination of leaf heat resistance: comparative investigation of chlorophyll fluorescence changes and tissue nectrosis methods. *Oecologia* 63: 256-262
- 46. Björkman O., Boynton J., Berry J. (1976) Comparison of the heat stability of photosynthesis, chloroplast membrane reactions, photosynthetic enzymes, and soluble protein in leaves of heat-adapted and coldadapted C₄ species. *Carnegie Inst. Washington Yearb.* 75: 400-407
- 47. Björkman O., Demmig B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504
- 48. Blankenship R. (2002) Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Blackwell Science, Oxford.
- 49. Block M. C., van Deemen L. L. M., de Gier J. (1976) Effect of the gel to liquid crystalline phase transition on the osmotic behavior of phosphatidylcholine liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 433: 1-12
- 50. Boardman N. K., Anderson J. M. (1964) Isolation from spinach chloroplasts of particles containing different proportions of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* and their possible role in the light reactions of photosynthesis. *Nature* 206: 166-167
- Boekema E. J., Hankamer B., Bald D., Kruip J., Nield J., Boonstra A. F., Barber J., Rögner M. (1995) Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 175-179

- 52. Boekema E. J., van Roon H., van Breemen J. F. L., Dekker J. P. (1999) Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur. J. Biochem.* 266: 444-452
- 53. Böger P., Sandmann G. (2000) Action of modern herbicides. In: A. S. Raghavendra (Ed), Photosynthesis: A Comprehensive Treatise, Cambridge University Press, UK, pp. 337-351
- 54. Bohnert H. J., Sheveleva E. (1998) Plant stress adaptations making metabolism move. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 267-274
- Bonaventura C., Myers J. (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 189: 366-383
- 56. Boussac A., Zimmermann J. L., Rutherford A. W., Lavergne J. (1990) Histidine oxidation in the oxygenevolving photosystem-II enzyme. *Nature* 347: 303-306
- Bouvier F., D'Harlingue A., Hugueney P., Marin E., Marion-Poll A., Camara B. (1996) Xanthophyll biosynthesis: cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). J. Biol. Chem. 271: 28861-28867
- 58. Bowes J. M., Crofts A. R. (1981) The role of pH in the reactions of Photosystem II as measured by effects on delayed fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 637: 464-472
- Bowyer J. R., Camilleri P., Vermaas W. F. J. (1991) Photosystem II and its interaction with herbicides. In: M. P. Percival, N. R. Baker (Eds), Herbicides, Vol 10. Elsevier, Amsterdam, pp. 27-85
- Bowyer J. R., Hilton J. M., Whitelegge J., Jewess P., Camilleri P., Crofts A., Robinson H. Z. (1990) Molecular modelling studies on the binding of phenylurea inhibitors to the D1 protein of photosystem II. Z. *Naturforsch.* 45c: 379-387
- 61. Bratt C. E., Arvidsson P.-O., Carlsson M., Åkerlund H.-E. (1995) Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by [H and ascorbate concentration. *Photosynth. Res.* 45: 169-175
- 62. Bricker T. M. (1990) The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in photosystem II. *Photosynth. Res.* 24: 1-13
- Bricker T. M., Ghanotakis D. (1996) Introduction to oxygen evolution and the oxygen-evolving complex. In: D. R. Ort, C. F. Yocum (Eds), Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 113-136
- 64. Britt R. D. (1996) Oxygen evolution. In: D. R. Ort, C. F. Yocum (Eds), Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 137-164
- 65. Broda E., Peschek G. A. (1979) Did respiration or photosynthesis come first? J. Theor. Biol. 81: 201-212
- 66. Browse J., Xin Z. (2001) Temperature sensing and cold acclimation. Curr. Opin. Plant Biol. 4: 241-246
- 67. Bugos R. C., Yamamoto H. Y. (1996) Molecular cloning of violaxanthin de-epoxidase from romaine lettuce and expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6320-6325
- 68. Bukhov N. G., Boucher N., Carpentier R. (1996) Transformation of the photoacoustic signal after treatment of barley leaves with methylviologen or high temperature. *Photochem. Photobiol.* 63: 296-301
- Bukhov N. G., Boucher N., Carpentier R. (1998) Loss of the precise control of photosynthesis and increased yield of non-radiative dissipation of excitation energy after mild heat treatment of barley leaves. *Physiol. Plant.* 104: 563-570
- 70. Bukhov N. G., Carpentier R. (2000) Heterogeneity of photosystem II reaction centers as influenced by heat treatment of barley leaves. *Physiol. Plant.* 110: 279-285
- 71. Bukhov N. G., Karapetyan N. V. (1978) Studies of the acceptor side of Photosystem II using the temperature dependence of P700 phototransformations. *Mol. Biol. (USSR)* 12: 868-878
- 72. Bukhov N. G., Mohanty N. (1993) Analysis of the heat stress induced quenching of variable chlorophyll a fluorescence in beet spinach leaves: possible accumulation of oxidized quencher P680⁺ under high illumination. *J. Plant. Biochem. Biotechnol.* 2: 111-116
- 73. Bukhov N. G., Mohanty P. (1999) Elevated temperature stress effects on photosystems: characterization and evaluation of the nature of heat induced impairments. In: G. S. Singhai, G. Renger, S. K. Sopory, K. D. Irrgang, Govindjee (Eds), Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis, Narosa Publishing House, New Delhi, India, pp. 617-648
- 74. Bukhov N. G., Sabat S. C., Mohanty N. (1990) Analysis of chlorophyll *a* fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplasts. *Photosynth. Res.* 23: 81-87
- 75. Bukhov N. G., Wiese C., Neimanis S., Heber U. (1999) Heat sensitivity of chloroplasts and leaves: leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport. *Photosynth. Res.* 59: 81-93

- 76. Bulychev A. A., Vredenberg W. J. (1999) Light-triggered electrical events in the thylakoid membrane of plant chloroplasts. *Physiol. Plant.* 105: 577-584
- 77. Buman R. A., Gealy D. R., Fuerst E. P. (1992a) Relationship between temperature and triazinone herbicide activity. I. Herbicide binding to thylakoid membranes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 43: 22-28
- Buman R. A., Gealy D. R., Fuerst E. P. (1992b) Relationship between temperature and triazinone herbicide activity. II. Herbicide absorption by protoplasts and herbicide inhibition of photosynthetic electron transport in thylakoids. *Pestic. Biochem. Physiol.* 43: 29-36
- 79. Burke P. V., Bullen B. L., Poff K. L. (1988) Frequency distribution histograms for the rapid analysis of data. *Plant Physiol.* 87: 797-798
- 80. Butler P. J. G., Kühlbrandt W. (1988) Aggregate size of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex in detergent solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3797-3801
- Butler W. L. (1978) Energy distribution in the photochemical apparatus of Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 29: 345-378
- Cajanek M., Stroch M., Lachetova I., Kalina J., Spunda V. (1998) Characterization of the photosystem II inactivation of heat- stressed barley leaves as monitored by the various parameters of chlorophyll a fluorescence and delayed fluorescence. J. Photochem. Photobiol. B-Biol. 47: 39-45
- 83. Cantor C. R., Schimmel P. R. (1980) Biophysical Chemistry Part II. Techiques for the Study of Biological Structure and Function. W. H. Freeman, San Francisco.
- 84. Cao J., Govindjee (1990) Chlorophyll a fluorescence transient as an indicator of active and inactive Photosystem II in thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1015: 180-188
- 85. Carpentier R. (1999) Effect of high-temperature stress on the photosynthetic apparatus. In: M. Pessarakli (Ed), Handbook of Plant and Crop Stress, Marcel Dekker, New York, pp. 337-348
- Carpentier R., Fuerst E. P., Nakatani H. Y., Arntzen C. J. (1985) A second site for herbicide action in Photosytem II. *Biochim. Biophys. Acta* 809: 293-299
- Carrel T. G., Tyryshkin A. M., Dismukes G. C. (2002) An evaluation of structural models for the photosynthetic water-oxidizing complex derived from spectroscopic and X-ray diffraction signatures. J. Biol. Inorg. Chem. 7: 2-22
- Chitnis P. R. (2001) Photosystem I: function and physiology. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 593-626
- 89. Chylla R. A., Whitmarsh J. (1989) Inactive photosystem II complexes in leaves. Plant. Physiol. 90: 765-772
- 90. Critchley C. (1996) The structure and function of Photosystem II. In: M. Pessarakli (Ed), Handbook of Photosynthesis, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 231-239
- Currier H. B., Dybing C. D. (1959) Foliar penetration of herbicides Review and present status. Weeds 7: 195-213
- 92. Daley P. F., Raschke K., Ball J. T., Berry J. (1989) Topography of photosynthetic activity of leaves obtained from video images of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol*. 90: 1233-1238
- 93. Dau H. (1994) Short term adaptation of plants to changing light intensities and its relation to photosystem II photochemistry and fluorescence emission. J. Photochem. Photobiol. B-Biol. 26: 3-27
- 94. de Grooth B. G., van Gorkom H. J. (1981) External electric field effects on prompt and delayed fluorescence in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 635: 445-456
- De Las Rivas J., Barber J. (1997) Structure and thermal stability of Photosystem II reaction centers studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 36: 8897-8903
- 96. Debus R. J. (1992) The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 269-352
- Deisenhofer J., Epp O., Sinning I., Michel H. (1995) Crystallographic refinement at 2.3-angström resolution and refined model of the photosynthetic reaction centre from *Rhodopseudomonas viridis*. J. Mol. Biol. 246: 429-457
- Dekker J. P., Bowlby N. R., Yocum C. F., Boekema E. J. (1990) Characterization by electron microscopy of isolated particles and two-dimensional crystals of the CP47-D1-D2-cytochrome b-559 complex of Photosystem II. *Biochemistry* 29: 3220-3225
- 99. Delosme R. (1967) Etude de l'induction de fluorescence des algues vertes et des chloroplastes au debut d'une illumination intense. *Biochim. Biophys. Acta* 143: 108-128
- Delrieu M.-J. (1981) 3-(3,4-dichlorphenyl)-1,1-dimethylurea effects on the oxidizing side of PSII. Photobiochem. Photobiophys. 3: 137-144

- 101. Demeter S., Sallai A. (1986) Effect of pH on the thermoluminescence of spinach chloroplasts in the presence and absence of Photosystem II inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 851: 267-275
- 102. Demmig-Adams B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants. A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020: 1-24
- 103. Demmig-Adams B., Adams W. W., III (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1: 21-26
- 104. Dewez D., Marchand M., Eullaffroy P., Popovic R. (2002) Evaluation of the effects of diuron and its derivatives on *Lemna gibba* using a fluorescence toxicity index. *Environ. Toxicol.* 17: 493-501
- 105. Diner B. A., Rappaport F. (2002) Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of Photosystem II of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 551-580
- 106. Doltchinkova V., Goltsev V., Tuparev N. (1997) Herbicide effect on luminescence properties of thylakoid membranes. Ann. Univ. Sofia 88: 7-10
- 107. Drechsler Z., Neumann J. (1992) A differential effect of 3-(3'4' dichlorophenyl)-1,1 dimethyl urea and atrazine on fluorescence kinetics in chloroplasts. *Photosynth. Res.* 31: 139-148
- 108. Duniec J. T., Israelachvili J. N., Ninham B. W., Pashley R. M., Thorne S. W. (1981) An ion-exchange model for thylakoid stacking in chloroplasts. *FEBS Lett.* 129: 193-196
- 109. Durner J., Thiel A., Boeger P. (1986) Phenolic herbicides: correlation between lipophilicity and increased inhibitory sensitivity of thylakoids from higher plant mutants. Z. Naturforsch. 41c: 881-884
- 110. Duysens L. N. M., Sweers H. E. (1963) Mechanism of two photochemical reaction in algae as studied by means of fluorescence. In: J. Ashida (Ed), Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Tokyo University Press, Tokyo, pp. 353-372
- 111. Elrad D., Niyogi K. K., Grossman A. (2002) A major light harvesting polypeptide of photosystem II functions in thermal dissipation. *Plant Cell* 14: 1801-1816
- 112. Enami I., Kamamura M., Tomo T., Isokawa Y., Ohta H., Katoh S. (1994) Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PS II membranes release of the extrinsic 33 kDa protein or of Mn? *Biochim. Biophys. Acta* 1186: 52-58
- 113. Ermler U., Fritzsch G., Buchanan S. K., Michel H. (1994) Structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 Å resolution: Cofactors and protein-cofactor interactions. *Structure* 2: 925-936
- Eskling M., Arvidsson P.-O., Åkerlund H.-E. (1997) The xantophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plant.* 100: 806-816
- 115. Evans E. H., Crofts A. T. (1973) The relationship between delayed fluorescence and the H⁺ gradient in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 292: 130-139
- 116. Fenton J. M., Crofts A. R. (1990) Computer aided fluorescence imaging of photosynthetic systems: Aplication of video imaging to the study of fluorescence induction in green plants and photosynthetic bacteria. *Photosynth. Res.* 26: 59-66
- 117. Forbush B., Kok B. (1968) Reaction between primary and secondary electron acceptors of photosystem II of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 162: 243-253
- 118. Ford R. C., Stoylova S., Holzenburg A. (2002) An alternative model for photosystem II/light harvesting complex II in grana membranes based on cryo-electron microscopy studies. *Eur. J. Biochem.* 269: 326-336
- 119. Fork D. C., Mohanty P., Hoshina S. (1985) The detection of early events in heat disruption of thylakoid membranes by delayed light emission. *Physiol. Veg.* 23: 511-521
- 120. Forster Th. (1965) Delocalized excitation and excitation transfer. In: O. Sinanoglu (Ed), Modern Quantum Chemistry Istanbul Lectures, Vol 3. Academic Press, New York, pp. 93-137
- 121. Fowler C. F. (1977) Proton translocation in spinach chloroplasts and its relationship to electron transport between the photosystems. *Biochim. Biophys. Acta* 459: 351-363
- 122. Franck F., Juneau P., Popovic R. (2002) Resolution of the Photosystem I and Photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 1556: 239-246
- 123. Frank H. A., Bautista J. A., Josue J. S., Young A. J. (2000) Mechanism of non-photochemical quenching in green plants: Energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin. *Biochemistry* 39: 2831-2837
- 124. Fromme P. (1996) Structure and function of photosystem I. Curr. Opin. Struct. Biol. 6: 473-484
- 125. Fryer J. H., Ledig F. T. (1972) Microevolution of the photosynthetic temperature optimum in relationship to the elevational complex gradient. *Can. J. Bot.* 50: 1231-1235

- 126. Garab G., Mustárdy L. (1999) Role of LHCII-containing macrodomains in the structure, function and dynamics of grana. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 649-658
- 127. Gealy D. R., Buman R. A. (1989) Response of photosynthesis and growth of jointed goatgrass and winter wheat to hotosynthetic herbicides and temperature. *Proc. West. Soc. Weed Sci.* 42: 151
- 128. Genty B., Meyer S. (1994) Quantitative mapping of leaf photosynthesis using chlorophyll fluorescence imaging. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 277-284
- 129. Georgieva K. (1999) Some mechanisms of damage and acclimation of the photosynthetic apparatus due to high temperature. *Bulg. J. Plant Physiol.* 25: 89-99
- 130. Georgieva K., Goltsev V., Yordanov I. (1989) Influnece of high temperature on electrophoretic mobility of thylakoid membranes from two pea cultivars. *Photosynthetica* 23: 399-402
- 131. Georgieva K., Yordanov I. (1993) Temperature dependence of chlorophyll fluorescence parameters of pea seedlings. *J. Plant Physiol.* 142: 151-155
- 132. Georgieva K., Yordanov I. (1994) Temperature dependence of photochemical and non-photochemical fluorescence quenching in intact pea leaves. *J. Plant Physiol.* 144: 754-759
- 133. Gerhardt V., Bodemer U. (2001) An *in vivo* method for electron transport studies and on linie applications in limnology. Proc. 12th Int. Congr. Photosynthesis, CSIRO Publishing, Colingwood,
- 134. Gerhardt V., Krause G. H. (1984) Delayed luminescence of algae. J. Luminescence 31/32: 895-898
- 135. Ghanotakis D. F., Yocum C. F. (1986) Purification and properties of an oxygen evolving reaction center complex from Photosystem II membranes: A simple procedure utilizing a nonionic detergent and elevated ionic strength. *FEBS Lett.* 197: 244-248
- 136. Ghanotakis D. F., Yocum C. F. (1990) Photosystem II and the oxygen-evolving complex. Annu. Rev. Plant Biol. 41: 255-276
- 137. Giardi M. T., Marder J. B., Barber J. (1988) Herbicide binding to the isolated Photosystem II reaction centre. *Biochim. Biophys. Acta* 934: 64-71
- 138. Gibasiewicz K., Dobek A., Breton J., Leibl W. (2001) Modulation of primary radical pair kinetics and energetics in photosystem II by the redox state of the quinone electron acceptor Q_A. *Biophys. J.* 80: 1617-1630
- 139. Gilmore A. M., Yamamoto H. Y. (1992) Dark induction of zeaxanthin-dependent non-photochemical fluorescence quenching mediated by ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1899-1903
- Golbeck J. H. (1992) Structure and function of photosystem I. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 293-324
- 141. Golbeck J. H. (1999) A comparative analysis of the spin state distribution of in vitro and in vivo mutants of PsaC. A biochemical argument for the sequence of electron transfer as F_X-F_A-F_B-Ferredoxin. *Photosynth. Res.* 61: 107-144
- 142. Goltsev V., Traikov L., Hristov V. (1998) Effects of exogenous electron acceptors on kinetic characteristics of prompt and delayed fluorescence in atrazine inhibited thylakoid membranes. In: G. Garab (Ed), Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 3885-3888
- 143. Goltsev V., Yordanov I. (1997) Mathematical model of prompt and delayed chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Photosynthetica* 33: 571-586
- 144. Goltsev V., Yordanov I., Doltchinkova V., Kantcheva M. (1987) High-temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus. 3. Modifications of the thylakoid membrane electrophoretic mobility. *Photosynthetica* 21: 189-192
- 145. Gounaris K., Barber J. (1983) Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipids in nature. *Trends Biochem. Sci.* 8: 378-381
- 146. Gounaris K., Brain A. P. R., Quinn P. J., Williams J. C. (1984) Structural reorganization of chloroplast thylakoid membranes in response of heat stress. *Biochim. Biophys. Acta* 766: 198-208
- 147. Govindjee (1995) Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 131-160
- 148. Govindjee (2002) A role for a light-harvesting antenna complex of photosystem II in photoprotection. *Plant Cell* 14: 1663-1668
- Green B. R., Durnford D. G. (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 685-714
- 150. Green B. R., Parson W. W. (2001) Light-Harvesting Antennas. Kluwer Academic Press, Dordrecht.

- 151. Greenfield S. R., Seibert M., Govindjee, Wasielewski M. R. (1997) Direct measurement of the effective rate constant for primary charge separation in isolated photosystem II reaction centers. J. Phys. Chem. B 101: 2251-2255
- 152. Grossman A. R., Bhaya D., Apt K. E., Kehoe D. M. (1995) Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control, and evolution. *Annu. Rev. Genetics* 29: 231-288
- 153. Guisse B., Srivastava A., Strasser R. J. (1995) Effects of high temperature and water stress on the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient of potato leaves. In: P. Mathis (Ed), Photosynthesis: from Light to Biosphere, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 913-916
- 154. Hager A., Holocher K. (1994) Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* 192: 581-589
- 155. Haldrup A., Jensen P. E., Lunde C., Scheller H. V. (2001) Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant Sci.* 6: 301-305
- 156. Hankamer B., Barber J., Boekema E. J. (1997) Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 641-671
- 157. Hankamer B., Morris E. P., Barber J. (1999) Revealing the structure of the oxygen evolving core dimer of photosystem two by cryoelectron crystallography. *Nature Struct. Biol.* 6: 560-564
- 158. Hansen L. K. (1991) Molecular orbital theory of monomer pigments. In: H. Scheer (Ed), Chlorophylls, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 993-1014
- 159. Härtel H., Haseloff R. F., Walter G., Rank B. (1993) Photoinduced damage in leaf segments of wheat (*Triticum aestivum* L.) and lettuce (*Lactuca satica* L.) treated with 5- aminolevulinic acid. II. Characterization of photodynamic damage by means of delayed chlorophyll fluorescence and P700 photooxidation. J. Plant Physiol. 142: 237-243
- 160. Haumann M., Junge W. (1996) Protons and charge indicators in oxygen evolution. In: D. R. Ort, C. F. Yocum (Eds), Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 165-192
- Haumann M., Junge W. (1999) Photosynthetic water oxidation: a simplex-scheme of its partial reactions. Biochim. Biophys. Acta 1411: 86-91
- 162. Haumann M., Mulkidjanian A., Junge W. (1999) Tyrosine-Z in oxygen-evolving Photosystem II: a hydrogen-bonded tyrosinate. *Biochemistry* 38: 1258-1267
- 163. Hauska G., Schutz M., Buttner M. (1996) The cytochrome b₆f complex composition, structure and function. In: D. R. Ort, C. F. Yocum (Eds), Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 377-398
- 164. Havaux M. (1987) Effects of chilling on the redox state of the primary electron acceptor Q_A of photosystem II in chilling-sensitive and resistant plant species. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 735-743
- 165. Havaux M. (1988) Effects of temperature on the transitions between state 1 and state 2 in intact maize leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 245-251
- 166. Havaux M. (1996) Short-term responses of photosystem I to heat stress. Photosynth. Res. 47: 85-97
- 167. Havaux M., Greppin H., Strasser R. J. (1991) Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence or absence of light. *Planta* 186: 88-98
- 168. Havaux M., Lannoye R. (1983) Temperature dependence of delayed chlorophyll fluorescence in intact leaves of higher plants. A rapid method for detecting the phase transition of thylakoid membrane lipids. *Photosynth. Res.* 4: 257-263
- 169. Havaux M., Lannoye R. (1984) Effects of chilling temperatures on prompt and delayed chlorophyll fluorescence in maize and barley leaves. *Photosynthetica* 18: 117-127
- 170. Havaux M., Niyogi K. K. (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8762
- 171. Havaux M., Strasser R. J. (1992a) Antagonistic effects of red and far-red lights on the stability of photosystem II in pea leaves exposed to heat. *Photochem. Photobiol.* 55: 621-624
- 172. Havaux M., Strasser R. J. (1992b) Dynamics of electron transfer within and between PS II reaction center complexes indicated by the light-saturation curve of in vivo variable chlorophyll fluorescence emission. *Photosynth. Res.* 31: 149-156
- 173. Havaux M., Tardy F., Ravenel J., Chand D., Parot P. (1996) Thylakoid membrane stability to heat stress as studied by flash spectroscopic measurements of electrochromic shift in intact potato leaves: Influence of xanthophyll content. *Plant Cell Environ*. 19: 1359-1368

- 174. Haveman J., Lavorel J. (1975) Identification of the 120 μs phase in the decay of delayed fluoerscence in spinach chloroplasts and subchloroplast particles as the intrinsic back reaction. The dependence of the level of this phase on the thylakoids internal pH. *Biochim. Biophys. Acta* 408: 269-283
- 175. Haworth P., Steinback K. E. (1987) Interaction of herbicides and quinone with the Q_B-protein of the diuronresistant *Chlamidomonas reinhardtii* mutant Dr2. *Plant Physiol.* 83: 1027-1031
- 176. Hill R., Bendall F. (1960) Function of the two cytochrome components in chloroplasts, a working hypothesis. *Nature* 186: 136-137
- 177. Hilton H. W., Nomura N. S., Kameda S. S., Yauger W. L. (1976) Some patterns of herbicide and growth regulator intake, persistence, and distribution in sugarcane. *Arch. Envir. Cont. Toxic.* 4: 385-394
- 178. Hiyama T. (1997) Photosystem I: structures and functions. In: M. Pessarakli (Ed), Handbook of Photosynthesis, Marcel Dekker, New York, pp. 195-217
- 179. Hoganson C. W., Babcock G. T. (1997) A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. *Science* 277: 1953-1956
- Holzenburg A., Bewly M. C., Wilson F. H., Nicholson W. V., Ford R. C. (1993) Three-dimensional structure of photosystem II. *Nature* 363: 470-472
- Holzwarth A. R. (1993) Is it time to throw away your apparatus for chlorophyll fluorescence induction? Biophys. J. 64: 1280-1281
- Hope A. B. (1993) The chloroplast cytochrome *bf* complex: A critical focus on function. *Biochim. Biophys.* Acta 1143: 1-22
- 183. Horton P., Hague A. (1988) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts: IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochim. Biophys. Acta* 932: 107-115
- 184. Horton P., Ruban A. V., Walters R. G. (1994) Regulation of light harvesting in green plants: indication by non-photochemical quenching of chlorophyll fluoresence. *Plant. Physiol.* 106: 415-420
- 185. Horton P., Ruban A. V., Wentworth M. (2000) Allosteric regulation of the light harvesting system of photosystem II. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 355: 1361-1370
- 186. Hsu B.-D. (1993) Photosynth. Res. 36: 81-88
- 187. Hsu B.-D., Lee J. Y., Pan R. L. (1986) The two binding sites for DCMU in photosystem II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141: 682-688
- Hsu B.-D., Lee Y. S., Jang J. R. (1989) A method for analysis of fluorescence induction curve from DCMUpoisoned chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 44-49
- Hughes M. A., Dunn M. A. (1996) The molecular biology of plant acclimation at low temperature. J. Exp. Bot. 47: 291-305
- 190. Hulsen K., Minne V., Lootens P., Vandecasteele P., Hofte M. (2002) A chlorophyll fluorescence-based *Lemna minor* bioassay to monitor microbial degradation of nanomolar to micromolar concentrations of linuron. *Environ. Microbiol.* 4: 327-337
- 191. Hundelt M., Haumann M., Junge W. (1997) Cofactor X of photosynthetic water oxidation: electron transfer, proton release and electrogenic behaviour in chloride-depleted Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1321: 47-60
- 192. Iba K. (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 225-245
- 193. Ikeuchi M., Yuasa M., Inoue Y. (1985) Simple and discrete isolation of an O₂-evolving PS II reaction center complex retaining Mn and the extrinsic 33 kDa protein. *FEBS Lett.* 185: 316-322
- 194. Itoh S., Murata N. (1973) Correlation between delayed light emission and fluorescence of chlorophyll *a* in system II particles derived from spinach chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 18: 209-218
- 195. Itoh S., Murata N. (1974) Studies on the induction and decay kinetics of delayed light emission in spinach chloroplasts. In: M. Avron (Ed), Proc. 3rd Int. Congr. Photosynthesis, Elsevier, Amsterdam, pp. 115-126
- 196. Itoh S., Tang X.-S., Satoh K. (1986) Interaction of high-spin Fe atom in the photosystem II reaction center with the quinones Qa and Qb in purified oxygen-evolving PSII reaction center complex and in PSII particles. *FEBS Lett.* 205: 275-281
- 197. Ivanov A. G., Velitchkova M. (1990) Heat-induced changes in the efficiency of P700 photo-oxidation in pea chloroplast membranes. J. Photochem. Photobiol. B-Biol. 4: 307-320
- Jagendorf A. T., Michales A. (1990) Rough thylakoids: translation on photosynthetic membranes. *Plant Sci.* 71: 137-145

- 199. Janssen L. H. J., van Hasselt P. R. (1988) Temperature induced alteration of *in vivo* chlorophyll a fluorescence induction in cucumber as affected by DCMU. *Photosynth. Res.* 15: 153-162
- 200. Jegerschöld C., Styring S. (1996) Spectroscopic characterisation of intermediate steps involved in donor side induced photoinhibition of photosystem II. *Biochemistry* 35: 7794-7801
- 201. Jensen P. E., Madsen K. H., Nielsen S. O., Streibig J. C. (1994) Chlorophyll fluorescence a rapid method for quantification of herbicide effects. New results with amino acid inhibitors. In: S. P. Rapport (Ed), Lyngby, Denmark, pp. 251-260
- 202. Joliot P., Barbieri G., Chabaud R. (1969) Un nouveau modele das centre photochimique du systeme II. *Photochem. Photobiol.* 10: 309-329
- 203. Joliot P., Joliot A., Bouges B., Barbieri G. (1971) Studies of System II photocenters by comparative measurements of luminescence, fluorescence, and oxygen emission. *Photochem. Photobiol.* 14: 287-305
- 204. Joliot P., Kok B. (1975) Oxygen evolution in photosynthesis. In: Govindjee (Ed), Bioenergetics of Photosynthesis, Academic Press, New York, pp. 387-412
- 205. Jordan P., Fromme P., Witt H. T., Klukas O., Saenger W., Krauß N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411: 909-917
- 206. Junge W., Jackson J. B. (1982) In: Govindjee (Ed), Photosynthesis, Vol 1. Academic Press, New York, pp. 589-646
- 207. Jursinic P. A. (1986) Delayed fluorescence: current concepts and status. In: Govindjee, J. Amesz, D. C. Fork (Eds), Light Emission by Plants and Bacteria, Academic Press, Orlando, FL, pp. 291-328
- 208. Jursinic P. A., Mccarthy S. A., Bricker T. M., Stemler A. (1991) Characteristics of two atrazine-binding sites that specifically inhibit photosystem-II function. *Biochim. Biophys. Acta* 1059: 312-322
- 209. Kaniuga Z., Michalski W. (1978) Photosynthetic apparatus in chilling-sensitive plants. II. Changes in free fatty acid composition and photoperoxidation of chloroplasts following cold storage and illumination of leaves in relation to Hill reaction activity. *Planta* 140: 129-136
- 210. Kaniuga Z., Zabel J., Sochanowicz B. (1978) Photosynthetic apparatus in chilling-sensitive plants. III. Contribution of loosely bound manganese to the mechanism of reversible inactivation of Hill reaction activity following cold and dark storage and illumination of leaves. *Planta* 144: 49-56
- 211. Kappen L. (1981) Ecological significance of resistance to high temperature. In: O. L. Lange, P. S. Nobel, B. Osmond, H. Ziegler (Eds), Encyclopedia of Plant Physiology, Vol 12A. Springer, Berlin, pp. 439-474
- 212. Karukstis K. K., Sauer K. (1985) The effects of cation-induced and pH-induced membrane stacking on chlorophyll fluorescence decay kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 806: 374-388
- 213. Kautsky H., Hirsch A. (1931) Neue Versuche zur Kohlensaureassimilation. Naturwissenschaften 19: 964
- 214. Kitajama M., Butler W. L. (1975) Biochim. Biophys. Acta 376: 133-141
- 215. Klem K., Špundová M., Hrabalová H., Nauš J., Váňová M., Masojídek J., Tomek P. (2002) Comparison of chlorophyll fluorescence and whole-plant bioassays of isoproturon. *Weed Res.* 42: 335-341
- 216. Klimov V. V., Krasnovskii A. A. (1981) Pheophytin as a primary electron acceptor in photosystem II reaction centres. *Photosynthetica* 15: 592-609
- 217. Knaff D. B. (1996) Ferredoxin and ferredoxin-dependent enzymes. In: D. R. Ort, C. F. Yocum (Eds), Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 333-361
- 218. Knox R. S., Gulen D. (1993) Theory of polarized fluorescence from molecular pairs: Forster transfer at large electronic coupling. *Photochem. Photobiol.* 57: 40-43
- 219. Knuteson S. L., Whitwell T., Klaine S. J. (2002) Influence of plant age and size on simazine toxicity and uptake. J. Env. Qual. 31: 2096-2103
- 220. Kok B., Forbusch B., McGloin M. (1970) Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution. I. A linear four-step mechanism. *Photochem. Photobiol.* 11: 457-475
- 221. Kramer D. M., Crofts A. R. (1996) Control and Measurement of Photosynthetic Electron Transport in Vivo. In: N. R. Baker (Ed), Photosynthesis and the Environment, Ed 1 Vol 1. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp. 25-66
- 222. Kratsch H. A., Wise R. R. (2000) The ultrastructure of chilling stress. Plant Cell Environ. 23: 337-350
- 223. Krause G. H., Grafflage S., Rumich-Bayer S., Somersalo S. (1988) Effects of freezing on plant mesophyll cells. In: S. F. Long, F. I. Woodward (Eds), Plants and Temperature, Comp.Biol.Ltd., Cambridge, pp. 311-327
- 224. Krause G. H., Weis E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349

- 225. Krieger A., Weis E. (1996) Energy dependent quenching of chlorophyll a fluorescence. The involvement of proton-calcium exchange at photosystem II. *Photosynthetica* 27: 89-98
- 226. Krüger G. H. J., Tsimilli-Michael M., Strasser R. J. (1997) Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves. *Physiol. Plant.* 101: 265-277
- 227. Kuhl H., Rögner M., van Breemen J. F. L., Boekema E. J. (1999) Localization of cyanobacterial photosystem II donor-side subunits by electron microscopy and the supramolecular organization of photosystem II in the thylakoid membrane. *Eur. J. Biochem.* 266: 453-459
- 228. Kühlbrandt W. (1994) Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC-II. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 519-528
- 229. Kühlbrandt W., Wang D. G., Fujiyoshi Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614-621
- 230. Laasch H., Pfister K., Urbach W. (1981) Comparative binding of Photosystem II herbicides to isolated thylakoid membranes and inact green algae. Z. Naturforsch. 36c: 1041-1049
- 231. Larcher W. (1987) Streß bei Pflanzen. Naturwissenschaften 74: 158-167
- Larcher W. (1994) Photosynthesis as a tool for indicating temperature stress events. In: E. D. Schulze, M. M. Caldwell (Eds), Ecophysiology of Photosynthesis, Vol 100. Springer-Verlag, Berlin, pp. 261-277
- 233. Larcher W. (1995) Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. Springer-Verlag, Berlin.
- 234. Larcher W., Wagner J., Thammathaworn A. (1990) Effects of superimposed temperature stress on *in vivo* chlorophyll fluorescence of *Vigna unuiculata* under saline stress. *J. Plant Physiol.* 136: 92-102
- 235. Lavergne G. (1982) Mode of action of 3-(3,4 dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea. Evidence that the inhibitor competes with plastoquinone for binding to a common site on the acceptor side of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 682: 345-353
- 236. Lavorel J. (1959) Induction of fluorescence in quinone-poisoned Chlorella cells. Plant Physiol. 34: 204-209
- 237. Lavorel J. (1969) On a relation between fluorescence and luminescence in photosynthetic systems. *Progr. Photosynth. Res.* 2: 883-898
- 238. Lavorel J. (1975) Luminescence. In: Govindjee (Ed), Bioenergetics of Photosynthesis, Academic Press, London, pp. 223-317
- 239. Lavorel J., Breton J., Lutz M. (1986) Methodological principles of measurement of light emitted by photosynthetic systems. In: Govindjee, J. Amesz, D. C. Fork (Eds), Light Emission by Plants and Bacteria, Academic Press, Orlando, FL, pp. 57-98
- 240. Lavorel J., Etienne A.-L. (1977) In vivo chlorophyll fluorescence. Topics Photosynth. 2: 203-268
- 241. Lazár D. (1999) Chlorophyll a fluorescence induction. Biochim. Biophys. Acta 1412: 1-28
- 242. Lazár D., Brokeš M., Nauš J., Dvořák L. (1998) Mathematical modelling of 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1dimethylurea action in plant leaves. *J. Theor. Biol.* 191: 79-86
- 243. Lazár D., Ilík P. (1997) High temperature induced chlorophyll fluorescence changes in barley leaves. Comparison of the critical temperatures derived from fluorescence induction and fluorescence temperature curves. *Plant Sci.* 124: 159-164
- 244. Lazár D., Nauš J. (1998) Statistical properties of fluorescence induction parameters. *Photosynthetica* 35: 121-127
- 245. Lazár D., Nauš J., Matouskova M., Flasarova M. (1997) Mathematical modeling of changes in chlorophyll fluorescence induction caused by herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 57: 200-210
- 246. Lazár D., Pospíšil P. (1999) Mathematical simulation of chlorophyll *a* fluorescence rise measured with 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea-treated barley leaves at room and high temperatures. *Eur. Biophys. J.* 28: 468-477
- 247. Lazár D., Tomek P., Ilík P., Nauš J. (2001) Determination of the antenna heterogeneity of Photosystem II by direct simultaneous fitting of several fluorescence rise curves measured with DCMU at different light intensities. *Photosynth. Res.* 68: 247-257
- 248. Lee A. G. (2000) Membrane lipids: It's only a phase. Curr. Biol. 10: R377-R380
- 249. Levitt J. (1980) Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York.
- 250. Lichtenthaler H. K. (1968) Plastoglobuli and the fine structure of plastids. Endeavour 27: 144-149
- 251. Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* 143: 350-382

- 252. Lichtenthaler H. K. (1996) Vegetation Stress. G. Fischer Verlag, Stuttgart-Jena.
- 253. Lichtenthaler H. K. (1998) The stress concept in plants: an introduction. Ann. NY Acad. Sci. 851: 187-198
- 254. Lichtenthaler H. K., Lang M., Sowinska M., Heisel F., Miehé J. A. (1996) Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *J. Plant Physiol.* 148: 599-612
- 255. Lichtenthaler H. K., Lang M., Sowinska M., Summ P., Heisel F., Miehé J. A. (1997) Uptake of the herbicide diuron as visualised by the fluorescence imaging technique. *Bot. Acta* 110: 158-163
- 256. Lichtenthaler H. K., Rinderle U. (1988) The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Critical Rev. Anal. Chem.* 19: 29-85
- 257. Lichtenthaler H. K., Wenzel O., Buschmann C., Gitelson A. (1998) Plant stress detection by fluorescence and reflectance. *Ann. NY Acad. Sci.* 851: 271-285
- 258. Lunde C., Jensen P. E., Haldrup A., Knoetzel J., Scheller H. V. (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential of state transitions in plant photosynthesis. *Nature* 408: 613-615
- 259. Lund-Hoie K. (1969) Uptake, translocation, and metabolism of simazine in Norway spruce (*Picea abies*). *Weed Res.* 9: 142-147
- 260. Lyon K. M., Miller K. R. (1985) Crystallization of the light-harvesting chlorophyll *a/b* complex within thylakoid membranes. *J. Cell. Biol.* 100: 1139-1147
- 261. Mäenpää P., Aro E.-M., Somersalo S., Tyystjärvi E. (1988) Rearrangement of the chloroplast thylakoid at chilling temperature in the light. *Plant Physiol.* 87: 762-766
- 262. Malkin S. (1977) Delayed luminescence. In: J. Barber (Ed), Primary Processes of Photosynthesis, Elsevier, Amsterdam, pp. 349-431
- 263. Malkin S., Bilger W., Schreiber U. (1994) The relationship between millisecond luminescence and fluorescence in tobacco leaves during the induction period. *Photosynth. Res.* 39: 57-66
- 264. Malkin S., Charland M., Leblanc R. (1992) A photoacoustic study of water infiltrated leaves. *Photosynth. Res.* 33: 37-50
- 265. Malkin S., Kok B. (1966) Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts. I. Number of components involved in the reaction and quantum yields. *Biochim. Biophys. Acta* 126: 413-432
- 266. Mamedov M., Hayashi H., Murata N. (1993) Effects of glycine betaine and unsaturation of membrane lipids on heat stability of photosynthetic electron-transport, and photophosphorilation reactions in *Synechocystis PCC 6803. Biochim. Biophys. Acta* 1142: 1-5
- 267. Mar T., Brebner J., Roy G. (1975) Induction kinetics of delayed light emission in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 376: 345-353
- 268. Marković D. Z., Kalauzi A., Radenović C. N. (2001) Delayed fluorescence induction transients: mathematical modelling based on the chosen kinetic models. *Gen. Physiol Biophys.* 20: 303-313
- Marković D. Z., Radenović C. N., Rafailovic L., Zerajic S. A., Jeremić M., Marković M. B. (1999) Temperature dependence of delayed fluorescence induction curve transients. *Gen. Physiol Biophys.* 18: 257-267
- 270. Marr K. M., Mastronarde D. M., Lyon M. K. (1996) Two-dimensional crystals of photosystem II: biochemical characterization, cryoelectron microscopy and localization of the D1 and cytochrome b559 polypeptides. J. Cell. Biol. 132: 823-833
- 271. Martindale W., Leegood R. C. (1997) Acclimation of photosynthesis to low temperature in *Spinacia oleracea* L. I. Effects of acclimation on CO₂ assimilation and carbon partitioning. *J. Exp. Bot.* 48: 1865-1872
- 272. Mathis P., Rutherford A. W. (1984) Effect of phenolic herbicides on the oxygen-evolving side of photosystem II. Formation of the carotenoid cation. *Biochim. Biophys. Acta* 767: 217-222
- 273. Matorin D. N., Venediktov P. S., Gostimskii S. A. (1974) Delayed light emission of photosynthetic mutant of Pisum sativus, blocked at Photosystem II. *Stud. Biophys.* 44: 84-92
- 274. McCain D. C., Croxdale J., Markley J. L. (1989) Thermal damage to chloroplast envelope membranes. *Plant Physiol.* 90: 606-609
- 275. McCarty R., Jagendorf A. T. (1965) Chloroplast damage due to hydrolysis of endogenous lipids. *Plant Physiol.* 40: 725-735
- McKersie B. D., Leshem Y. Y. (1994) Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 277. Melis A. (1985) Functional properties of photosystem IIb in spinach chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* 808: 334-342

- 278. Melis A. (1991) Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1058: 87-106
- 279. Melis A. (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo? Trends Plant Sci.* 4: 130-135
- 280. Melis A., Duysens L. N. M. (1979) Photochem. Photobiol. 29: 373-382
- 281. Melis A., Homann P. H. (1976) Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. Photochem. Photobiol. 23: 343-350
- 282. Michel H., Deisenhofer J. (1988) Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. *Biochemistry* 27: 1-7
- 283. Milanov G., Stefanov D., Goltsev V., Batchvarova R. (1997) Changes in the submilli- and millisecond kinetics of dark relaxation of delayed fluorescence in tobacco leaves under conditions of bacterial infection by *Pseudomonas syringae* pv. Tabaci. *Bulg. J. Plant Physiol.* 23: 35-42
- 284. Miller K. R. (1994) The big green machine. Nature Struct. Biol. 1: 204-206
- 285. Minoda A., Sato N., Nozaki H., Okada K., Takahashi H., Sonoike K., Tsuzuki M. (2002) Role of sulfoquinovosyl diacylglycerol for the maintenance of photosystem II in *Chlamidomonas reinhardtii. Eur. J. Biochem.* 269: 2353-2358
- 286. Mishra R. K., Singhal G. S. (1992) Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat stress and its relationship with peroxidation of thylakoid lipids. *Plant Physiol.* 98: 1-6
- 287. Misra A. N., Biswal B. (2000) Thylakoid membrane protein kinase activity as a signal transduction pathway in chloroplasts. *Photosynthetica* 38: 323-332
- Montgomery J. H. (1993) Agrochemical desk reference: Environmental data. Lewis Publishers, Ann Harbor, MI, USA.
- 289. Mooney H. A., Björkman O., Collatz G. J. (1978) Photosynthetic acclimation to temperature in the deser shrub, *Larvea divaricata*. I. Carbon dioxide exchange characteristics of intact leaves. *Plant Physiol*. 61: 406-410
- 290. Morris E. P., Hankamer B., Zheleva D., Friso G., Barber J. (1997) The three-dimensional structure of a photosystem II core complex determined by electron crystallography. *Structure* 5: 837-849
- 291. Morrod R. S. (1976) Effects on plant cell membrane structure and function. In: L. J. Audus (Ed), Herbicides, Vol 1. Academic Press, New York, p. 285
- 292. Moyer J. R., McKercher R. B., Hance R. J. (1972) Influence of adsorption on the uptake of diuron by barley plants. *Can. J. Plant Sci.* 52: 668-670
- 293. Mukohata Y., Yagi T., Nigashida M., Sinozaki K., Matsuno A. (1973) Biophysical studies on subcellular particles. VI. Photosynthetic activity in isolated spinach chloroplasts after transient warming. *Plant Cell Physiol.* 14: 111-118
- 294. Mulkidjanian A., Cherepanov D. A., Haumann M., Junge W. (1996) Photosystem II of green plants: topology of core pigments and redox cofactors as inferred from electrochromic difference spectra. *Biochemistry* 35: 3093-3107
- 295. Muller P., Li X.-P., Niyogi K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125: 1558-1566
- 296. Murata N. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll *a* fluorescence in *Porphytidium cruentum*. *Biochim. Biophys. Acta* 172: 242-251
- 297. Murata N., Miyao M. (1985) Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Trends Biochem. Sci.* 10: 122-124
- 298. Murata N., Troughton J. H., Fork D. C. (1975) Relationships between the transition of the physical phase of membrane lipids and photosynthetic parameters in *Anacystis nidulans* and lettuce and spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 56: 508-517
- Mustárdy L., Janossy A. G. S. (1979) Evidence of helical thylakoid arrangement by scanning electron microscopy. *Plant Sci. Lett.* 16: 281-284
- 300. Nanba O., Satoh K. (1987) Isolation of a Photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome *b*-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 109-112
- 301. Nash D., Miyao M., Murata N. (1985) Heat inactivation of oxygen evolution in Photosystem II particles and its acceleration by chloride depletion and exogenous manganese. *Biochim. Biophys. Acta* 807: 127-133
- 302. Nedbal L., Soukupova J., Kaftan D., Whitmarsh J., Trtilek M. (2000) Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. *Photosynth. Res.* 66: 3-12

- 303. Nelson N., Deters D. W., Nelson H., Racker E. (1973) Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. 8. Properties of isolated subunits of coupling factor 1 from spinach chloroplasts. J. Biol. Chem. 248: 2049-2055
- 304. Neubauer C., Schreiber U. (1987) The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side. *Z. Naturforsch.* 42c: 1246-1254
- 305. Nield J., Orlova E. V., Morris E. P., Gowen B., Vanheel M., Barber J. (2000) 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. *Nature Struct. Biol.* 7: 44-47
- 306. Niyogi K. K. (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333-359
- 307. Niyogi K. K., Shih C., Chow W. S., Pogson B. J., DellaPena D., Björkman O. (2001) Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of Arabidopsis. *Photosynth. Res.* 67: 139-145
- 308. Nuijs A. M., Shuvalov V. A., van Gorkom H. J., Duysens L. N. M. (1986) Picosecond absorbancedifference spectroscopy on the primary reactions and the antenna-excited states in photosystem I particles. *Biophys. Biochim. Acta* 850: 310-318
- 309. Nussberger S., Dorr K., Wang D. N., Kühlbrandt W. (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J. Mol. Biol.* 234: 347-356
- 310. Oechel W. C. (1976) Seasonal patterns of temperature response of CO₂ flux and acclimation in arctic mosses growing in situ. *Photosynthetica* 10: 447-456
- 311. Oettmeier W. (1992) Herbicides of photosystem II. In: J. Barber (Ed), The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology, Elsevier, Amsterdam, pp. 349-408
- 312. Oettmeier W. (1999) Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cell Mol. Life Sci.* 55: 1255-1277
- Oettmeier W., Kude C., Soll H. J. (1987) Phenolic herbicides and their methylethers: binding characteristics and inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 27: 50-60
- 314. Oettmeier W., Masson K. (1980) Synthesis and thylakoid membrane binding of the radioactively labeled herbicide dinoseb. *Pestic. Biochem. Physiol.* 14: 86-97
- Oettmeier W., Masson K., Johanningmeier U. (1980) Photoaffinity labelling of the Photosystem II herbicide binding protein. FEBS Lett. 118: 267-270
- 316. Ögren E. (1988) Planta 175: 229-236
- 317. Omasa K., Shimazaki K.-I., Aiga I., Larcher W., Onoe M. (1987) Image analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves. *Plant Physiol.* 84: 748-752
- 318. Osmond C. B., Austin M. P., Berry J. A., Billings W. D., Boyer J. S., Dacey J. W. H., Nobel P. S., Smith S. D., Winnner W. E. (1987) Stress physiology and the distribution of plants. *Bioscience* 37: 38-48
- 319. Palva E. T., Tahtiharju S., Tamminen I., Puhakainen T., Laitinen R., Svensson J., Helenius E., Heino P. (2002) Biological mechanisms of low temperature stress response: Cold acclimation and development of freezing tolerance in plants. *JIRCAS Working Report* 9-15
- 320. Paolillo D. J. (1970) The three-dimensional arrangement of intergranal lamellae in chloroplasts. *J. Cell. Sci.* 6: 243-255
- 321. Park Y.-I., Chow W. S., Anderson J. M. (1995) Light inactivation of functional photosystem II in leaves of peas grown in moderate light depends on photon exposure. *Planta* 196: 401-411
- 322. Pastenes C., Horton P. (1996) Effect of high temperature on photosynthesis in beans. *Plant Physiol.* 112: 1245-1251
- 323. Paulsen H., Rumler U., Rudiger W. (1990) Reconstitution of pigment-containing complexes from lightharvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* 181: 204-211
- 324. Pessarakli M. (1999) Handbook of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker, New York.
- 325. Peter G. F., Thornber J. P. (1991) Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 16745-16754
- 326. Pfister K., Arntzen C. J. (1979) The mode of action of Photosystem II-specific inhibitors in herbicideresistant weed biotypes. Z. Naturforsch. 34: 996-1009

- 327. Pfister K., Schreiber U. (1984) Comparison of diuron- and phenol-type inhibitors: additional inhibitory action at the photosystem II donor side. Z. Naturforsch. 39c: 389-392
- 328. Pfister K., Steinback K. K., Gardner G., Arntzen C. J. (1981) Photoaffinity labelling of a herbicide receptor in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 981-985
- 329. Plumley F. G., Schmidt G. W. (1987) Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 146-150
- 330. Pospíšil P., Dau H. (2002) Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients. *Biochim. Biophys. Acta* 1554: 94-100
- 331. Pospíšil P., Skotnica J., Nauš J. (1998) Low and high temperature dependence of minimum F₀ and maximum F_m chlorophyll fluorescence in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1998: 95-99
- 332. Pospíšil P., Tyystjärvi E. (1999) Molecular mechanism of high-temperature-induced inhibition of acceptor side of Photosystem II. *Photosynth. Res.* 62: 55-66
- 333. Quinn P. J., Williams W. P. (1985) Environmentally induced changes in chloroplast membranes and their effects on photosynthetic function. In: J. Barber, N. R. Baker (Eds), Photosynthetic Mechanism and the Environment, Vol 6. Elsevier Science Publisher, The Netherlands, pp. 1-47
- 334. Radenović C. N., Marković D. Z., Jeremić M. (1994) Delayed chlorophyll fluorescence in plant models. Photosynthetica 30: 1-24
- 335. Radosevich S. R. (1977) Mechanism of atrazine resistance in lambsquarters and pigweed. Weed Sci. 25: 316-318
- 336. Raison J. K., Roberts J. K. M., Berry J. A. (1982) Correlation between the thermal stability of chloroplast (thylakoid) membranes and the composition and fluidity of their polar lipids upon acclimation of the higher plant *Nerium oleander* to growth temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 688: 218-228
- 337. Rappaport F., Lavergne J. (1991) Proton release during successive oxidation steps of the photosynthetic water oxidation process: stoichimetries and pH dependence. *Biochemistry* 30: 10004-10012
- 338. Regitz G., Ohad I. (1976) Trypsin-sensitive photosynthetic activities in chloroplast membranes from Chlamydomonas reinhardtii, y-1. J. Biol. Chem. 251: 247-252
- 339. Renger G. (1986) Herbicide interation with Photosystem II: recent developments. Physiol. Veg. 24: 509-521
- 340. Renger G. (2001) Photosynthetic water oxidation to molecular oxygen: apparatus and mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1503: 210-228
- 341. Rhee K.-H. (2001) Photosystem II: the solid structural era. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 30: 307-328
- 342. Rhee K.-H., Morris E. P., Barber J., Kühlbrandt W. (1998) Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 angstrom resolution. *Nature* 396: 283-286
- 343. Roelofs T. A., Lee C.-H., Holzwarth A. R. (1992) Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetics from pea chloroplasts. *Biophys. J.* 61: 1147-1163
- 344. Ruban A. V., Horton P. (1999) The xanthophyll cycle modulates the kinetics of nonphotochemical energy dissipation in isolated light- harvesting complexes, intact chloroplasts, and leaves of spinach. *Plant Physiol.* 119: 531-542
- 345. Ruban A. V., Philip D., Young A. J., Horton P. (1997) Carotenoid dependent oligomerisation of the major Chla/b light harvesting complex of photosystem II of plants. *Biochemistry* 36: 7855-7859
- 346. Ruffle S. V., Donnelly D., Blundel T. L., Nugent J. H. A. (1992) A three-dimensional model of he Photosystem II reaction centre of *Pisum sativum*. *Photosynth. Res.* 34: 287-300
- 347. Ruth B. (1996) Effect of PS II-herbicides on algae grown in pond and measured by the 10 ms resolved chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Arch. Hydrobiol.* 136: 1-17
- 348. Rutherford A. W., Inoue Y. (1984) Oscillation of delayed luminescence from PS II: recombination of $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$. *FEBS Lett.* 165: 163-170
- 349. Rutherford A. W., Zimmermann J. L., Mathis P. (1984) The effect of herbicides on components of the PS II reaction centre measured by EPR. *FEBS Lett.* 165: 156-162
- 350. Sabat S. C., Mohanty N., Mohanty P. (1986) Heat induced alteration in electron donation site(s) of ascorbate and ascorbate-reduced catechol in the electron transport chain of *Amaranthus* chloroplasts. *Indian J. Biochem. Biophys.* 23: 266-269
- 351. Sachs M. M., Ho T. H. D. (1986) Alteration of gene expression during environmental stress in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 363-376
- 352. Sakamoto A., Murata N. (2002) The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environ*. 25: 163-171

- 353. Santarius K. A. (1980) Membrane lipids in heat injury of spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.* 49: 1-6
- 354. Santini C., Tidu V., Tognon G., Ghiretti Magaldi A., Bassi R. (1994) Three-dimensional organization of the higher plant photosystem II reaction centre and evidence for its dimeric organization *in vivo*. Eur. J. Biochem. 221: 307-315
- 355. Satoh K. (1996) Introduction to the Photosystem II reaction center isolation and biochemical and biophysical characterization. In: D. R. Ort, C. F. Yocum (Eds), Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 193-211
- 356. Satoh K., Katoh S. (1983) Induction kinetics of millisecond-delayed luminescence in intact *Bryopsis* chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 24: 953-962
- 357. Schatz G. H., Brock H., Holzwarth A. R. (1988) A kinetic and energetic model for the primary processes in photosystem II. *Biophys. J.* 54: 397-405
- 358. Schatz G. H., Witt H. T. (1984) Characteristics of electron transport in oxygen evolving Photosystem II complexes from a thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Photobiochem. Photobiophys.* 7: 77-89
- 359. Schlodder E., Brettel K. (1988) Primary charge separation in closed photosystem II with a lifetime of 11 ns. Flash absorption spectroscopy with oxygen evolving photosystem II complexes from *Synechococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* 933: 22-34
- 360. Schoepp B., Brugna M., Lebrun E., Nitschke W. (1999) Iron-sulfur centers involved in photosynthetic light reactions. *Adv. Inorg. Chem.* 47: 335-360
- 361. Schreiber U., Armond P. A. (1978) Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and related heat-damage at the pigment level. *Biochim. Biophys. Acta* 502: 138-151
- 362. Schreiber U., Berry J. (1977) Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. *Planta* 136: 233-238
- 363. Schreiber U., Bilger W., Hormann H., Neubauer C. (2000) Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: A. S. Raghavendra (Ed), Photosynthesis: A Comprehensive Treatise, Cambridge University Press, UK, pp. 320-336
- 364. Schreiber U., Neubauer C. (1987) The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: II Partial control by Photosystem II donor side and possible ways of interpretation. *Z. Naturforsch.* 42c: 1255-1264
- 365. Schreiber U., Neubauer C. (1990) O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 25: 279-293
- 366. Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10: 51-62
- 367. Schubert W. D., Klukas O., Krauß N., Saenger W., Fromme P., Witt. H. T. (1997) Photosystem I of Synechococcus elongatus at 4 Å resolution: Comprehensive structure analysis. J. Mol. Biol. 272: 741-769
- 368. Scoufflaire C., Lannoye R., Barber J. (1982) Photobiochem. Photobiophys. 4: 249-256
- 369. Seaton G. R., Walker D. A. (1990) Measuring photosynthesis by measuring fluorescence. In: S. Malkin (Ed), Trends in Photosynthesis Research, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 234-245
- 370. Seefeldt S. S., Jensen J. E., Fuerst E. P. (1995) Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technol.* 9: 218-227
- 371. Selye H. (1936) A syndrome produced by various nucuous agents. Nature 138: 32-34
- Senge M. O. (1993) Recent advances in the biosynthesis and chemistry of the chlorophylls. *Photochem. Photobiol.* 57: 189-206
- 373. Sestak Z. (1977) Photosynthetic characterics during ontogenesis of leaves 2: Photosystems, components of electron transport chain, and photophosphorylation. *Photosynthetica* 11: 449-474
- 374. Shen J. R., Terashima I., Katoh S. (1990) Cause for dark, chilling-induced inactivation of photosynthetic oxygen-evolving system in cucumber leaves. *Plant Physiol.* 93: 1354-1357
- 375. Shen J.-R., Inoue Y. (1993) Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome c-550 and a 12-kDa protein cyanobacterial photosystem II. *Biochemistry* 32: 1825-1832
- 376. Shinkarev V. P., Govindjee (1993) Insight into the relationship of chlorophyll *a* fluorescence yield to the oncentration of its natural quenchers in oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7466-7469
- 377. Simidjiev I., Stoylova S., Amenitsch H., Mustárdy L., Laggner P., Holzenburg A., Garab G. (2000) Selfassembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1473-1476

- 378. Sinclair J., Spence S. (1988) The analysis of fluorescence induction transients from dichlorophenyldimethylurea-poisoned chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 935: 184-194
- 379. Slatyer R. O., Morrow P. A. (1977) Altitudinal variation in the photosynthetic characteristics of snow gum, *Eucalyptus pauciflora* Sieb. ex Spreng. I. Seasonal changes under field conditions in the Snowy Mountains area of South-eastern Australia. *Aust. J. Bot.* 25: 1-20
- 380. Smirnoff N. (1998) Plant resistance to environmental stress. Curr. Opin. Biotechnol. 9: 214-219
- Smith C. N., Nalewaja J. D. (1972) Uptake and translocation of foliarly-applied atrazine. Weed Sci. 20: 36-40
- 382. Srivastava A., Strasser R. J. (1995) How do land plants respond to stress temperature and stress light? *Arch. Sci. Geneve* 48: 135-146
- 383. Srivastava A., Strasser R. J. (1996) Stress and stress management of land plants during a regular day. J. *Plant Physiol.* 148: 445-455
- 384. Srivastava A., Strasser R. J., Govindjee (1999) Greening of peas: parallel measurements of 77K emission spectra, OJIP chlorophyll a fluorescence transients, period four oscillation of initial fluorescence level, delayed light emission, and P700. *Photosynthetica* 37: 365-392
- 385. Staehelin L. A., van der Staay G. W. M. (1996) Structure, composition, functional organization and dynamic properties of thylakoid membranes. In: D. R. Ort, C. F. Yocum (Eds), Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 11-30
- 386. Stewart D. H., Brudvig G. W. (1998) Cytochrome b(559) of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta 1367: 63-87
- 387. Stirbet A., Govindjee, Strasser B. J., Strasser R. J. (1998) Chlorophyll a flurescence induction in higher plants: Modelling and numerical simulation. *J. Theor. Biol.* 193: 131-151
- 388. Stirbet A., Strasser R. J. (1995) Numerical simulation of the fluorescence induction in plants. Arch. Sci. Geneve 48: 41-60
- 389. Stitt M., Hurry V. (2002) A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis. Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 199-206
- 390. Stock D., Leslie A. G. W., Walker J. E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286: 1700-1705
- 391. Stoylova S., Flint T. D., Ford R. C., Holzenburg A. (2000) Structural analysis of photosystem II in far-redlight- adapted thylakoid membranes - New crystal forms provide evidence for a dynamic reorganization of light-harvesting antennae subunits. *Eur. J. Biochem.* 267: 207-215
- 392. Stoylova S., Flint T. D., Kitmitto A., Ford R. C., Holzenburg A. (1998) Comparison of photosystem II 3d structure as determined by electron crystallography of frozen-hydrated and negatively stained specimens. *Micron.* 29: 341-348
- 393. Strain B. R., Higginbotham K. O., Mulroy J. C. (1976) Temperature preconditioning and photosynthetic capacity of *Pinus taeda* L. *Photosynthetica* 10: 47-53
- 394. Strasser B. J., Strasser R. J. (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test. In: P. Mathis (Ed), Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 977-980
- 395. Strasser R. J. (1988) A concept for stress and its application in remote sensing. In: H. K. Lichtenthaler (Ed), Application of Chlorophyll Fluorescence, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 333-337
- 396. Strasser R. J., Govindjee (1992) On the O-J-I-P fluorescence transient in leaves and D1 mutants of *Chlamidomonas reinhardtii*. In: N. Murata (Ed), Research in Photosynthesis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 29-32
- 397. Strasser R. J., Srivastava A., Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll *a* fluorescent transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61: 32-42
- 398. Strasser R. J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: P. Mohanty, Yunus, Pathre (Eds), Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation & Adaptation, Taylor & Francis, London, pp. 443-480
- 399. Strasser R. J., Tsimilli-Michael M. (2001) Structure function relationship in the potosynthetic apparatus: a biophysical approach. In: P. Saradhi (Ed), Biophysical Processes In Living Systems, Science Publishers, Inc., Enfield, NH, pp. 271-303
- 400. Strehler B. L., Arnold W. A. (1951) Light production by green plants. J. Gen. Physiol. 34: 809-820
- 401. Streibig J. C. (1988) Herbicide bioassay. Weed Res. 28: 479-484

- 402. Sundby C., Andersson B. (1985) Temperature-induced reversible migration along the thylakoid membrane of photosystem II regulated its association with LHC-II. *FEBS Lett.* 191: 24-28
- 403. Sundby C., Larsson C. (1985) Transbilayer organization of the thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 813: 61-67
- 404. Sundby C., Melis A., Mäenpää P., Andersson B. (1986) Temperature-dependent changes in the antenna size of Photosystem II. Reversible conversion of Photosystem II_{α} to Photosystem II_{β}. *Biochim. Biophys. Acta* 851: 475-483
- 405. Süss K.-H., Arkona C., Manteufell R., Adler K. (1993) Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5514-5518
- 406. Süss K.-H., Yordanov I. T. (1986) Biosynthetic cause of *in vivo* acquired thermotolerance of photosynthetic light reactions and metabolic responses of chloroplasts to heat stress. *Plant Physiol.* 81: 192-199
- 407. Svensson B., Etchebest C., Tuffery P., van Kan P., Smith J., Styring S. (1996) A model for the Photosystem II reaction center core including the structure of the primary donor P-680. *Biochemistry* 35: 14486-14502
- 408. Takeuchi T. S., Thornber J. P. (1994) Heat-induced alterations in thylakoid membrane protein composition in barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 759-770
- 409. Thomas P. G., Quinn P. J., Williams W. P. (1986) The origin of photosystem-I-mediated electron transport stimulation in heat-stressed chloroplasts. *Planta* 167: 133-139
- 410. Thompson L., Slife F. W., Butler H. S. (1970) Environmental influence on the tolerance of corn to atrazine. *Weed Sci.* 18: 349-351
- 411. Thorne S. W., Duniec J. T. (1983) The physical principles of energy transduction in chloroplast thylakoid membranes. *Q. Rev. Biophys.* 16: 197-278
- 412. Tietjen K. G., Kluth J. F., Andree R., Haug M., Linding M., Muller K. H. (1990) The herbicide binding niche of photosystem II a model. *Pest. Sci.* 31: 6–72
- 413. Tischer W., Strotmann H. (1977) Relationship between inhibitor binding by chloroplasts and inhibition of photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 460: 113-125
- 414. Tischer W., Strotmann H. (1979) Some properties of the DCMU-binding site in chloroplasts. Z. Naturforsch. 34c: 992-995
- 415. Tomek P., Lazár D., Ilík P., Nauš J. (2001) On the intermediate steps between the O and the P steps in chlorophyll *a* fluorescence rise measured at different intensities of exciting light. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 1151-1160
- 416. Tommos C., Babcock G. T. (1998) Oxygen production in nature: a light-driven metalloradical enzyme process. *Acc. Chem. Res.* 31: 18-25
- 417. Trebst A. (1979) Inhibition of photosynthetic electron flow by phenol and diphenylether herbicides in control and trypsin-treated chloroplasts. Z. Naturforsch. 34c: 986-991
- 418. Trebst A. (1986) The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of Photosystem II in the thylakoid membrane. Z. Naturforsch. 41c: 240-245
- 419. Trebst A. (1987) The three-dimenstional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II. Z. Naturforsch. 42c: 742-750
- 420. Trebst A. (1996) The molecular basis of plant resistance to photosystem II herbicides. In: T. M. Brown (Ed), Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 44-51
- 421. Trebst A., Depka B., Ridley S. M., Hawkins A. F. (1985) Inhibition of photosynthetic electron transport by halogenated 4-hydroxy-pyridines. Z. Naturforsch. 40c: 391-399
- 422. Trebst A., Draber W. (1979) In: H. Geissbuhler (Ed), Advances in Pesticide Science, Vol 2. Pergamon Press, Oxford, pp. 223-234
- 423. Trissl H.-W., Gao Y., Wulf K. (1993) Theoretical fluorescence induction curves derived from coupled differential equations describing the primary photochemistry of photosystem II by an exciton/radical pair equilibrium. *Biophys. J.* 64: 984-998
- 424. Trissl H.-W., Wilhelm C. (1993) Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks? *Trends Biochem. Sci.* 18: 415-419
- 425. Tsimilli-Michael M., Krüger G. H. J., Strasser R. J. (1996) About the perpetual state changes in plants approaching harmony with their environment. *Arch. Sci. Geneve* 49: 173-203
- 426. Tsiotis G., Psylinakis M., Woplensinger B., Lustig A., Engel A., Ghanotakis D. (1999) Investigation of the structure of spinach photosystem II reaction center complex. *Eur. J. Biochem.* 259: 320-324

- 427. Tsiotis G., Walz T., Spyridaky A., Lustig A., Engel A., Ghanotakis D. (1996) Tubular crystals of a photosystem II core complex. J. Mol. Biol. 259: 241-248
- 428. Turzo K., Laczko G., Filus Z., Maroti P. (2000) Quinone-dependent delayed fluorescence from the reaction center of photosynthetic bacteria. *Biophys. J.* 79: 14-25
- 429. Turzo K., Laczko G., Maroti P. (1998) Delayed fluorescence study on p(*)q(a)->p(+)q(a)(-) charge separation energetics linked to protons and salt in reaction centers from rhodobacter sphaeroides. *Photosynth. Res.* 55: 235-240
- 430. Tyystjärvi E., Aro E.-M. (1996) The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly proportional to light intensity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2213-2218
- 431. van Armerongen H., van Grondelle R., Valkuas L. (2000) Photosynthetic Excitons. World Scientific, London.
- 432. van Gorkom H. J., Donze M. (1973) Charge accumulation in the reaction center of photosystem 2. *Photochem. Photobiol.* 17: 333-342
- 433. van Gorkom H. J., Pulles M. P. J., Haveman J., den Haan G. A. (1976) Primary reactions of photosystem II at low pH. I. Prompt and delayed fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 423: 217-226
- 434. van Grondelle R., Amesz J. (1986) Excitation energy transfer in photosynthetic systems. In: Govindjee, J. Amesz, D. C. Fork (Eds), Light Emission by Plants and Bacteria, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 191-223
- 435. van Grondelle R., Dekker J., Gillbro T., Sundstrom V. (1994) Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochemistry* 1187: 1-65
- 436. van Rensen J. J. S. (1982) Molecular mechanisms of herbicide action near photosystem II. *Physiol. Plant.* 54: 515-521
- 437. van Rensen J. J. S., Rodrigues G. C., Vredenberg W. J. (2001) Analysis of electron flow around photosystem II in atrazine-resistant plants applying the three-state energy trapping model on the OJIP fluorescence induction curve. Proc. 12th Int. Congr. Photosynthesis, CSIRO Publishing, Colingwood,
- 438. van Rensen J. J. S., Xu C. H., Govindjee (1999) Role of bicarbonate in photosystem II, the waterplastoquinone oxido-reductase of plant photosynthesis. *Physiol. Plant.* 105: 585-286
- 439. Vani B., Pardha Saradhi P., Mohanty P. (2001) Characterization of temperature induced stress impairments in thylakoids of rice seedlings. *Indian J. Biochem. Biophys.* 38: 220-229
- 440. Vasil'ev I. R., Matorin D. N., Lyadsky V. V., Venediktov P. S. (1988) Multiple action sites for photosystem II herbicides as revealed by delayed fluorescence. *Photosynth. Res.* 15: 33-39
- 441. Vasil'ev I. R., Venediktov P. S. (1993) Effects of pH and chemicals affecting polypeptide conformation on inhibition of reducing and oxidizing sides of photosystem 2 by DCMU in pea chloroplasts. *Photosynthetica* 29: 595-602
- 442. Vasil'ev S., Orth P., Zouni A., Owens T. G., Bruce D. (2001) Excited-state dynamics in photosystem II: Insights from the X-ray crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8602-8607
- 443. Vass I., Styring S., Hundahl T., Koivuniemi A., Aro E.-M., Andersson B. (1992) Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of Photosystem II: Stable reduced Q\subA\sub species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1408-1412
- 444. Velitchkova M., Ivanov A. G., Christov A. M. (1989) Ultrastructural and fluorescence properties of granal and stromal membranes of pea chloroplasts exposed to heat stress. *Photosynthetica* 23: 360-363
- 445. Velthuys B. R. (1981) Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II. *FEBS Lett.* 126: 277-281
- 446. Venediktov P. S., Goltsev V. N., Shinkarev V. P. (1980) The influence of the electric diffusion potential on delayed fluorescence light curves of chloroplasts treated with 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. *Biochim. Biophys. Acta* 593: 125-132
- 447. Vermaas W. F. J., Arntzen C. J., Gu L. Q., Uy C. A. (1983) Interactions of herbicides and azidoquinones at a photosystem II binding site in the thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 723: 266-275
- 448. Vermaas W. F. J., Renger G., Dohnt G. (1984) The reduction of the oxygen-evolving system in chloroplasts by thylakoid components. *Biochim. Biophys. Acta* 1273: 1-3
- 449. Vernotte C., Etienne A. L., Briantais J.-M. (1979) Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool. *Biochim. Biophys. Acta* 545: 519-527
- 450. Vostral H. J., Buchholtz K. P., Kust C. A. (1970) Effect of root temperature on absorption and translocation of atrazine in soybeans. *Weed Sci.* 18: 115-117

- 451. Vredenberg W. J. (2000) A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination. *Biophys. J.* 79: 26-38
- 452. Vredenberg W. J., Bulychev A. A. (2002) Photo-electrochemical control of photosystem II chlorophyll fluorescence in vivo. *Bioelectrochemistry* 57: 123-128
- 453. Wakabayashi K., Böger P. (2002) Target sites for herbicides: entering the 21st century. *Pest. Manag. Sci.* 58: 1149-1154
- 454. Webb M. S., Green B. R. (1991) Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1060: 133-158
- 455. Weis E. (1985) Light- and temperature-induced changes in the distribution of excitation energy between photosystem I and photosystem II in spinach leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 807: 118-126
- 456. Wessels J. S. C., van der Veen R. (1956) The action of some derivatives of phenylurethan and of 3-phenyl-1,1-dimethylurea on the Hill reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 19: 548-549
- 457. Whatley F. R., Arnon D. I. (1963) Photosynthetic phosphorylation in plants. In: S. P. Colowick, N. O. Caplan (Eds), Methods in Enzymology, Vol 6. Academic Press, London, pp. 308-320
- 458. Whitmarsh J., Govindjee (1999) The photosynthetic process. In: G. S. Singhal, R. Renger, S. K. Sopory, K. D. Irrgang (Eds), Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis, Narosa Publishing House, New Delhi, pp. 11-50
- 459. Wiest S. C. (1986) Kinetic and proteolytic identification of heat-induced conformational changes in the urea herbicide binding site of isolated *Phaseolus vulgaris* chloroplast thylakoids. *Physiol. Plant.* 66: 527
- 460. Wilson K. B., Baldocchi D. D., Hanson P. J. (2000) Quantifying stomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilation resulting from leaf aging and drought in mature deciduous tree species. *Tree Physiol.* 20: 787-797
- 461. Witt H. T. (1996) Primary Reactions of Oxygenic Photosynthesis. Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 12: 1923-1942
- 462. Wollman F.-A. (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.* 20: 3623-3630
- 463. Wraight C. A., Crofts A. R. (1971) Delayed fluorescence and high-energy state of chloroplasts. Eur. J. Biochem. 19: 386-397
- 464. Xia D., Yu C. A., Kim H., Xian J. Z., Kachurin A. M., Zhang L., Yu L., Deisenhofer J. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277: 60-66
- 465. Xiong J., Subramaniam S., Govindjee (1996) Modeling of the D1/D2 proteins and cofactors of the Photosystem II reaction center: Implications to herbicide and bicarbonate binding. *Protein Sci.* 5: 2054-2073
- 466. Xiong J., Subramaniam S., Govindjee (1998) A knowledge-based three dimensional model of the Photosystem II reaction center of *Chlamidomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* 56: 229-254
- 467. Yaakoubd B., Andersen R., Desjardins Y., Samson G. (2002) Contributions of the free oxidized and Qbbound plastoquinone molecules to the thermal phases of chlorophyll-*a* fluorescence. *Photosynth. Res.* 74: 251-257
- 468. Yachandra V. K., Derose V. J., Latimer M. J., Mukerji I., Sauer K., Klein M. P. (1993) Where plants make oxygen - A structural model for the photosynthetic oxygen-evolving manganese cluster. *Science* 260: 675-679
- 469. Yamamoto Y. (2001) Quality control of Photosystem II. Plant Cell Physiol. 121-128
- 470. Yamane Y., Kashino Y., Koike H., Satoh K. (1997) Increases in the fluorescence Fo level and reversible inhibition of Photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants. *Photosynth. Res.* 52: 57-64
- 471. Yamane Y., Kashino Y., Koike H., Satoh K. (1998) Effects of high temperatures on the photosynthetic systems in spinach: Oxygen-evolving activities, fluorescence characteristics and the denaturation process. *Photosynth. Res.* 57: 51-59
- 472. Yamane Y., Shikanai T., Kashino Y., Koike H., Satoh K. (2000) Reduction of Q_A in the dark: Another cause of fluorescence F_o increases by high temperatures in higher plants. *Photosynth. Res.* 63: 23-34
- 473. Yamashita T., Butler W. L. (1968) Inhibition of chloroplasts by UV irradiation and heat treatment. *Plant Physiol.* 43: 2037-2040
- 474. Yordanov I. (1992) Response of photosynthetic apparatus to temperature stress and molecular mechanisms of its adaptations. *Photosynthetica* 26: 517-531

- 475. Yordanov I., Dilova S., Petkova R., Pangelova T., Goltsev V., Süss K.-H. (1986) Mechanisms of the temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus. *Photobiochem. Photobiophys.* 12: 147-155
- 476. Yordanov I., Goltsev V., Doltchinkova V., Kruleva L. (1989) Effect of some polyamines on the functional activity of thylakoid membranes. *Photosynthetica* 23: 314-323
- 477. Yordanov I., Weis E. (1984) The influence of leaf-aging on the heat-sensitivity and heat-hardening of the photosynthetic apparatus in *Phaseolus vulgraris*. Z. Pflanzenphysiol. 113: 383-393
- 478. Zaharieva I., Goltsev V. (2003) Advances on Photosystem II investigation by measurement of delayed chlorophyll fluorescence by a phosphoroscopic method. *Photochem. Photobiol.* 77: 292-298
- 479. Zaharieva I., Taneva S. G., Goltsev V. (1999) Effect of PSII antennae size on the induction kinetics of prompt and delayed chlorophyll fluorescence. *Bulg. J. Plant Physiol.* 25: 17-30
- 480. Zaharieva I., Taneva S. G., Goltsev V. (2001) Effect of temperature on the luminescent characteristics in leaves of *Arabidopsis* mutants with decreased unsaturation of the membrane lipids . *Bulg. J. Plant Physiol.* 27: 3-19
- 481. Zer H., Prasil O., Ohad I. (1994) Role of plastoquinol oxidoreduction in regulation of photochemical reaction center II D1 protein turnover in vivo. *J. Biol. Chem.* 269: 17670-17676
- 482. Zima J., Sestak Z. (1979) Photosynthetic characterics during ontogenesis of leaves 4: Carbon fixation pathways, their enzymes and products. *Photosynthetica* 13: 83-106
- 483. Zito F., Finazzi G., Delosme R., Nitschke W., Picot D., Wollman F.-A. (1999) The Qo site of cytochrome $b_0 f$ complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO J.* 18: 2961-2969
- 484. Zouni A., Witt H. T., Kern J., Fromme P., Kraus N., Saenger W., Orth P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* 409: 793-743
- 485. Бухов Н. Г., Джибладзе Т. Г., Карапетян Н. В. (1987) Влияние последействия высоких температур на кинетику переменной и замедленной флуоресценций листьев. *Физиология растений* 34: 435-444
- 486. Бухов Н. Г., Рахимбердиева М. Г., Карапетян Н. В. (1989) О природе медленных переходных явлений переменной и замедленной флуоресценции листьев. *Физиология растений* 36: 1045-1055
- 487. Веселовский, В., Веселова, Т. Люминесценция растении. 1990. Москва, Наука.
- 488. Гаевский Н. А., Моргун В. Н. (1993) Использование переменной и замедленной флуоресценции хлорофилла для изучения фотосинтеза растений. *Физиология растений* 40: 136-145
- 489. Гольдфельд М. Г., Микоян В. Д., Сускина В. И., Тимофеев В. П., Шапиро А. Б. (1980) Температурная зависимость скорости реакции Хилла и структуро-кинетические корреляции в хлоропластах. Физиология растений 27: 1143-1153
- 490. Гольцев В. (1979) Исследование механизма замедленной флуоресценции реакционных центров фотосистемы II. Дисс.канд.биол.наук. МГУ.
- 491. Климов С. В. (1988) Корреляция между ассимиляцией СО₂ и замедленной флуоресценцией при их одновременной регистрации с поверхности листа. *Физиология растений* 35: 31
- 492. Ковалев Ю. В., Красновский А. А. (1980) Исследование спектров замедленной люминесценции хлорофилла в клетках фотосинтезирующих водораслей. *Биол. науки* 1: 38-43
- 493. Литвин Ф. Ф., Шувалов В. А. (1966) Изучение фотосинтетических пигментных систем по спектрам излучения и спектрам возбуждения хемилюминесценции хлорофилла в высших растениях. Биохимия 31: 1264-1269
- 494. Моргун В. Н., Должиков С. В. (1990) О природе световой зависимости миллисекундной замедленной флуоресценции растений. *Физиология растений* 37: 1072-1079
- 495. Полевой В. В. (1989) Физиология растений. Высшая школа, Москва.
- 496. Христов И. К., Стефанов Д., Гольцев В. Н., Абрашева П. (2001) Влияние вирусов короткоузлия и стеблевой оспы на фотосинтетическую активность растений винограда выращенных *in vitro*. *Физиология растений* 48: 551-555