

Modulowany pomiar parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu

Zbudzenie cząsteczek chlorofilu może być wygaszane na drodze reakcji fotochemicznych (qP), wydzielania ciepła i wskutek fluorescencji chlorofilu (FL). Przy zahamowanych procesach fotochemicznych (warunki stresu roślin) wydajność fluorescencji zwykle wzrasta.

Aparat do pomiaru FL Teaching – PAM firmy Walz pracuje w czterech systemach pozwalających na pomiar różnych parametrów związanych z funkcjonowaniem głównie fotosystemu PS II.

1. System podstawowy (Basic Mode)

W tym systemie mogą być mierzone następujące parametry:

- ✓ F_0 – minimalna wydajność FL po adaptacji w ciemności i oświetleniu słabym światłem pomiarowym (L). W tym stanie wszystkie centra reakcji PS II są „otwarte” a pula plastochinonu całkowicie utleniona. Parametr ten stanowi wskaźnik strat energii wzbudzenia, czyli miara absorpcji energii przez cząsteczki chlorofilu nie związane funkcjonalnie z centrami reakcji.
- ✓ F_m – maksymalna wydajność FL po adaptacji w ciemności indukowana przez impuls światła wysycającego (SP). W tym stanie wszystkie centra reakcji PS II są „zamknięte” a pula plastochinonu całkowicie zredukowana.
- ✓ F_v – zmienna wartość $FL = F_m - F_0$
- ✓ $F_v/F_m = F_m - F_0/F_m$ – wartość tego parametru jest związana z maksymalną wydajnością PS II po adaptacji w ciemności. Wartość tego parametru dla prawidłowo funkcjonujących fotosystemów wynosi od 0,77 – 0,83. Obniżenie wartości tego wskaźnika związane jest z warunkami stresowymi.
- ✓ F_m' – maksymalna wydajność FL po oświetleniu liścia impulsem światła SP. Zwykle wartości F_m' są niższe niż F_m , ponieważ na świetle zachodzi konwersja zaabsorbowanej energii w różne formy wygaszania niefotochemicznego (np. ciepło).
- ✓ F_t – fluorescencja stanu ustalonego, to wydajność FL w danym momencie, zależna od natężenia światła i geometrii liścia.
- ✓ Y (yield) – efektywna wydajność kwantowa PS II oświetlonego liścia obliczona jako stosunek $F_m' - F_t/F_m'$.

2. System impulsu światła wysycającego (Saturation pulse mode)

W systemie tym, poza wymienionymi wyżej dodatkowo obliczane są:

- ✓ ETR – wskaźnik szybkości przepływu elektronów ($\mu\text{mol elektronów m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
- ✓ qP – wskaźnik wygaszania fotochemicznego.
- ✓ qN – wskaźnik wygaszania niefotochemicznego.

Po włączeniu systemu podstawowego („Basic Mode”) na monitorze komputera widocznych jest 5 kolumn:

Kolumna I – parametry fluorescencji.

Kolumna II – światło pomiarowe – modulowane (L).

Kolumna III – światło aktyczne – ciągłe (A).

Kolumna IV – impuls światła wysycającego (SP)

Kolumna V – światło dalekiej czerwieni (FR).

Sygnal F_t można zaobserwować po włączeniu światła pomiarowego (klawisz L). wartość F_t zależy od:

1. Rodzaju próbki (liść lub martwy standard).

2. Intensywności napromieniowania (ustawiane za pomocą klawiszy – lub + w zakresie od 1 do 11; przy pomiarach standardowych stosuje się poziom 6 dla światła pomiarowego-modulowanego – L co odpowiada $0,04 \mu\text{E PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dla długości fali 650 nm).
3. Rodzaju zastosowanego światła (L, A, SP, FR).

Ćwiczenie 1

Pomiar fluorescencji chlorofilu za pomocą fluorymetru PAM.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Obserwacja Ft martwego standardu – po włączeniu komputera i PAM oraz ustawieniu systemu pomiarowego na „Basic Mode” włożyć na miejsce pomiarowe standard i włączyć światło pomiarowe – modulowane (klawisz – L poziom 6). Należy odczekać aż ustali się wartość Ft i następnie naświetlić standard światłem aktywnym o różnym natężeniu (klawiszem A, poziom od 1 do 11, co odpowiada natężeniu napromieniowania odpowiednio od 50 do $1850 \mu\text{E PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$), każdorazowo odczytując wartość Ft.
2. Badanie wpływu natężenia światła aktywnego (665 nm) na Ft liści różnych gatunków roślin i w różnym stopniu zaawansowania procesów starzenia. Liście roślin uprzednio oświetlonych światłem aktywnym (A – poziom 3) ustalamy wartość Ft. Dalszy sposób postępowania jest analogiczny jak w części pierwszej.
3. badanie wpływu napromieniowania daleką czerwień (730 nm) na Ft liści. Po zaadoptowaniu liścia do światła aktywnego o niskim natężeniu (klawisz A poziom 1) i ustaleniu się Ft włączyć światło dalekiej czerwieni (klawisz F, poziom 10 lub 11). Odczytać wydajność fluorescencji stanu ustalonego Ft.

Ćwiczenie 2

Oznaczanie wpływu napromieniowania na wydajność kwantową PS II i wyznaczenie punktu wysycenia światłem procesu transportu elektronów za pomocą fluorymetru PAM.

Wykonanie ćwiczenia:

Materiał roślinny: Liście roślin rosnących w pełnym świetle lub w zacieleniu. Liść zaadoptowany do naturalnego światła wkładamy górną stroną na miejsce pomiarowe i przez 5 min. Naświetlamy światłem aktywnym (klawisz A, poziom 3). Następnie obniżamy natężenie napromieniowania do poziomu 1 (klawisz -) i po 5 minutach oznaczamy efektywną wydajność kwantową PS II (yield) poprzez naciśnięcie klawisza Y (automatycznie włączany jest impuls światła wysycającego). Wydajność kwantową PS II oznaczamy następnie przy kolejnych natężeniach napromieniowania światłem ciągłym, aktywnym (poziom od 2 -11, klawisz +) każdorazowo naświetlając liść przez 2 min.

W tabeli zapisać wartość PAR i odpowiednie wartości Y oraz wyliczamy $\text{PAR} * Y$. Wyniki pomiarów przedstawić w formie wykresów (na osi X odkładamy jednostki PAR, a na osi Y, wartości Y lub $\text{PAR} * Y$).