Zasada pomiaru fluorescencji chlorofilu fluorymetrem
Na podstawie Handbook of Plant Ecophysiology techniques" ed. M.J.Reigosa Roger , Kluwer Academic Publishers,2001 opracowała dr A. Dzierzyńska

Fluorescencja chlorofilu jest zjawiskiem emisji zwrotnej części zaabsorbowanej energii świetlnej, która spowodowała wzbudzenie cząsteczek chlorofilu.
Powrót wzbudzonych cząsteczek chlorofilu do stanu podstawowego odbywa się na różne sposoby: praca fotochemiczna, fluorescencja, ciepło.
.
Jeżeli liść jest oświetlony ze stałą intensywnością, fluorescencja jest także ciągła i na stałym poziomie (system pomiarowy nie modulowany, z oświetleniem ciągłym). Jeżeli oświetlenie liścia się zmienia odpowiednio zmienia się także fluorescencja, dostarczając dodatkowych informacji (system pomiarowy modulowany).

System pomiarowy z oświetleniem ciągłym
Pomiar fluorescencji dokonywany jest na żywym liściu. Wzbudzenie chlorofilu jest wywoływane falą świetlną, pochodzącą ze źródła światła we fluorymetrze, nie krótszą od 620nm, co uzyskuje się zwykle przez zastosowanie odpowiedniego filtru. Świecenie zwrotne liścia jest odbierane przez detektor, także zaopatrzony w odpowiedni filtr odcinający świecenie dalekiej czerwieni.

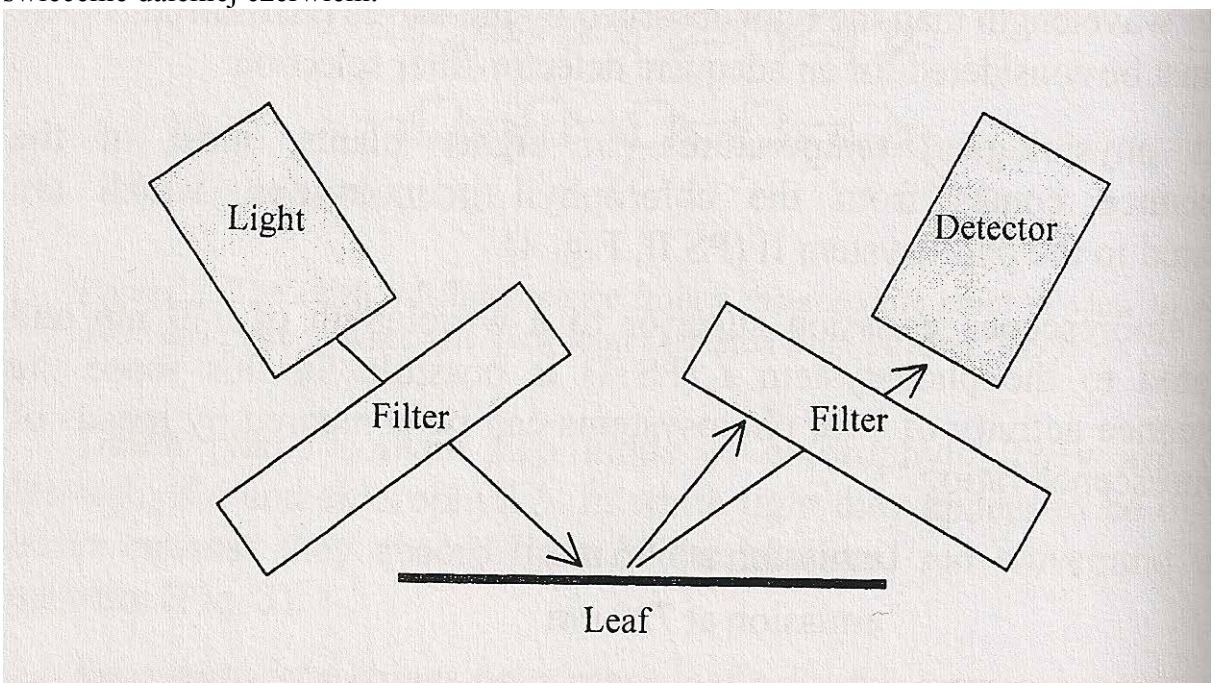
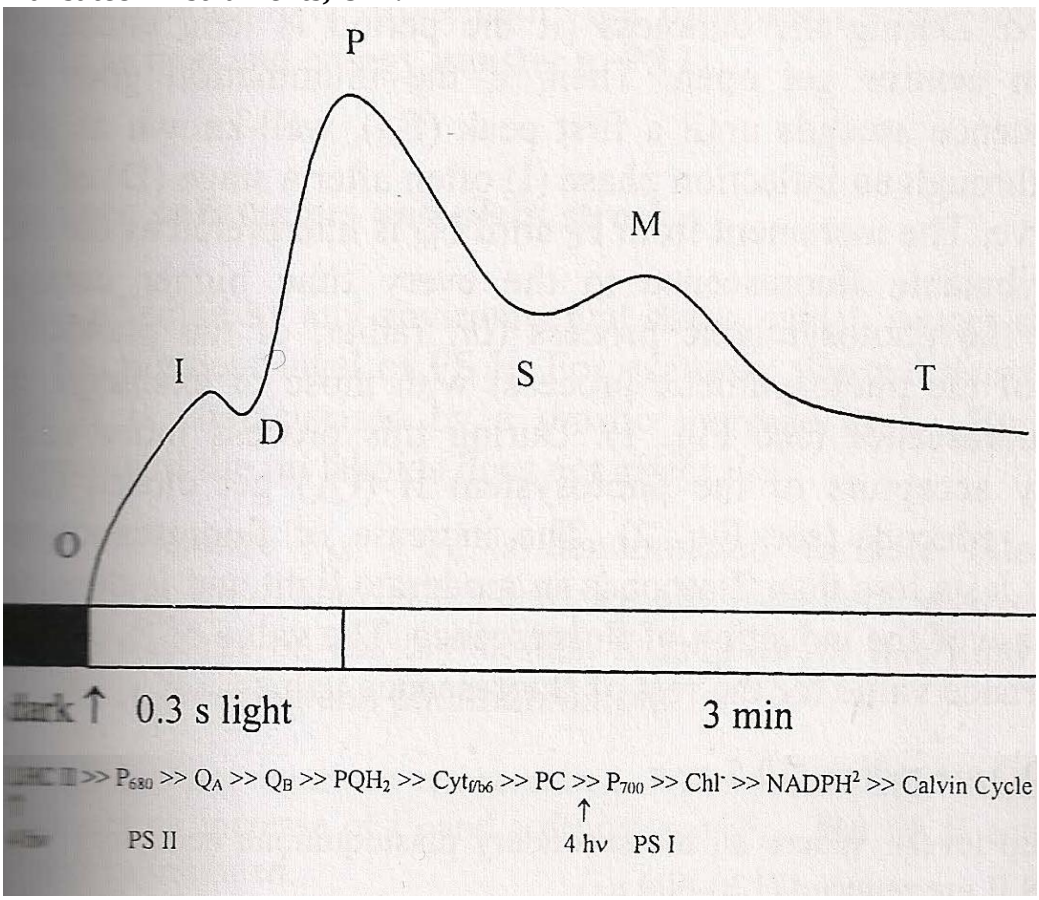


Figure 5. Outline of the operation for a non-modulated fluorometer. The detector filter needs to be a long-pass filter (Reigosa, 1997).

Źródło Handbook of Plant Ecophysiology techniques" ed. M.J.Reigosa Roger , Kluwer Academic Publishers,2001 strona 160

W liściach adoptowanych do ciemności przez co najmniej kilkanaście minut (za pomocą specjalnych klipsów), które po okresie zaciemnienia są nagle oświetlone impulsem światła o dużym natężeniu, ze źródła światła we fluorymetrze, zachodzi typowa fluorescencja

przejściowa zwana efektem Kautskiego. Pomiar dokonywany jest bez dostępu światła zewnętrznego.
Efekt Kaustskiego polega na szybkim podwyższeniu fluorescencji po oświetleniu (0,3 sek) powolnym obniżaniu się jej poziomu (3 min) aż do uzyskania stanu ustalonego. Krzywa, przedstawiająca przebieg w czasie fluorescencji po zaciemnieniu, nazywana krzywą Kautskiego, posiada kilka punktów charakterystycznych „OIDPSMT". Są one przyporządkowane do kolejnych etapów przepływu elektronów przez fotosyntetyczny łańcuch transportu elektronów. Fluorescencja jest na tej krzywej wyrażana w jednostkach względnych. Powolne obniżanie się fluorescencji wiąże się ze zwiększeniem asymilacji CO_2 w fazie biochemicznej fotosyntezy. Przebieg krzywej pozwala wyznaczyć takie wskaźniki fluorescencji po adaptacji w ciemności jak: Fo, Fm, Fv, Fv/Fm, gdzie Fo – fluorescencja minimalna, Fm- fluorescencja maksymalna, Fv –fluorescencja zmienna (Fm-Fo), Fv/Fm- stosunek wynoszący zwykle 0.832+-0.004, proporcjonalny do wydajności kwantowej fazy fotochemicznej i inne. Wszystkie one są modyfikowane przez wpływ stresowych warunków środowiskowych na aparat fotosyntetyczny.
Fo jest oznaczane w słabym świetle pomiarowym, kiedy zakłada się, że wszystkie centra reakcji PSII są utlenione (stan nazywany otwartymi pułapkami).
Wartość Fm jest uzyskiwana po zastosowaniu impulsu wysycającego o natężeniu wystarczającym do redukcji wszystkich akceptorów pierwotnych (stanu nazywanego zamkniętymi pułapkami), który powinien być wyznaczony dla warunków danego pomiaru. Podobnie czas zaciemnienia liścia powinien być dostosowany do badanego gatunku tak, aby wszystkie centra aktywne PSII były utlenione.
Krzywa Kautskiego może być wyznaczana z użyciem np. **Fluorymetru Handy-PEA firmy Hansatech Instruments, UK .**



Krzywa Kaustskiego

Źródło Handbook of Plant Ecophysiology techniques” ed. M.J.Reigosa Roger , Kluwer Academic Publishers,2001 strona 161

System pomiarowy z oświetleniem modulowanym

System pomiarowy z oświetleniem modulowanym jest zastosowany np. w fluorymetrach **FMS2 firmy Hansatech Instruments, UK** czy **Teaching PAM firmy Waltz, Germany**

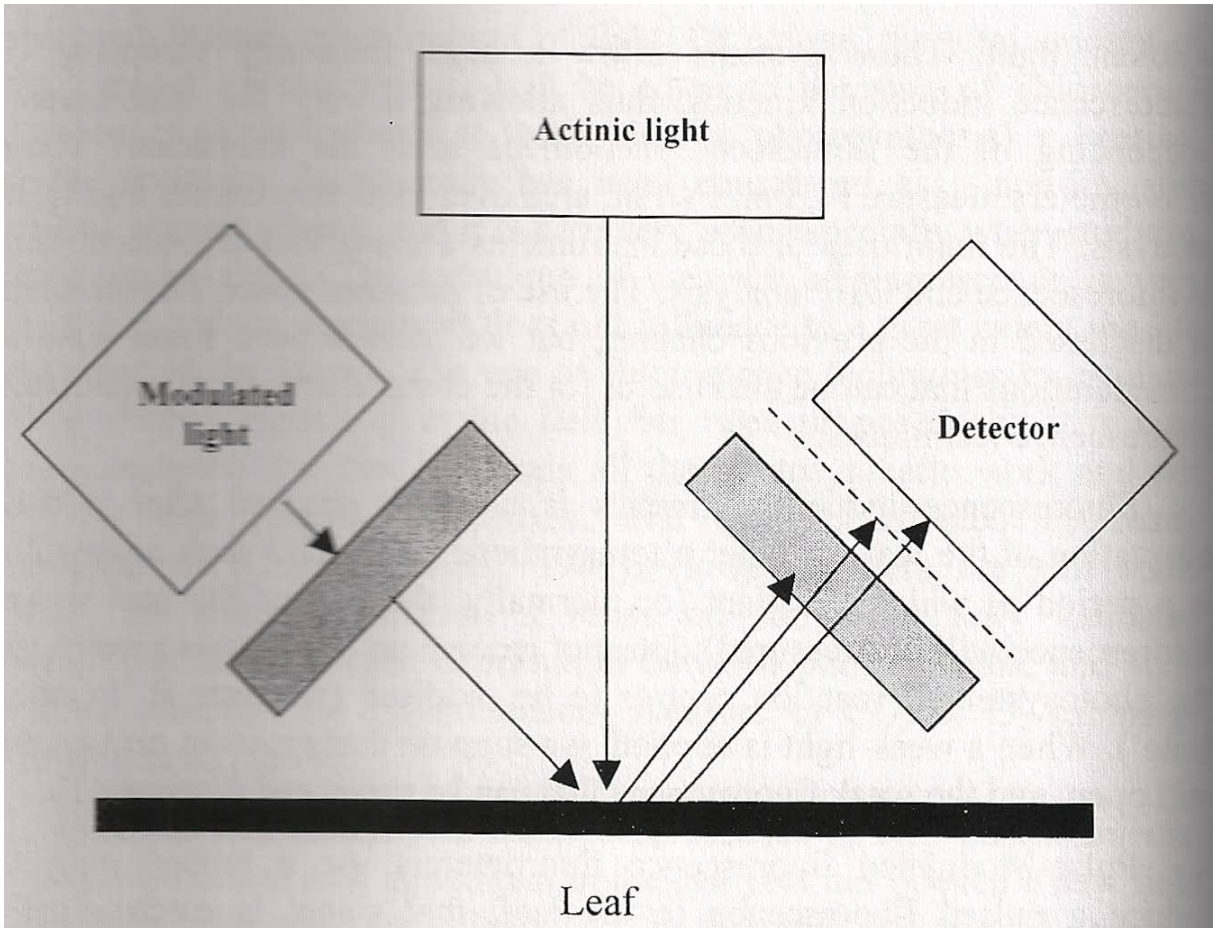


Figure 1. Scheme corresponding to a modulated fluorometer. The shadowed rectangles represent optical filters. The dashed line represents a signal-processing step.

Źródło Handbook of Plant Ecophysiology techniques” ed. M.J.Reigosa Roger , Kluwer Academic Publishers,2001 strona 176

Źródło światła emituje światło pulsacyjne i indukuje pulsacyjną fluorescencję chlorofilu w liściu. Impuls jest wzmocniony i identyfikowany przez detektor, pomiar może więc odbywać się przy dostępie światła zewnętrznego. Zastosowane także jest światło aktyniczne, o dużym natężeniu.

Przykładowy przebieg krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu przy pomiarze z oświetleniem modulowanym jest przedstawiony na rysunku. Światło modulowane na zwykle

zbyt niskie natężenie do indukcji całej krzywej Kautskiego. Słabe światło modulowane pozwala na oznaczenie Fo`- fluorescencji minimalnej na świetle. Impuls światła aktynicznego wysycającego pozwala na oznaczenie Fm`- fluorescencji maksymalnej na świetle (wygaszanie fotochemiczne i niefotochemiczne jest wtedy zerowe). Następnie fluorescencja obniża się do Fo` ponieważ centra aktywne się otwierają (są ponownie utleniane). Dodanie ciągłego światła aktynicznego o niskim natężeniu pozwala na przebieg fazy biochemicznej, wiązania i redukcji CO_2. Ponowne zastosowanie źródła światła aktynicznego o natężeniu wysycającym, zamykającego wszystkie centra reakcji, powoduje pojawianie się kolejnych pików Fv. Kolejne piki są coraz niższe od poprzednich, co wskazuje na wygaszanie niefotochemiczne. System pomiarowy z oświetleniem modulowanym pozwala na analizę wygaszania fotochemicznego q_P i niefotochemicznego q_N lub q_{NP}..

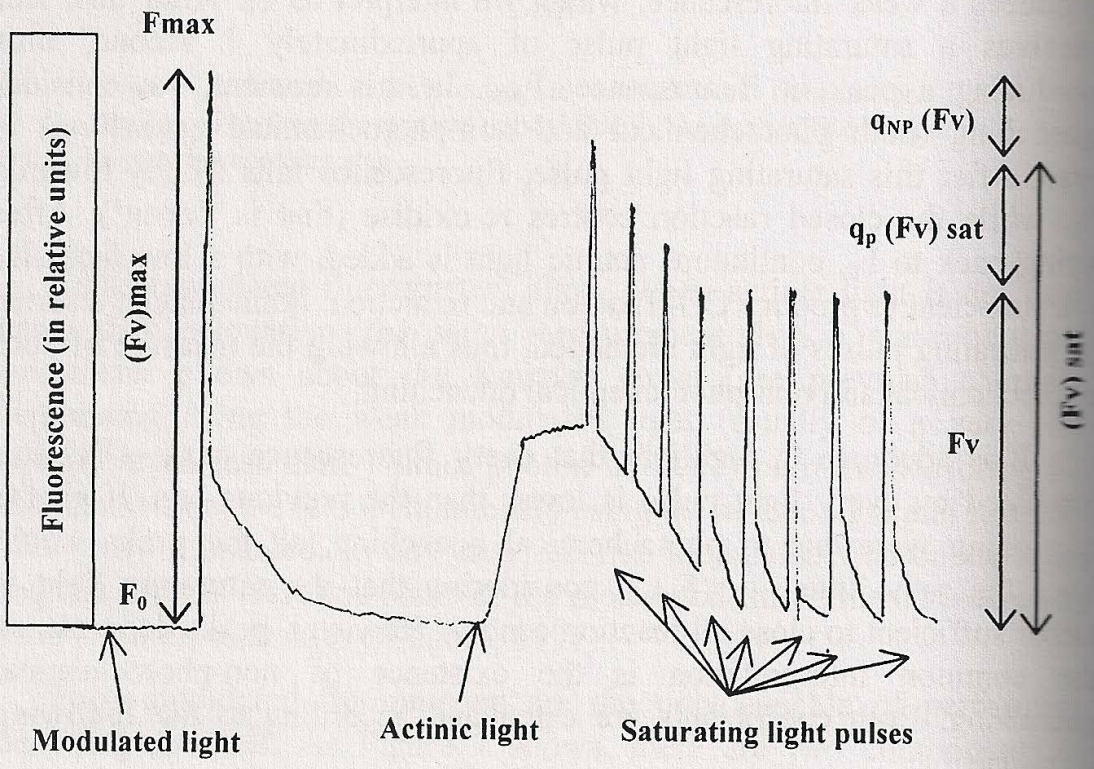


Figure 2. Time (length of this experiment was two minutes)

Źródło Handbook of Plant Ecophysiology techniques" ed. M.J.Reigosa Roger , Kluwer Academic Publishers,2001 strona 161