



1.3.5. Contenuto e fluorescenza della clorofilla

Metodi per determinare il contenuto e la fluorescenza della clorofilla

Methods for determining the content and fluorescence of chlorophyll

Filippo Bussotti e Martina Pollastrini

Corresponding author: Martina Pollastrini (martina.pollastrini@unifi.it)

**Università degli Studi di Firenze - Dipartimento di Scienze
e Tecnologie Agro-Alimentari, Ambientali e Forestali (DAGRI)**

Piazzale delle Cascine 18, 50144 Firenze (Italia)

1. Introduzione

Il contenuto di clorofilla, insieme all'efficienza dei fotosistemi, sono indicatori della vitalità della pianta, e danno un quadro completo dello stato generale di un organismo fotosintetico. Il contenuto e la fluorescenza della clorofilla possono essere misurati in campo con metodi non distruttivi, con clorofillometri e fluorimetri commerciali. I parametri valutati danno informazioni sulla “potenziale” efficienza fotosintetica, ma non sulla “reale” prestazione fotosintetica, quindi le connessioni con la fotosintesi netta (P_n) sono elusive, ma non da escludere.

La fluorescenza della clorofilla (ChlF) è un meccanismo di dissipazione dell'energia (de-eccitazione non fotochimica) negli organismi fotosintetici. La ChlF viene valutata in campo nella forma “attiva”, cioè emessa da foglie adattate al buio e sottoposte ad una luce saturante (attinica).

L'analisi di ChlF in campioni adattati al buio permette di misurare l'emissione di fluorescenza minima (F_0) e massima (F_M). Questa misurazione richiede meno di 1s. La cinetica dell'emissione di ChlF tra F_0 e F_M , rappresentata graficamente dal transient di ChlF, viene analizzata mediante il cosiddetto JIP test che consente di determinare una costellazione di parametri dipendenti dal tempo (Strasser et al., 2000; 2004; Tsimilli-Michael e Strasser, 2008).

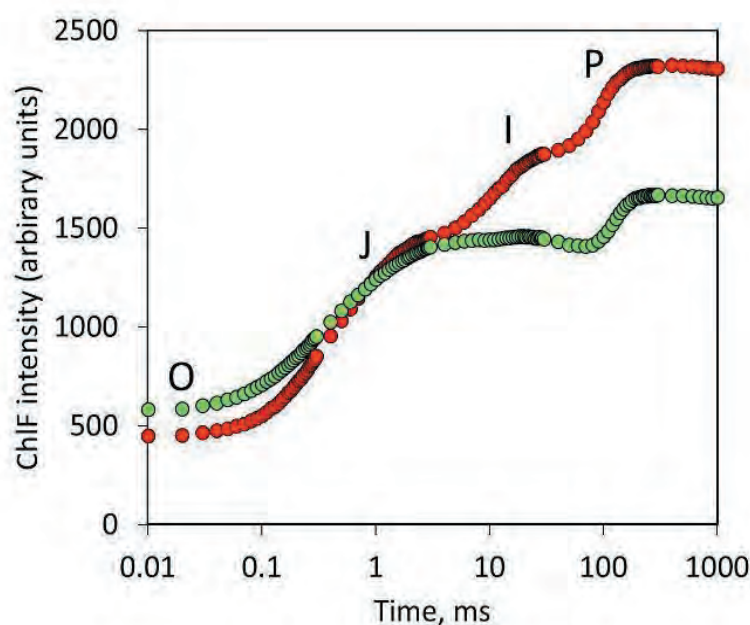


Figura 1 - Esempi di transient OJIP per piante non stressate (rosse) e stressate (verdi). Le curve OJIP sono indotte da un breve impulso (1 s di durata) di luce rossa saturante (650 nm). Tracciati su una scala temporale logaritmica, i transient di ChlF mostrano un andamento polifasico. “O” si riferisce al livello di fluorescenza iniziale (F_0); J (da 2 a 3 ms), I (30 ms) e P (500-800 ms - 1 s) sono, rispettivamente, i livelli intermedi e di picco dell'emissione di fluorescenza. Quest'ultimo indica l'intensità di fluorescenza (F_M) massima quando la luce saturante viene applicata alla foglia.

2. Scopo e applicazione

La misura dei parametri di ChlF e della cinetica di emissione di ChlF possono fornire utili informazioni sullo stato e sul funzionamento dell'apparato fotosintetico, con particolare attenzione ai fotosistemi (PSII e PSI). ChlF è una tecnica ampiamente applicata per valutare le risposte delle piante ai fattori ambientali. Ci sono due principali approcci: la fluorescenza modulata (pulse amplitude modulated,

PAM) e la fluorescenza diretta (prompt fluorescence, PF). La fluorescenza modulata si basa sulla misurazione dell'emissione di fluorescenza da parte di campioni esposti alla luce; la fluorescenza diretta viene applicata su campioni adattati al buio. Allo scopo del monitoraggio delle condizioni fisiologiche degli alberi, da svolgersi in condizioni di campo, si ritiene che l'uso della fluorescenza diretta sia più idoneo perché questa tecnica consente di ottenere numerose misure in poco tempo. Inoltre, i relativi fluorimetri hanno un costo minore rispetto a quelli impiegati per la fluorescenza modulata.

3. Obiettivi

Nel contesto del programma di monitoraggio ICP Forests si raccomanda la valutazione del contenuto di clorofilla e della fluorescenza per determinare il possibile impatto fisiologico delle condizioni ambientali e degli eventi climatici, nonché per esplorare le possibili relazioni con il deterioramento delle condizioni della chioma e della nutrizione fogliare.

4. Localizzazione dei campionamenti e delle misure

La misura dei parametri relativi alla clorofilla (contenuto e fluorescenza) può essere effettuata nelle stesse aree e nei medesimi tempi di campionamento dell'azione sui nutrienti fogliari.

5. Campionamento e misure

5.1. Campionamento

- Il periodo di campionamento coincide con quello relativo ai nutrienti fogliari, ed è compreso tra metà giugno e metà agosto di ogni anno, in presenza di foglie mature e prima dell'inizio della senescenza fogliare.
- Il campionamento fogliare può essere effettuato mediante tree climber o svettatoi, in funzione dell'altezza degli alberi, della struttura del popolamento e delle condizioni operative di ciascun sito forestale. I rami lunghi 40-50 cm con foglie attaccate sono prelevati nella porzione superiore, cioè, parte più esposta al sole della chioma.

5.2. Misura

- Le misure sono effettuate su almeno 15-20 foglie per albero. Le foglie devono essere rappresentative delle condizioni generali della chioma, per quanto riguarda la presenza di decolorazioni o sintomi fogliari.
- Per le sempreverdi potranno essere misurati separatamente le foglie o gli aghi di differente età, dando comunque la priorità a quelle dell'anno in corso.
- Il contenuto di clorofilla viene misurato immediatamente dopo il campionamento.
- Per la misura della fluorescenza, i rami tagliati devono essere immediatamente posti in sacchetti di plastica ermetici e umidificati per evitare la disidratazione. I sacchetti con i campioni vengono poi riposti in scatole isoterme mantenendo i campioni a temperatura costante. In tal modo i campioni vengono adattati al buio per un periodo abbastanza lungo (4-5 ore) in modo da poter rimuovere sia le componenti dinamiche che quelle croniche della fotoinibizione. Con un adattamento al buio sufficientemente lungo è possibile confrontare campioni raccolti in momenti diversi del giorno.
- La misura della fluorescenza può essere effettuata al termine della giornata di campionamento, in camera oscura.
- Gli aghi di conifere devono essere raggruppati per riempire il foro delle clip.

5.3. Strumenti consigliati

Misuratori di clorofilla

SPAD-502 (Konica Minolta, Japan)
CL-01 Chlorophyll Content System (Hansatech Ltd., Norfolk, UK)
CCM-200 plus and CCM-300 (ADC)
atLEAF CHL chlorophyll meter (FT Green LLC®, USA)
Dualex® and Multiplex® (Force-a, Paris, France).

Fluorimetri

HandyPea (Hansatech Ltd., Norfolk, UK)
PocketPea (Hansatech Ltd., Norfolk, UK)
FluorPen (Photon System Instruments, Drásov, Czech Republic)
MiniPAM (Walz, GmbH, Effeltrich Germany) (only for Fv/Fm).

Setting consigliati per HandyPea, ai fini del monitoraggio:

Durata della misura: 1s
Intensità: 3000
Gain: 0.75.

5.4. Parametri

Contenuto di clorofilla

Il contenuto di clorofilla viene valutata secondo una scala di unità arbitrarie (che può essere diversa nei vari strumenti) proporzionale al contenuto di clorofilla. La misura ottenuta è considerata anche un proxy del contenuto di azoto.

Fluorescenza della clorofilla

L'intensità dell'emissione della fluorescenza è misurata per mezzo di unità arbitrarie, che dipendono da vari fattori tecnici e dal settaggio degli strumenti.

Il parametro più affidabile, stabile e comparabile attraverso i differenti strumenti, metodi di misura e condizioni tecniche è:

- $F_v/F_M = [F_M - F_0] / F_M$
- F_v/F_M esprime la resa quantica massima del campione adattato al buio, ovvero la capacità massima del PSII di intrappolare i fotoni. F_v/F_M è un parametro universalmente riconosciuto, ed è acquisibile con tutti gli strumenti proposti.

Altri parametri sono connessi alle varie fasi relativi alla cattura ed al trasporto degli elettroni attraverso la ETC (Electron Transport Chain): efficienza del complesso di scissione dell'acqua di alimentare l'ETC, dissipazione dell'energia attraverso calore, trasporto degli elettroni, dal PSII al PSI, trasporto dal PSI agli accettori finali, efficienza complessiva del sistema. Ciascuna di questa fase può essere collegata ad uno specifico fattore di stress, quindi un'analisi completa, quando possibile, può essere molto informativa sullo stato generale dell'albero e dei suoi rapporti con i fattori ambientali.

Alcuni dei principali parametri, di fluorescenza diretta (PF - JIP test) e modulata (MF) sono elencati nell'allegato 1, e possono essere acquisiti per finalità specifiche.

5.5. Quality Assurance

Contenuto di clorofilla

I misuratori di clorofilla sono “autocalibrati” e non necessitano controlli da parte dei produttori prima delle campagne di monitoraggio.

Se vengono usati differenti strumenti, e strumenti di tipo diverso, è utile effettuare delle sessioni di intercalibrazione per armonizzare le scale di misura.

Fluorescenza della clorofilla

I fluorimetri devono essere calibrati dal produttore prima di qualsiasi campagna sul campo.

Si consiglia di disporre di un "team di riferimento" e sessioni congiunte di intercalibrazione tra gli operatori.

6. Gestione dei dati

Dopo il controllo del dataset per eliminare i dati errati (curve anomale) e le misure fallite, i valori dei parametri, espressi come media per albero, vengono organizzati in fogli Excel con le seguenti informazioni:

- Paese.
- Area di monitoraggio.
- Data.
- Strumento.
- Durata dell’adattamento al buio.
- Specie.
- Numero dell’albero.
- Età della foglia (nelle sempreverdi).

Si consiglia inoltre di fornire i dati grezzi, così come vengono scaricati dallo strumento (un file per albero, unitamente alle informazioni sopra elencate), in modo da poter calcolare altri parametri.

BIBLIOGRAFIA

Fluorescenza della clorofilla

Testi di carattere generale

Bussotti F., Kalaji M.H., Desotgiu R., Pollastrini M., Łoboda T., Bosa K., 2012. Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla. *Strumenti per la Didattica e la Ricerca*, 137. Firenze University Press (Firenze, Italia). Pp. 132. ISBN: 978-88-6655-215-4 (Manuale in italiano: reperibile su: https://media.fupress.com/files/pdf/24/2426/2426_24205).

Papageorgiou GC, Govindjee, eds. 2000. *Advances in photosynthesis and respiration series. Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*. Dordrecht, the Netherlands: Springer.

DeEll J.R., Toivonen P.M.A., 2003. *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. Pp. 259.

Kalaji M.H., Goltsev V.N., Zuk-Golaszewska K., Zivcak M., Brestic M., 2017. *Chlorophyll Fluorescence. Understanding Crop Performance – Basics and Applications*. CRC Press – Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. Pp. 222.

Baker NR, Rosenqvist E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607–1621.

Kalaji H.M., Schansker G., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Ferroni L., Goltsev V., Guidi L., Jajoo A., Li P., Losciale P., Mishra V.K., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Pollastrini M., Suresh K., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M., Cetner M.D., Samborska I.A., Stirbet A., Olsovska K., Kunderlikova K., Shelonzek H., Rusinowski S., Bąba W., 2017. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research* 132:13–66.

Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dąbrowski P., Elsheery N.I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S.W., Jajoo A., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Poli D.B., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Serôdio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M., 2014. Frequently Asked Questions about chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis Research*. 122:121–158. DOI 10.1007/s11120-014-0024-6.

Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313–349.

Maxwell C, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659–668.

Murchie EH, Lawson T. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64: 3983–3998.

JIP test

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M, Pathre U, Mohanty P, eds. *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*. London, UK: Taylor & Francis, 445–483.

Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. 2004. Analysis of the fluorescence transient. In: Papageorgiou GC, Govindjee, eds. *Advances in photosynthesis and respiration series. Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 321–362.

Tsimilli-Michael M, Strasser RJ. 2008. Experimental resolution and theoretical complexity determine

the amount of information extractable from the chlorophyll fluorescence transient OJIP. In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B, eds. *Photosynthesis: energy from the Sun*. 14th International.

Bussotti F., Gerosa G., Digrado A., Pollastrini M., 2020. Selection of chlorophyll fluorescence parameters as indicators of photosynthetic efficiency in large scale plant ecological studies. *Ecological Indicators* 108, 105686.

Applicazioni su alberi e foreste

Bussotti F., Pollastrini M., Cascio C., Desotgiu R., Gerosa G., Marzuoli R., Nali C., Lorenzini G., Pellegrini E., Carucci M.G., Salvatori E., Fusaro L., Piccotto M., Malaspina P., Manfredi A., Roccotello E., Toscano S., Gottardini E., Cristofori A., Fini A., Weber D., Baldassarre V., Barbanti L., Monti A., Strasser R.J., 2011. Conclusive remarks. Reliability and comparability of chlorophyll fluorescence data from several field teams. *Environmental Experimental Botany* 73, 116-119.

Pollastrini M., Holland V., Brüggemann W., Bruelheide H., Dănilă I.C., Jaroszewicz B., Valladares F., Bussotti F. (2016a). Taxonomic and ecological relevance of the chlorophyll a fluorescence signature of tree species in mixed European forests. *New Phytologist* 212 (1): 51-65.

Pollastrini M., Holland V., Brüggemann W., Bussotti F., 2016b. Chlorophyll a fluorescence analysis in forests. *Annali di Botanica (Roma)* 6: 23-37. doi: 10.4462/annbotrm-13257.

Pollastrini M., Feducci M., Bonal D., Fotelli M., Gessler A., Gossiorc C., Guyot V., Jactel H., Nguyen D., Radoglou K., Bussotti F., 2016c. Physiological significance of forest tree defoliation: results from a survey in a mixed forest in Tuscany (central Italy), 361, 170-178. doi.org/10.1016/j.foreco.2015.11.018.

Pollastrini M., Salvatori E., Fusaro L., Manes F., Marzuoli R., Gerosa G., Brüggemann W., Strasser R.J., Bussotti F., 2020. Selection of tree species for forests under climate change: is PSI functioning a better predictor for net photosynthesis and growth than PSII? *Tree Physiology* 44, 1561–1571.

Swoczyna T, Kalaji HM, Bussotti F, Mojski J and Pollastrini M., 2022. Environmental stress - what can we learn from chlorophyll a fluorescence analysis in woody plants? A review. *Front. Plant Sci.* 13:1048582. doi: 10.3389/fpls.2022.1048582.

Contenuto di clorofilla

Ling, Q., Huang, W. & Jarvis, P. Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth Res* 107, 209–214 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9606-0>.

Markwell, J., Osterman, J.C. & Mitchell, J.L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynth Res* 46, 467–472 (1995). <https://doi.org/10.1007/BF00032301>.

Murillo-Amador B., Avila-Serrano N.Y., Garcia-Hernandez J.L., Lopez-Aguilar R., Troyo-Dieguez E., and Kaya C., 2004. Relationship between a nondestructive and an extraction method for measuring chlorophyll contents in cowpea leaves. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* 167.

Richardson, A.D., Duigan, S.P. and Berlyn, G.P. (2002), An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153: 185-194. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00289.x>.

Süß, A., Danner, M., Obster, C., Locherer, M., Hank, T., Richter, K. (2015): Measuring Leaf Chlorophyll Content with the Konica Minolta SPAD-502Plus – Theory, Measurement, Problems, Interpretation. EnMAP Field Guides Technical Report, GFZ Data Services. DOI: <http://doi.org/10.2312/enmap.2015.010>.

Uchino, H., Watanabe, T., Ramu, K., Sahrawat, K.L., Marimuthu, S., Wani, S.P., Ito, O., 2013. Calibrating chlorophyll meter (SPAD-502) reading by specific leaf area for estimating leaf nitrogen concentration in sweet sorghum. *J. Plant Nutr.* 36,1640–1646.

Uddling J, Gelang-Alfredsson J, Piikki K, Pleijel H. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynth Res.* 2007 Jan;91(1):37-46. doi: 10.1007/s11120-006-9077-5. Epub 2007 Mar 7. PMID: 17342446.

ALLEGATO 1 – Principali parametri di fluorescenza diretta (PF) e modulata (MF)

Parametro di Fluorescenza	Descrizione	Prompt (PF) o Modulated (MF) fluorescence
F_0	Livello iniziale di fluorescenza in campioni adattati al buio	PF - MF
$F_L = F_{100}$	Fluorescenza a 100 μ s di illuminazione di un campione adattato al buio	PF
$F_K = F_{300}$	Fluorescenza a 300 μ s di illuminazione di un campione adattato al buio	PF
$F_J = F_{2ms}$	Fluorescenza a 2 ms di illuminazione di un campione adattato al buio	PF
$F_I = F_{30ms}$	Fluorescenza a 30 ms di illuminazione di un campione adattato al buio	PF
F_M	Fluorescenza massima dopo illuminazione di un campione adattato al buio	PF - MF
F_V	Fluorescenza variabile ($F_M - F_0$)	PF - MF
$F_V/F_M = [F_M - F_0]/F_M$	<i>Maximum quantum yield</i> (massima efficienza potenziale del PSII in un campione adattato al buio)	PF-MF
F_t	Fluorescenza variabile ad un punto t fra F_0 e F_M ($F_t - F_0$)	PF
F_0'	Fluorescenza minima di un campione adattato alla luce	MF
F_M'	Fluorescenza massima di un campione adattato alla luce	MF
$F_S = F_t$	Fluorescenza basale (steady-state) di un campione adattato alla luce	MF
$q_P = (F_M' - F_S)/(F_M' - F_0')$	<i>Photochemical quenching</i> (energia utilizzata per le reazioni fotochimiche)	MF
$q_N = 1 - (F_M' - F_0')/(F_M - F_0)$	<i>Non-photochemical quenching</i> (energia dissipata come calore)	MF
$NPQ = (F_M - F_M')/F'$	<i>Non-photochemical quenching</i> (espressione alternativa)	MF
$\Phi_{PSII} = \Delta F/F_M' = (F_M' - F_S)/F_M'$	Efficienza effettiva del PSII	MF
$ETR = \Phi_{PSII} \times PPF \times 0.5$	<i>Electron Transport Rate</i>	MF
$V_L = (F_{150} - F_0)/(F_m - F_0)$	Fluorescenza variabile relativa a 100 μ s (Banda-L)	PF
$V_K = (F_{300} - F_0)/(F_m - F_0)$	Fluorescenza variabile relativa a 300 μ s (Banda - K)	PF
$V_J = (F_{2ms} - F_0)/(F_m - F_0)$	Fluorescenza variabile relativa a 2 ms (J-step)	PF

$V_I = (F_{30ms} - F_0)/(F_m - F_0)$	Fluorescenza variabile relativa a 30 ms (I-step)	PF
V_K / V_J	Efficienza del flusso di elettroni dal complesso di scissione dell'acqua	PF
$M_0 = 4 (F_{300} - F_0)/(F_m - F_0)$	Pendenza iniziale del transient di fluorescenza	PF
$\Phi_{D0} = DI_0/ABS = F_0/F_M$	Resa quantica massima di dissipazione al livello del PSII	PF-MF
$\Phi_{E0} = ET_0/ABS = (F_V/F_M) \Psi_0$	Resa quantica massima per il trasporto degli elettroni al livello del PSII	PF
$\Psi_0 = ET_0/TR_0 = (F_m - F_{2ms})/(F_m - F_0) = 1 - V_J$	Probabilità che un elettrone entri nella ETC (catena di trasporto degli elettroni)	PF
$\delta_{R0} = RE_0/ET_0 = (F_m - F_{2ms})/(F_m - F_0)$	Probabilità che un elettrone entri nell'intersistema PSII - PSI	PF
$\Psi_{RE0} = \Delta V_{IP} = \Psi_{E0} \times \delta_{R0}$	Efficienza totale di trasporto fra PSII e PSI	PF
$RC/CS_0 = \Phi_{P0} (V_J/M_0) (ABS/CS_0)$	Densità dei centri di reazione attivi 0	PI
$PI_{ABS} = RC/ABS \times \Phi_{P0} / (1 - \Phi_{P0}) \times \Psi_{E0} / (1 - \Psi_{E0})$	Performance Index	PF
$PI_{total} = RC/ABS \times \Phi_{P0} / (1 - \Phi_{P0}) \times \Psi_{E0} / (1 - \Psi_{E0}) \times \delta_{R0} / (1 - \delta_{R0})$	Performance Index totale	PF