

STRUMENTI
PER LA DIDATTICA E LA RICERCA

– 137 –

Filippo Bussotti, Mohamed Hazem Kalaji,
Rosanna Desotgiu, Martina Pollastrini,
Tadeusz Łoboda, Karolina Bosa

**Misurare la vitalità delle piante
per mezzo della fluorescenza
della clorofilla**

Firenze University Press
2012

Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla / Filippo Bussotti, Mohamed Hazem Kalaji, Rosanna Desotgiu, Martina Pollastrini, Tadeusz Łoboda, Karolina Bosa. – Firenze: Firenze University Press, 2012. (Strumenti per la didattica e la ricerca ; 137)

<http://digital.casalini.it/9788866552161>

ISBN 978-88-6655-215-4 (print)

ISBN 978-88-6655-216-1 (online PDF)

ISBN 978-88-6655-217-8 (online ePub)

Progetto grafico di Alberto Pizarro Fernández, Pagina Maestra s.n.c.

Rielaborato da: M. H. Kalaji e T. Łoboda, *Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin*, Warszawa 2009

Certificazione scientifica delle Opere

Tutti i volumi pubblicati sono soggetti ad un processo di referaggio esterno di cui sono responsabili il Consiglio editoriale della FUP e i Consigli scientifici delle singole collane. Le opere pubblicate nel catalogo della FUP sono valutate e approvate dal Consiglio editoriale della casa editrice. Per una descrizione più analitica del processo di referaggio si rimanda ai documenti ufficiali pubblicati sul sito-catalogo della casa editrice (<http://www.fupress.com>).

Consiglio editoriale Firenze University Press

G. Nigro (Coordinatore), M. T. Bartoli, M. Boddi, F. Cambi, R. Casalbuoni, C. Ciappei, R. Del Punta, A. Dolfi, V. Fargion, S. Ferrone, M. Garzaniti, P. Guarnieri, G. Mari, M. Marini, M. Verga, A. Zorzi.

© 2012 Firenze University Press
Università degli Studi di Firenze
Firenze University Press
Borgo Albizi, 28, 50122 Firenze, Italy
<http://www.fupress.com/>
Printed in Italy

*We are all very ignorant,
but not all ignorant of the same things. . .*
(Albert Einstein)

Fluorescence is red and beautiful
(Govindjee, 1995)

“Il calabrone entra nella stanza illuminata, va a battere velocemente contro la lampada, le pareti, i mobili. Dopo un pò si acquatta per riprendere forze. Ricomincia contro la lampada, le pareti, i vetri, e daccapo la lampada. Infine cade sul tavolo zampe all'aria, la mattina dopo è secco, leggero, morto. Non ha capito niente, ma non si può dire che non abbia tentato”
(Ennio Flaiano)

Indice

PREFAZIONE	9
ABBREVIAZIONI	11
CAPITOLO 1 La fotosintesi	13
CAPITOLO 2 La fluorescenza della clorofilla <i>a</i>	33
CAPITOLO 3 La fluorescenza modulata (PAM: <i>Pulse Amplitude Modulated</i>)	47
CAPITOLO 4 La fluorescenza diretta e l'analisi del <i>transient</i> O-J-I-P	55
CAPITOLO 5 Fotosintesi netta e fluorescenza della clorofilla <i>a</i>	73
CAPITOLO 6 Altri metodi fluorimetrici	77
CAPITOLO 7 Strumenti disponibili sul mercato	81
CAPITOLO 8 Fattori ambientali e parametri di fluorescenza	93
CAPITOLO 9 Applicazioni	107
BIBLIOGRAFIA	113
AUTORI	131

Prefazione

Esiste un crescente interesse per i principi e le applicazioni pratiche della fluorescenza della clorofilla *a*, da parte di studenti e di giovani ricercatori. Si può senz'altro dire che questa è una delle branche della biologia ed ecofisiologia vegetale più dinamiche e in costante evoluzione, sia dal punto di vista dei principi teorici che da quello degli strumenti commercialmente disponibili. Inoltre le potenzialità che questa scienza e tecnica offrono per affrontare i problemi del mondo reale, nel campo della protezione degli ecosistemi e della produzione agraria, fanno intravedere possibilità future per la creazione di nuove figure professionali legate all'uso di queste metodiche. Si tratta, infatti, di metodiche semplici, veloci, non invasive e relativamente poco costose.

Tuttavia se, una volta acquisita, la pratica può essere considerata abbastanza semplice e alla portata di molti, le basi teoriche e la comprensione dei processi fisiologici che ne costituiscono i fondamenti, possono essere piuttosto complessi e richiedono uno sforzo di studio e comprensione non indifferente. Ciò è reso più complicato dal fatto che tutta la letteratura scientifica inerente questi argomenti è in lingua inglese, ed è frazionata in un numero elevato di pubblicazioni e articoli scientifici non sempre facilmente reperibili.

Questo manuale vuole costituire un compendio, o un'introduzione generale, alle tematiche relative alla fluorescenza della clorofilla *a* per studenti e laureati che abbiano già una conoscenza di base della biologia vegetale. Gli argomenti sono esposti in maniera ordinata, affrontando progressivamente il funzionamento dei meccanismi fisiologici legati alla cattura della luce e alla fase luminosa della fotosintesi, i principi della fluorescenza indotta, le diverse tecniche di misura e i parametri ad esse correlati, i concetti e le tecniche più recenti e innovative, gli strumenti disponibili sul mercato e le relative applicazioni.

10 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

Il libro è costruito sull'ossatura di una prima edizione polacca, redatta dagli amici e colleghi Mohamed Hazem Kalaji e Tadeusz Łoboda, profondamente rielaborata sulla base delle più recenti acquisizioni e delle esperienze condotte dal gruppo di lavoro italiano, sia nel campo della fluorescenza diretta (JIP-test) che di quella modulata. Vanno inoltre menzionate le esperienze didattiche maturate durante i corsi di aggiornamento ed i workshop che si sono tenuti nel corso degli anni, ed ai quali hanno partecipato numerosi giovani che ci hanno trasmesso entusiasmo e voglia di proseguire per questa strada.

Uno speciale riconoscimento va attribuito al Prof. Reto J. Strasser, dell'Università di Ginevra (Svizzera) e massimo esperto mondiale della fluorescenza diretta, che con infinita pazienza e lunghe discussioni ci ha introdotto ai segreti della fluorescenza diretta e del JIP-test.

Ringraziamo inoltre la collega e amica Angeles Calatayud (IVIA, Valencia, Spagna) per l'attenta lettura critica che ha svolto, migliorando significativamente il testo in varie parti.

Abbreviazioni

Vengono qui presentate le abbreviazioni di uso comune, e quelle che si riferiscono a processi fisiologici generali. Per quanto riguarda le abbreviazioni più specifiche indicanti i parametri delle diverse tecniche di fluorescenza (fluorescenza modulata e diretta) si veda ai rispettivi capitoli.

ABS - (*Absorption*) - flusso di fotoni assorbiti dai pigmenti dell'antenna,

ADP - adenosin-di-fosfato,

AL - luce attinica,

A_M (Area) - area soprastante la curva di induzione della fluorescenza della clorofilla,

ATP - adenosin-tri-fosfato,

C3 - piante con ciclo fotosintetico di tipo C3,

C4 - piante con ciclo fotosintetico di tipo C4,

CAM - piante con ciclo fotosintetico di tipo CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*),

Chl_{a,b} - clorofilla *a* e *b*,

cyt b₆f - complesso del citocromo b₆f,

D1 e D2 - proteine del centro di reazione del PSII,

DCMU - (3-(3, 4-diclorofenil)-1, 1-dimetilurea),

DI - dissipazione termica dell'energia da parte del pigmento antenna eccitato,

ET (*Electron Transport*) - trasporto degli elettroni,

ETR (*Electron Transport Rate*) - efficienza del trasporto degli elettroni,

Fd - ferredossina,

Feo (Pheo) - feofitina,

FL - fluorescenza,

F_M - fluorescenza massima in un campione adattato al buio,

F_M' - fluorescenza massima in un campione adattato alla luce,

FNR - ferredossina NADP⁺ riduttasi

F₀ - fluorescenza iniziale in un campione adattato al buio,

F₀' - fluorescenza iniziale in un campione adattato alla luce,

Fq' - differenza di fluorescenza fra F_M' e ciascun punto F' (Fq' = F_M' - F'),

FR (*far red*) - radiazione luminosa nel rosso lontano,

F_S (F_T) - fluorescenza stazionaria (*steady fluorescence*),

F_V (F_M - F₀) - fluorescenza variabile,

F_V/F₀ - efficienza massima di scissione della molecola di acqua in un campione adattato al buio

F_V/F_M - massima efficienza fotochimica primaria del PSII in un campione adattato al buio

12 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

GAP - gliceraldeide 3-fosfato,
LHCI - complesso dell'antenna mobile associato al PSI,
LHCII - complesso dell'antenna mobile associato al PSII,
ML - luce modulata,
NAD⁺ - nicotinammide-adenin-dinucleotide, forma ossidata,
NADH - nicotinammide-adenin-dinucleotide, forma ridotta,
NADP⁺ - nicotinammide-adenin-dinucleotide-fosfato, forma ossidata,
NADPH - nicotinammide-adenin-dinucleotide-fosfato, forma ridotta,
NPQ - *quenching* non fotochimico
OEC (*Oxygen evolving complex*) - complesso della fotolisi dell'acqua associato al PSII,
P680 - centro di reazione del PSII,
P700 - centro di reazione del PSI,
PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) - radiazione fotosinteticamente attiva,
PC - plastocianina,
PEP (*PhosphoEnolPyruvate*) - acido fosfoenolpiruvico (fosfoenolpiruvato),
PEPc - enzima fosfoenolpiruvato carbossilasi,
PGA - acido 3-fosfoglicerico,
PL - fotosintesi lorda
PN - fotosintesi netta
PR - fotorespirazione
PPFD (*Photosynthetic Photon Flux Density*) - densità di flusso fotonico fotosintetico,
PQ - plastoquinone nello stato ossidato,
PQH₂ - plastoquinone nello stato ridotto (idroplastoquinone),
PSI - Fotosistema 1,
PSII - Fotosistema 2,
Q_A, Q_B - plastoquinone A e B,
qN - *quenching* non fotochimico,
qP - *quenching* fotochimico,
RC - centro di reazione,
R_{Fd} (*fluorescence decrease ratio*) - indice di funzionalità del PSII,
Rubisco - ribulosio-1, 5-bisfosfato carbossilasi-ossigenasi,
RuBP - ribulosio-1, 5-bisfosfato,
SL - luce saturante,
T_{EM} - tempo per raggiungere F_{M'},
TD - tioredoxina,
JIP test - sistema di misura dei segnali di cinetica veloce nella curva di induzione di fluorescenza,
Yield - resa di reazioni fotochimiche del PSII in relazione ai fotoni assorbiti

La fotosintesi

I.1. Generalità

Questo capitolo illustra e sintetizza i principi ed i principali meccanismi del processo fotosintetico. Le informazioni contenute provengono dai più importanti testi di fisiologia vegetale disponibili sul mercato, a cui rimandiamo per ulteriori approfondimenti (Hall e Rao, 1999; Lawlor, 2001; Taiz e Zeiger, 2009; Hopkins e Hüner, 2008, 2009).

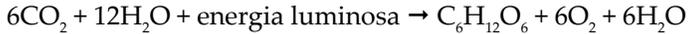
La fotosintesi è il più importante processo bioenergetico che si genera sul nostro pianeta, e permette l'esistenza della vita e della biosfera. Gli organismi fotosintetici sono in grado di sfruttare l'energia luminosa per produrre composti organici, utilizzando una varietà di substrati come donatori e come accettori di elettroni. Negli organismi aerobici il donatore e l'accettore di elettroni sono, rispettivamente, l'acqua (H_2O) e l'anidride carbonica (CO_2), mentre i prodotti finali della fotosintesi sono l'ossigeno (O_2), l'acqua e i carboidrati. Questo tipo di fotosintesi avviene nelle piante, nelle alghe, nei licheni e in alcuni gruppi di batteri, fra cui i cianobatteri.

Nelle piante l'apparato fotosintetico è situato all'interno dei cloroplasti, e il processo fotosintetico viene svolto nei tilacoidi e nello stroma. La cattura della luce, e tutti gli eventi connessi al trasporto degli elettroni, avvengono nella membrana e nel lumen dei tilacoidi (*fase luminosa*), mentre il ciclo di Calvin-Benson e la conseguente riduzione del carbonio con formazione di carboidrati (detta anche fase delle reazioni enzimatiche, o *fase oscura*) avviene nello stroma. La Fig. 1.1 mostra uno schema riassuntivo delle reazioni generali della fotosintesi. La fase luminosa è strettamente dipendente dall'esposizione alla luce, il Ciclo di Calvin non è dipendente dalla luce, anche se questa è comunque necessaria per il rifornimento di ATP e NADPH.

La fotosintesi è un processo molto complesso che si svolge attraverso numerosi passaggi, durante i quali l'energia luminosa dei fotoni assorbiti

14 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

viene convertita nell'energia chimica contenuta nei composti organici. In termini generali, la fotosintesi può essere descritta per mezzo della seguente reazione semplificata:



Il processo fotosintetico consiste nell'assorbimento, trasformazione e immagazzinamento dell'energia luminosa, ed è costituito da quattro fasi principali:

1. l'assorbimento della luce da parte dei pigmenti antenna e trasferimento dell'energia verso i centri di reazione;
2. il trasferimento dell'energia (sotto forma di elettroni e protoni) dai centri di reazione eccitati alla catena di trasporto, attraverso la riduzione del plastochinone (PQ), che costituisce l'accettore primario;
3. la trasformazione dell'energia degli elettroni eccitati e dei protoni nel corso di reazioni di ossidoriduzione (redox) e produzione di ATP e NADPH;
4. la sintesi e la dislocazione dei prodotti finali della fotosintesi.

1.2. Struttura dell'apparato fotosintetico

I cloroplasti (Fig. 1.2) sono organuli di forma lenticolare che, nelle piante, si trovano nelle cellule delle foglie e di tutte le altre parti verdi come, per esempio, i giovani fusti. I cloroplasti sono delimitati da una doppia membrana lipoproteica. Essi contengono una sostanza amorfa all'interno (stroma), nella quale si trovano i tilacoidi, costituiti da strutture lenticolari (i grana) e raggruppati in pile. I tilacoidi sono circondati da membrane semplici, nelle quali sono immersi i pigmenti fotosintetici (in particolare le clorofille), e le proteine che formano i adibiti alla cattura della luce (complessi chiamati antenne) nei fotosistemi (fotosistema 2 - PSII, e fotosistema 1 - PSI). Sono comprese anche le proteine delle catene di trasporto degli elettroni, fra cui il complesso del citocromo (cyt b_6f), ed il complesso adibito alla produzione di ATP (ATP-sintasi). Sulla membrana dei tilacoidi si svolge la fase luminosa della fotosintesi, mentre il ciclo di Calvin-Benson avviene nello stroma. I cloroplasti contengono DNA e RNA.

Le proteine immerse nella membrana dei tilacoidi sono di natura idrofoba o anfotera (contenente cioè sia la parte idrofila che quella idrofoba), mentre le proteine che si trovano sulla superficie della membrana (come la plastocianina e la ferredossina) sono idrofile. I lipidi costituiscono il 35 – 40% delle membrane, e i più diffusi sono i galattolipidi, che rappresentano circa il 75% di tutti i lipidi presenti. Sono inoltre presenti i fosfolipidi, che costituiscono il doppio strato della membrana, i solfolipidi, i plastochinoni, l' α -tocoferolo e la vitamina K. Le membrane dei tilacoidi contengono

Figura 1.1 – Le due fasi della fotosintesi e la loro interazione all'interno del cloroplasto. Gli eventi luce-dipendenti (fase luminosa) si verificano nella membrana dei tilacoidi e portano alla produzione di NADPH e ATP, utilizzati nel ciclo di Calvin, in cui si verifica l'organizzazione della CO₂ con la produzione di zuccheri (composti organici) (da <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/BotanicalSciences/Photosynthesis/Photosynthesis/psoverview.gif>. Ridisegnato da Janusz Golik)

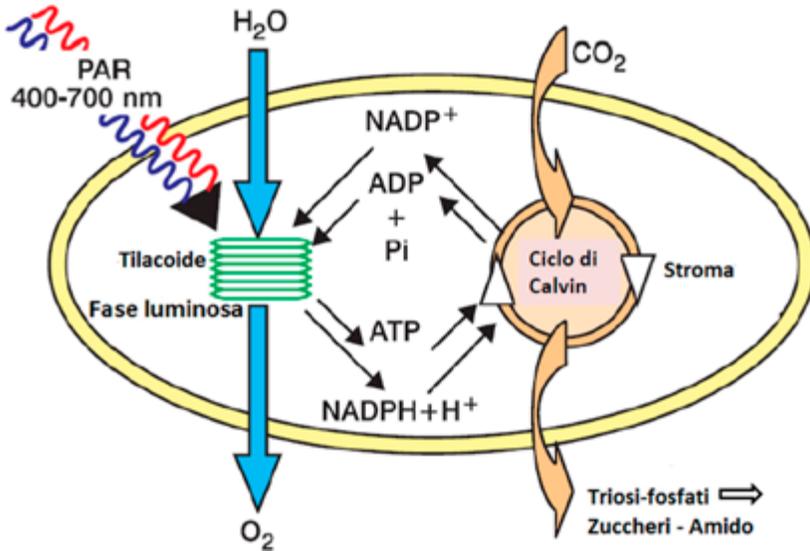
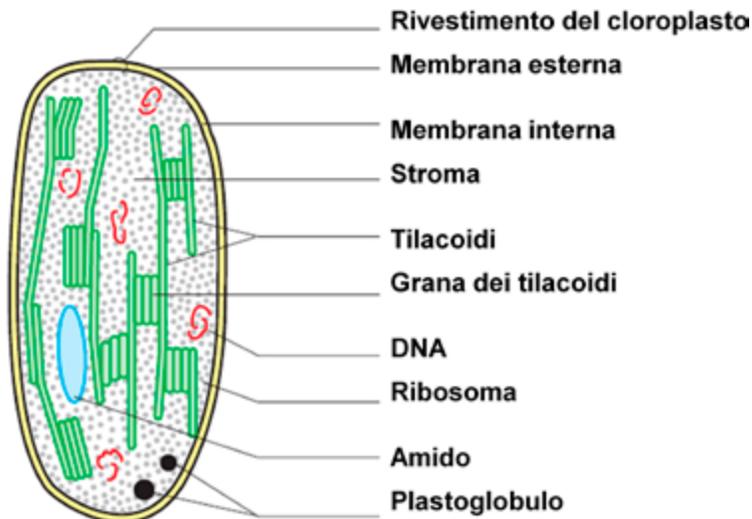


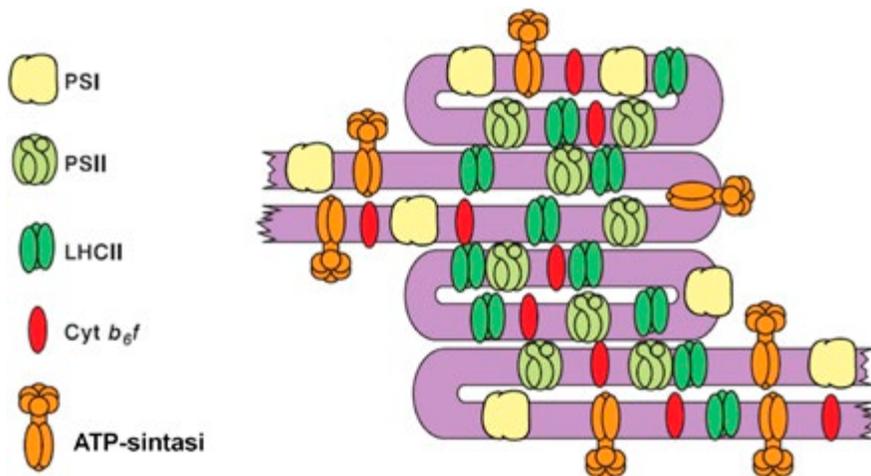
Figura 1.2 – Struttura del cloroplasto nelle piante superiori (da: <http://www.plantandsoil.unl.edu>. Ridisegnato da Janusz Golik)



inoltre acidi grassi polinsaturi e tracce di steroli che conferiscono alla membrana proprietà liquide, in modo da facilitare il movimento laterale delle proteine lungo la membrana stessa.

La fase luminosa della fotosintesi coinvolge i due fotosistemi PSI e PSII. Essi costituiscono la struttura principale dell'apparato fotosintetico, assieme al complesso del citocromo ed i trasportatori di elettroni. Tutte queste strutture si trovano nella membrana dei tilacoidi (Fig. 1.3). Il complesso antenna del PSII, assieme alle altre strutture adibite alla cattura della luce (chiamate LHCII - *Light Harvesting Complex of PSII*) si trova nella membrana dei tilacoidi non in contatto con lo stroma. Il PSI ed il complesso adibito alla produzione di ATP (ATP-sintasi) si trovano, invece, sulle membrane tilacoidali in contatto con lo stroma. Il complesso del citocromo (cyt b_6f) si trova sulle membrane sia in contatto che non in contatto con lo stroma. Infine, associato al PSII, è presente il sistema di fotolisi dell'acqua (OEC - *Oxygen Evolving Complex*).

Figura 1.3 – Distribuzione dei complessi proteici nelle membrane dei tilacoidi (da Steffen, 2003. Ridisegnato da Janusz Golik). PSI e ATP-sintasi sono distribuiti nella membrana a contatto con lo stroma, mentre il PSII non è a contatto con lo stroma e il complesso cyt b_6f è in tutte le parti dei tilacoidi.



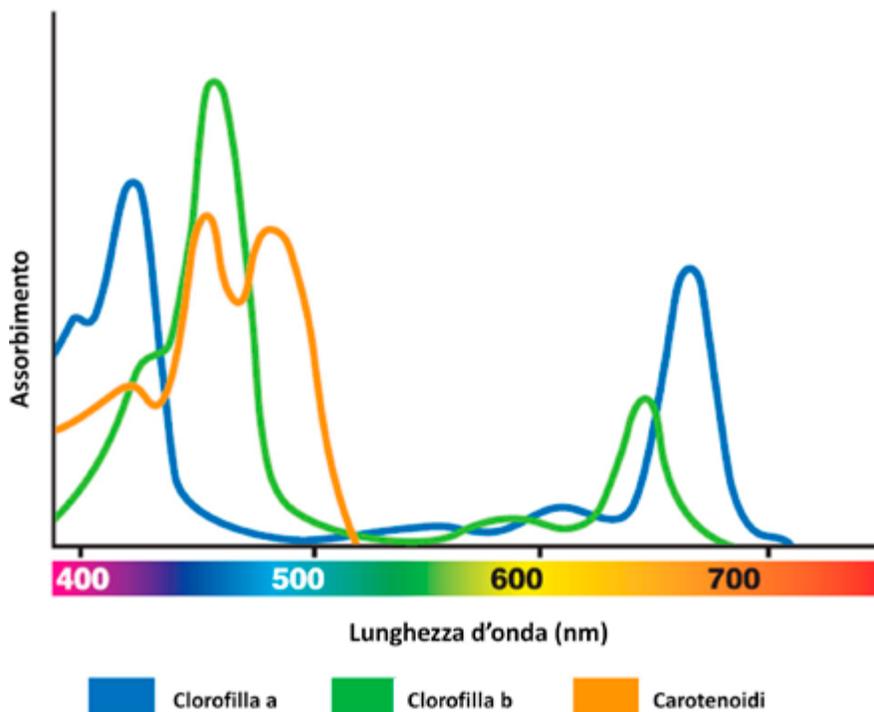
1.2.1. I pigmenti fotosintetici nelle piante superiori

I principali pigmenti fotosintetici, adibiti alla cattura della luce, sono rappresentati dalle clorofille, che conferiscono il colore verde alle foglie, e rappresentano circa il 4% del peso secco dei cloroplasti. Le piante verdi contengono due tipi di clorofilla: la clorofilla *a* (Chl_a), e la clorofilla *b* (Chl_b) (Fig. 1.4). Quest'ultima è circa 1/3 rispetto alla quantità di Chl_a .

18 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

Nelle alghe si possono trovare alcune varianti strutturali rispetto alla forma tipo della clorofilla. Queste varianti sono indicate con lettere consecutive dell'alfabeto. Ad esempio, la clorofilla *c* (Chl_c), e la clorofilla *d* (Chl_d) sono presenti nelle rodofite. Le differenze strutturali di questi pigmenti determinano le differenze nei loro spettri di assorbimento.

Figura 1.5 – Spettro di assorbimento dei principali pigmenti fotosintetici (da Szweykowska 1997. Ridisegnato da Janusz Golik)



Tutte le clorofille assorbono le radiazioni nella gamma di lunghezze d'onda 400 – 700 nm ed hanno due principali bande di assorbimento: la radiazione del blu (con maggiore energia) e la radiazione del rosso (con energia di livello inferiore).

Le soluzioni di clorofilla e solventi organici presentano massimi di assorbimento a circa 420 nm e 660 nm per la Chl_a e a 435 nm e 642 nm per la Chl_b (Fig. 1.5). Nei complessi pigmento-proteina, che si trovano nei cloroplasti, i massimi di assorbimento sono spostati verso lunghezze d'onde maggiori.

Oltre alle clorofille, nelle membrane dei tilacoidi sono inseriti altri pigmenti in grado di assorbire l'energia dei fotoni. Questi pigmenti sono i ca-

rotenoidi, presenti nelle piante superiori e nella maggior parte delle alghe, e le ficobiline che si trovano in alcuni gruppi di alghe e batteri.

I carotenoidi sono pigmenti di colore giallo-arancio e comprendono il carotene, il licopene e le xantofille. Questi pigmenti assorbono la radiazione solare a lunghezze d'onda diverse rispetto alla clorofilla: i carotenoidi assorbono la luce nel viola e nel blu. Agiscono sinergicamente con Chl_a e Chl_b per aumentare l'efficienza di assorbimento della luce (Fig. 1.6). Essi hanno tre massimi di assorbimento che si trovano, a seconda del tipo di carotenoide, a 420 – 425 nm, 440 – 450 nm ed a 470 – 480 nm.

Un'altra funzione importante dei carotenoidi è quella di proteggere i lipidi dei cloroplasti dalla fotossidazione, causata da alta intensità di radiazione luminosa. I carotenoidi possono catturare l'energia in eccesso dalle molecole di clorofilla eccitate impedendo la formazione di singoletti di ossigeno e di ROS (*Reactive Oxygen Species*). Differentemente dalla clorofilla, carotenoidi e ficobiline sono solubili in acqua.

1.2.2. I complessi antenna del PSII

L'assorbimento della radiazione fotosinteticamente attiva (PAR, *Photosynthetic Active Radiation*, lunghezze d'onda 400 – 700 nm) da parte dei pigmenti fotosintetici (clorofilla e carotenoidi) avviene tramite i complessi antenna dei fotosistemi, all'interno delle membrane tilacoidali (Fig. 1.6). Nei complessi antenna i pigmenti fotosintetici sono legati a proteine. I complessi antenna del PSII possono essere suddivisi in:

- antenne interne, costituite da complessi clorofilla-proteina, in particolare le proteine CP43 e CP47 che legano la clorofilla e il β -carotene. Queste antenne si trovano a contatto con il centro di reazione, a cui trasmettono l'eccitazione (vedi paragrafo successivo);
- antenna esterna tripartita, costituita da complessi pigmento-proteina per la cattura della luce (LHCII) e contenenti clorofilla *a* (Chl_a), clorofilla *b* (Chl_b) e xantofille.

Inoltre sono state caratterizzate tre proteine minori il cui ruolo sembra essere quello di legare fra loro Chl_a , Chl_b e le xantofille nel sistema antenna e la parte centrale del PSII.

I complessi pigmento-proteina del LHCII sono dei trimeri, i cui monomeri sono costituiti da una catena peptidica di 232 amminoacidi, otto molecole di Chl_a , sei molecole di Chl_b e quattro carotenoidi. Questi complessi hanno la possibilità di muoversi lateralmente nelle membrane dei tilacoidi a seconda del loro stato di fosforilazione. I complessi che acquisiscono lo stato fosforilato possono trasmettere l'energia al centro di reazione del PSII.

1.2.3. La struttura del fotosistema 2 (PSII)

Normalmente nei cloroplasti il PSII è più abbondante del PSI, con un rapporto stechiometrico di 1:5. Tuttavia tale rapporto può cambiare a seconda delle condizioni ambientali (la quantità di PSI aumenta in condizioni di forte illuminazione). Il PSII è localizzato nella membrana dei tilacoidi, non a contatto con lo stroma (Fig. 1.7), ed è costituito dalle antenne interne, l'antenna esterna (LHCII), e un centro di reazione costituito da due molecole di clorofilla con massimo assorbimento della luce a 680 nm (per questo motivo il centro di reazione del PSII è detto P680), la feofitina (Feo), la proteina D1 (cui si associa il plastochinone Q_B) e la proteina D2, che è invece associata al plastochinone Q_A .

Il PSII comprende anche il complesso che opera la fotolisi dell'acqua e il rilascio dell'ossigeno (OEC - *Oxygen Evolving Complex*). Esso si trova sulla superficie interna della membrana dei tilacoidi, a contatto con il lumen. L'OEC è il sito dell'ossidazione dell'acqua. È un sistema metallo-oxo (le specie metallo-oxo sono formate per l'ossidazione di metalli o complessi metallo-ossigeno da parte di agenti come il perossido di idrogeno) che contiene 4 ioni di manganese in uno stato di ossidazione da +3 a +5, e uno ione di calcio bivalente. Quando l'acqua viene ossidata, producendo O_2 e protoni, esso invia in sequenza 4 elettroni dall'acqua alla tirosina e, successivamente, al centro di reazione P680. La struttura dell'OEC è ancora oggetto di studio.

1.2.4. Il complesso del citocromo (cyt b_6f)

Il complesso del citocromo (cyt b_6f) rappresenta la connessione tra il PSII ed il PSI. È da questo complesso che transitano gli elettroni che serviranno per ridurre il NADP a NADPH, oppure verranno utilizzati per altre reazioni di riduzione. Esso si compone di 4 unità secondarie: il citocromo b_6 , il citocromo f; una proteina ferro-zolfo di Rieske ed una unità secondaria detta IV. In un primo momento l'idrochinone Q_BH_2 trasferisce la propria coppia di elettroni al complesso del citocromo: un elettrone viene donato alla proteina ferro-zolfo ed un altro elettrone al citocromo b_6 . La proteina ferro-zolfo, a sua volta, cede l'elettrone al citocromo f che lo trasferisce alla plastocianina (PC). L'altro elettrone viene ceduto al citocromo b_6 che lo veicola su un chinone B. A questo punto esiste una molecola radicalica $Q_B\bullet$ che, in quanto tale, è potenzialmente dannosa per la cellula vegetale. Per ridurre il rischio ossidativo derivante da $Q_B\bullet$, quando una ulteriore molecola di idrochinone arriva al citocromo, un nuovo elettrone viene trasferito alla proteina ferro-zolfo. Al contempo un altro elettrone termina la riduzione della specie radicalica ($Q_B\bullet$) che si era appena formata mettendo a disposizione una nuova molecola di idrochinone. In altre parole un chinone Q_B dapprima viene ridotto a radicale $Q_B\bullet$ e successivamente viene ridotto a Q_BH_2 .

Figura 1.6 – Schema semplificato del flusso energetico di elettroni nell'antenna del fotosistema 2 (PSII) (da Szweykowska, 1997. Ridisegnato da Janusz Golik).

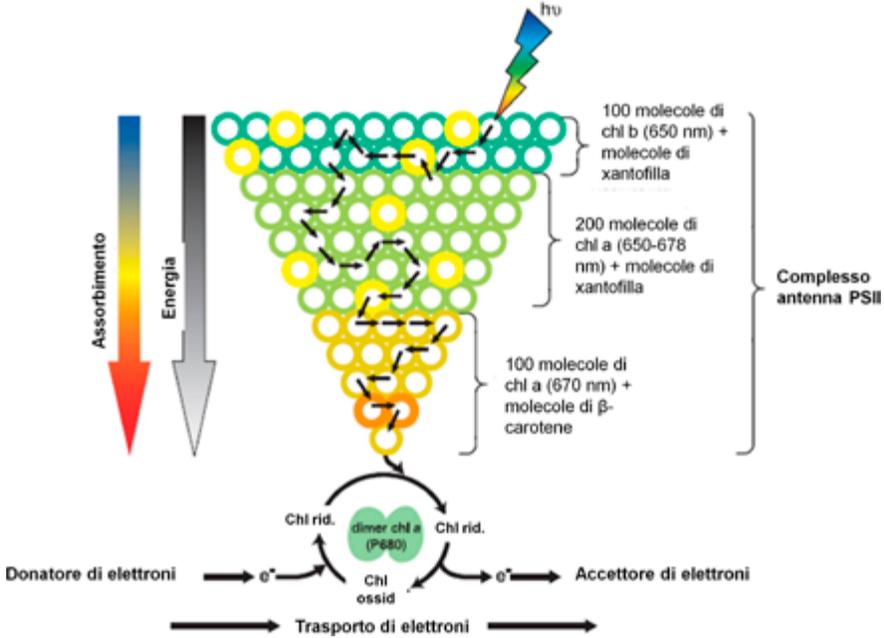
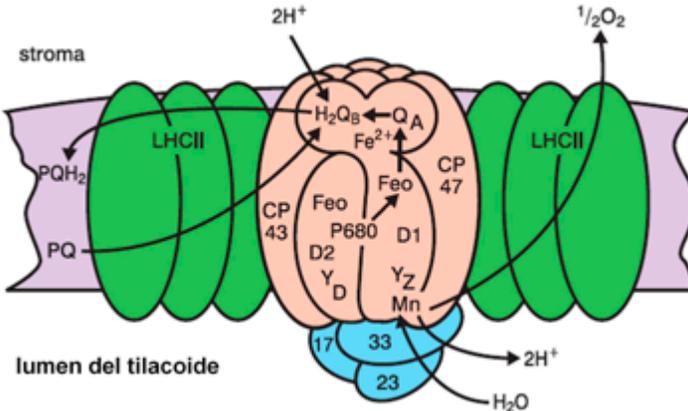


Figura 1.7 – Struttura del fotosistema 2 (PSII). LHCII = complesso antenna (Light Harvesting Complex) clorofilla-proteine; CP43, CP47 = proteine che legano la clorofilla alla struttura centrale dell'antenna del PSII; Feo = feofitina; 17, 23 e 33: complessi polipeptidici dell'OEC (Oxygen Evolving Complex); P680 = centro di reazione del PSII; D1 e D2 proteine del centro di reazione; Q_A = plastochinone A; H₂Q_B: plastochinone B ridotto e successivamente protonato; Y_D, Y_Z = tirosina associata rispettivamente alle proteine D1 e D2 (da Steffen, 2003. Ridisegnato da Janusz Golik).



1.2.5. La struttura del fotosistema I (PSI)

Il fotosistema 1 è situato sulla membrana del tilacoide a contatto con lo stroma. Fa parte del PSI il complesso antenna LHCI, contenente Chl_a e Chl_b nel rapporto 4: 1, carotenoidi e polipeptidi. Il centro di reazione è formato da due molecole di Chl_a con massimo assorbimento a 700 nm (per questo motivo il centro di reazione del PSI è detto P700), una clorofilla monomericamente che agisce da accettore immediato dell'elettrone proveniente dal PSII, due molecole di fillochinone (vitamina K1) che è il probabile accettore secondario del PSI, una proteina ferro-zolfo, una plastocianina (PC) e una ferredossina (Fd). Quest'ultima è l'accettore finale degli elettroni eccitati. Sul lato esterno della membrana del tilacoide, a contatto con lo stroma, si trova la ferredossina (Fd) e l'enzima Fd NADP⁺ reductasi (FNR), che catalizza il trasferimento di elettroni da Fd a NADP⁺ (Fig. 1. 8).

1.2.6. L' ATP-sintasi

L'ATP-sintasi della membrana del tilacoide è chiamata anche complesso CF_1 - CF_0 . Il componente CF_0 è idrofobo ed è inserito nella membrana del tilacoide. Esso trasporta protoni dallo stroma allo spazio interno dei tilacoidi (lumen) e forma un canale costituito da 6 catene proteiche appartenenti ad almeno tre differenti tipi. Il componente CF_1 , è costituito da almeno 5 tipi differenti di catene (2 unità principali α , β e 3 subunità γ , δ , ϵ) ed è situato sul lato esterno del tilacoide a contatto con lo stroma (Fig. 1.9). Esso contiene il centro catalitico per la formazione di ATP a partire da ADP.

1.3. I processi della fase luminosa della fotosintesi

1.3.1. L'assorbimento della radiazione fotosinteticamente attiva

Quando una molecola di clorofilla o di altri pigmenti fotosintetici situati nell'antenna LHCI del PSII viene colpita dalla luce, essa assorbe fotoni e passa da un livello energetico di base ad un livello superiore. In questo stato la clorofilla entra in risonanza, trasmettendo l'energia alle molecole di clorofilla vicine, e tornando così al livello energetico di base (de-eccitazione). Tale trasferimento di energia è sempre associato ad una perdita energetica. Più piccola è la distanza tra le molecole di pigmento, maggiore è la probabilità del trasferimento di energia. L'efficienza del trasferimento di energia tra molecole di clorofilla è vicina al 100%, ed è inferiore quando vi è un trasferimento tra molecole di clorofilla e carotenoidi. La perdita di energia a livello dell'antenna da origine al fenomeno della fluorescenza (vedi capitolo 2).

Quando l'energia è trasmessa al centro di reazione P680 l'elettrone viene trasferito all'accettore primario feofitina (Feo), una molecola con strut-

Figura 1.8 – Struttura del PSI. LHCI = complesso antenna (Light Harvesting Complex) clorofilla-proteine, contenente polipeptidi Lhca 1-4; A, B ... N = polipeptidi legati all'antenna; P700 = centro di reazione del PSI; A₀ = molecola di clorofilla; A₁ = fillochinone (vitamina K1); proteine ferro-zolfo F_x, F_A e F_B; PC = plastocianina; Fd = ferredossina; FNR = ferredossina-riduttasi (da <http://www.absoluteastronomy.com/topics/Photosystem>. Ridisegnato da Janusz Golik)

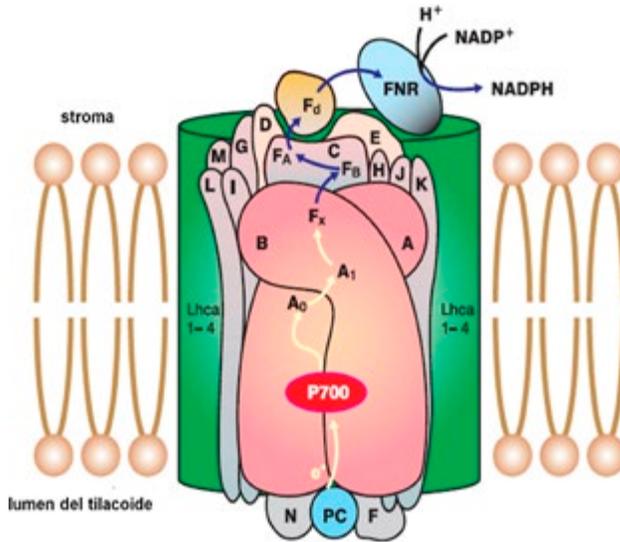
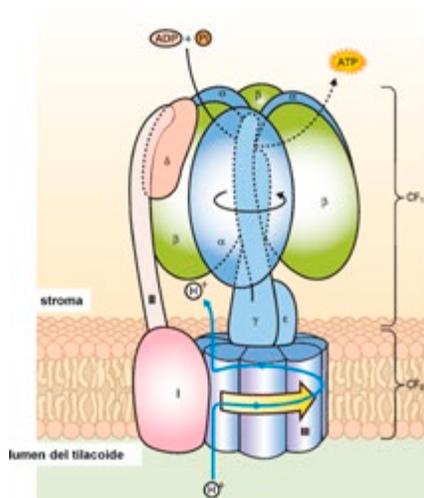


Figura 1.9 - Struttura dell'ATP-sintasi. CF₀ = componente idrofobo, inserito nella membrana del cloroplasto; CF₁ = componente idrofilo, inserito nello stroma, dove avviene l'attività catalitica. Le lettere e i numeri indicano le subunità della struttura (da Boyer, 1997. Ridisegnato da Janusz Golik).



24 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

tura simile a quella della clorofilla. La reazione di separazione di carica avviene secondo il seguente schema:



Tale reazione è estremamente veloce (avviene in un tempo di circa 0.4 nanosecondi).

L'energia si trasferisce al plastoquinone PQ_A , che è situato sulla proteina D2 ed è il primo accettore di elettroni stabile del PSII. La molecola di clorofilla ossidata $P680^+$ è successivamente neutralizzata da un elettrone ricevuto dalla tirosina (TyrZ), proveniente dal complesso di ossidazione dell'acqua (OEC) ($\text{TyrZ } P680^+ \rightarrow \text{TyrZ}^+ P680$).

1.3.2. Il trasporto degli elettroni non ciclico e fotofosforilazione

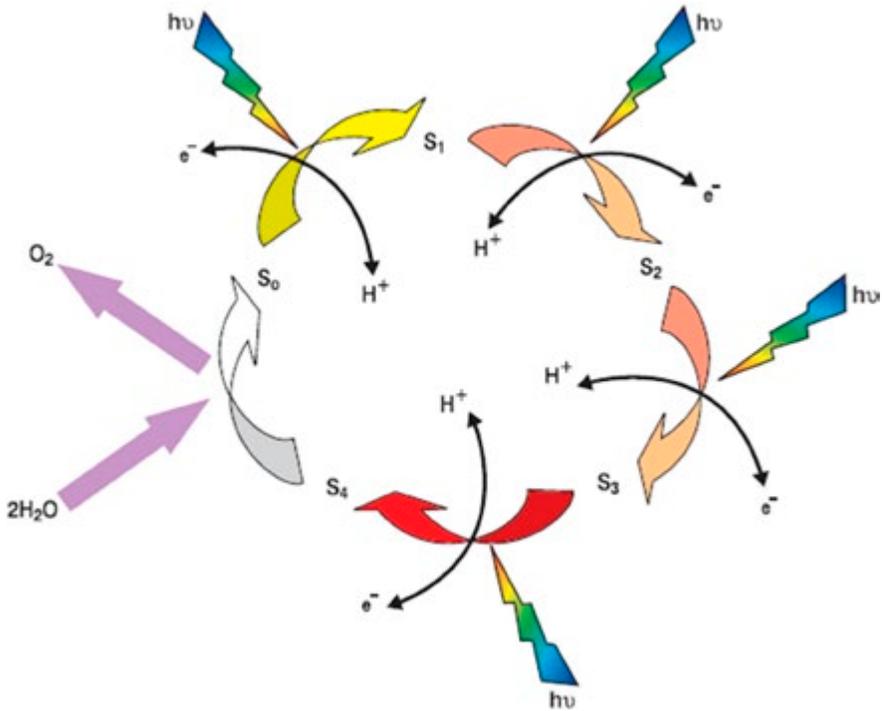
Si definisce lineare, o non ciclico, il meccanismo di trasporto degli elettroni che prende inizio con la dissociazione dell'acqua nell'*Oxygen Evolving Complex* (OEC) presso il PSII, e si conclude con la riduzione degli accettori finali oltre il PSI.

I primi eventi connessi al trasporto non ciclico degli elettroni avvengono nel PSII, ad opera del complesso di fotolisi dell'acqua, che è situato sulla parte interna della superficie della membrana tilacoidale. Questo complesso è formato da 4 atomi di manganese, la tirosina 161 connessa con la proteina D1, e un gruppo di proteine. Durante la fotolisi, da due molecole di acqua vengono sottratti 4 elettroni che, a loro volta, vengono trasmessi al centro di reazione ossidato del PSII ($^+P680$).

Il modello di fotossidazione dell'acqua è conosciuto come "meccanismo dello stato S'' ", e consiste in una serie di 5 stati (da S_0 a S_4), costituenti forme sempre più ossidate dell'OEC (Fig. 1.10). Impulsi luminosi sequenziali fanno avanzare il sistema fino allo stato di ossidazione S_4 . S_4 produce O_2 senza ulteriore bisogno di luce, e quindi fa tornare il sistema allo stato di ossidazione iniziale (S_0). I protoni si accumulano all'interno del lumen, aumentando il gradiente di concentrazione attraverso la membrana tilacoidale, formando in tal modo la forza trainante del processo di produzione di ATP. L'ossigeno prodotto viene diffuso al di fuori del cloroplasto. In questo modo gli organismi fotosintetici possono utilizzare l'acqua come fonte di elettroni e ioni idrogeno (il gradiente H^+ è necessario per la sintesi di ATP) necessari per la riduzione della CO_2 e per la produzione di O_2 .

Esiste un carrier di elettroni, genericamente indicato come Y_z , che opera fra l'OEC e il centro di reazione del PSII ($P680$). Questo carrier, che ha una spiccata capacità a trattenere gli elettroni, è un radicale formato da un residuo di tirosina nella proteina D1. Il primo accettore di elettroni del PSII è la feofitina (Feo), che li trasmette ai due plastoquinoni PQ_A e PQ_B .

Figura 1.10 - Schema rappresentante l'ossidazione del manganese nel processo di dissociazione dell'acqua (stati di ossidazione del complesso del manganese, S_0, S_1, \dots, S_4 , produzione di idrogeno H^+ e rilascio dell'ossigeno (da: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/e/e7/Oxygen_evolving. Ridisegnato da Janusz Golik)



La riduzione dell'accettore PQ_A^- impedisce un'ulteriore separazione di carica nel centro di reazione PSII, aumentando così l'emissione di fluorescenza della clorofilla. In queste condizioni il centro di reazione è definito chiuso (*close center*). La trasmissione degli elettroni da PQ_A a PQ_B ($PQ_A^- \rightarrow PQ_B$), quest'ultimo situato sulla proteina D1, comporta la riapertura del centro di reazione e la diminuzione dell'intensità di fluorescenza. Acquisendo poi due elettroni dalla parte stromatica della membrana, da PQ_B viene formata una molecola di plastoidrochinone ($PQ_B^{2-} + 2H^+ \rightarrow PQH_2$). Questa molecola si separa dalla proteina D1 ed entra nella porzione idrocarburica della membrana, trasferendo i suoi due elettroni al complesso del citocromo $cyt\ b_6/f$. Come risultato, vengono liberati due protoni che sono trasferiti nel lumen del tilacoide. Il complesso $cyt\ b_6/f$ interagisce così con il pool del plastochinone agendo come una pompa protonica. Ciò comporta un aumento di acidità nel lumen dei tilacoidi. Di conseguenza è intensificata l'azione della pompa protonica attraverso la membrana tilacoideale, che è la forza trainante del processo di produzione di ATP.

Gli elettroni provenienti dal complesso del citocromo sono convogliati alla plastocianina (PC), che è un trasportatore mobile di elettroni contenente rame. L'elettrone viene trasportato dallo ione rame, che passa da una forma ossidata (Cu^{++}) ad una forma ridotta (Cu^+). Questa proprietà permette alla plastocianina di trasferire gli elettroni al centro di reazione ossidato P700^+ , a seguito dell'eccitazione del PSI. La riduzione del P700^+ da parte della PC avviene in un tempo che varia da 20 a 200 microsecondi.

La sequenza di reazioni di ossidoriduzione consente il trasferimento di elettroni tra trasportatori successivi, aumentando il loro potenziale di ossidoriduzione. La trasmissione di elettroni ad alta energia, lungo una catena di trasporto situata fra i complessi PSII e PSI, e la successiva riduzione degli accettori finali è parte essenziale del trasporto non ciclico. L'attività del PSII interagisce strettamente con quella del PSI. L'energia luminosa assorbita dai pigmenti nelle antenne del PSI viene trasferita al centro di reazione P700 in maniera analoga a quanto già descritto per il PSII. L'eccitazione del P700 causa una separazione di carica fra il P700^+ ossidato e gli elettroni eccitati.

Il centro di reazione ossidato del PSI (P700^+) acquista un elettrone da PC^- , e viene così ridotto. Nel tempo di 15 picosecondi, l'elettrone è trasferito ad una molecola di clorofilla (A_0) che funge da accettore iniziale, riducendola ad A_0^- . In questo modo viene stabilizzata la separazione di carica nel P700 . Gli elettroni ad alta energia, nei successivi 50 picosecondi, vengono trasferiti lungo una catena di trasportatori, che comprende A1 (fillochinone, proteina K1) ed una serie di proteine ferro-zolfo, fino a ridurre la ferredossina (Fd). L'accettore finale si trova sul lato esterno della membrana tilacoidale. In prossimità della ferredossina è situato l'enzima ferredossina NADP^+ riduttasi (FNR), che catalizza il trasferimento di elettroni da Fd a NADP^+ per produrre NADPH , prelevando un protone dallo stroma. Il tempo di trasferimento di elettroni da P700 a Fd è di circa 100 microsecondi. La reazione di riduzione del NADP^+ può essere riassunta in:

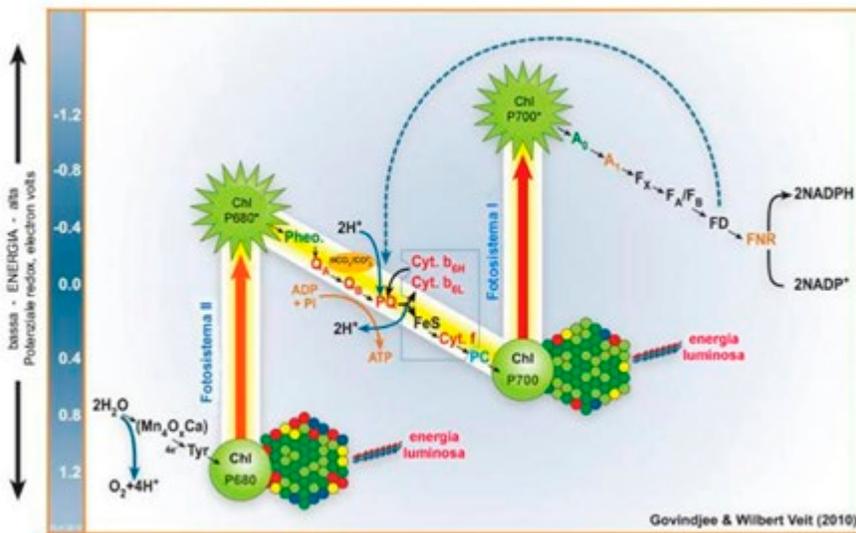


Durante il trasporto non ciclico degli elettroni, si verifica un gradiente di carica protonica fra i due lati della membrana tilacoidale. L'immissione di protoni nel lumen dei tilacoidi, compresi quelli generati dalla fotolisi dell'acqua, ne provoca l'acidificazione (fino ad un pH 3, 5), a fronte di pH relativamente alto (basico) nello stroma. Questo gradiente favorisce il deflusso di protoni, dal lumen allo stroma, attraverso l'ATP-sintasi con conseguente produzione di ATP, proporzionalmente alla intensità e alla velocità del trasporto degli elettroni. Un gradiente protonico troppo elevato può limitare il trasporto di elettroni nel complesso del citocromo b_6f , bloccando il loro trasporto al PSI.

La descrizione delle fasi degli eventi bioenergetici che vanno dalla fotolisi dell'acqua alla riduzione del NADP^+ sono sintetizzati in un diagram-

ma noto come “Schema Z” (Fig. 1.11). Il trasporto degli elettroni avviene da sinistra a destra nel grafico tramite la riduzione di accettori successivi, secondo la pendenza raffigurata fra il PSI e il PSII la quale, sulle ordinate rappresenta la perdita del potenziale di ossidoriduzione (potenziale redox). Il trasporto degli elettroni avviene spontaneamente secondo questa direzione (dall’alto verso il basso, da sinistra verso destra). Elettroni ad alta energia vengono generati nei centri di reazione di entrambi i fotosistemi eccitati dalla luce. Le frecce verticali rappresentano i centri di reazione eccitati P680 e P700.

Figura 1.11 – “Schema Z”, rappresentazione schematica delle fasi e dei processi del trasporto fotosintetico degli elettroni (da <http://www.life.illinois.edu/govindjee/>, Govindjee and Wilbert Veit 2010). Tyr: tirosina. Chl P680, Chl P700: centri di reazione rispettivamente dei fotosistemi PSII e PSI. Chl P680* e Chl P700*: centri di reazione dei due fotosistemi allo stato eccitato. Pheo: feofitina. Q_A e Q_B : molecole di plastochinone A e B. PQ: pool dei plastochinoni. Cyt f: citocromo f; Cyt b6: citocromo b6 nella forma ad alta (H) e bassa (L) energia. PC: plastocianina. A_0 : molecola di clorofilla, accettore primario di PSI. A_1 : vitamina K. F_X , F_A e F_B : proteine ferro-zolfo. FD: ferredossina. FNR: ferredossina $NADP^+$ riduttasi per la formazione di $NADPH$ (Spiegazione dei processi nel testo).



1.3.3. Il trasporto ciclico di elettroni

Un’alternativa al trasporto di elettroni non ciclico è rappresentata dal trasporto ciclico e dalla fotofosforilazione associata. Il trasporto ciclico si verifica quando la disponibilità di $NADP^+$ è insufficiente, come ad esempio in condizioni di eccessiva radiazione luminosa. Questa via alternativa include il PSI e trasportatori di elettroni quali la ferredossina, i plastochinoni,

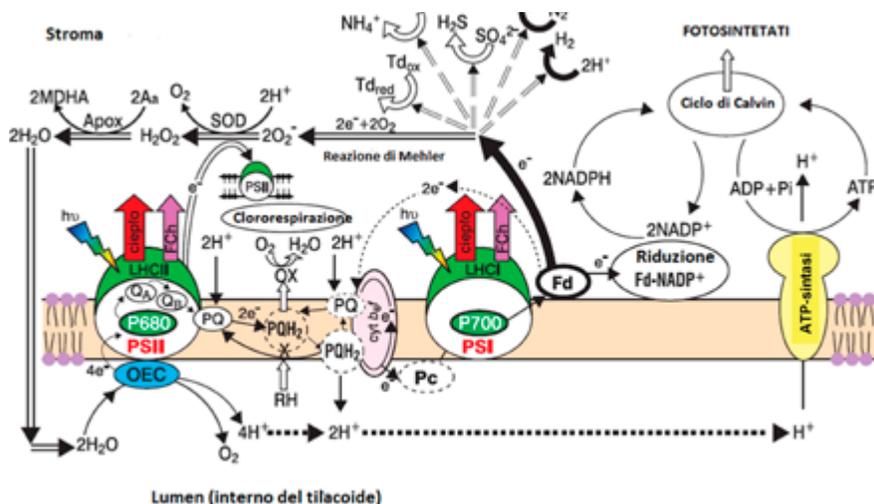
28 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

il complesso del citocromo b_6f e la plastocianina. Anziché ridurre il NADP^+ , la ferredossina trasmette l'elettrone a $\text{cyt } b_6f$ consentendo il trasferimento di protoni dallo stroma al lumen. L'elettrone torna poi a PC che lo invia nuovamente al centro di reazione P700^+ .

Questo processo può essere ripetuto, aumentando ogni volta il gradiente protonico fra il lumen dei tilacoidi e lo stroma. Ciò permette la sintesi di ATP da parte del complesso ATP-sintasi (fotofosforilazione ciclica).

Tramite il trasporto di elettroni non ciclico vengono sintetizzati NADPH e ATP. Il trasporto ciclico, d'altra parte, ha come unico prodotto l'ATP (Fig. 1.12).

Figura 1.12 – Trasporto e trasformazione dell'energia luminosa nei cloroplasti. PSII e PSI: fotosistema I (centro di reazione P680) e II (centro di reazione P700). OEC: oxygen evolving complex. Q_A e Q_B^- : sito del plastochinone A sulla proteina D2, e del plastochinone B sulla proteina D1. PQ e PQH^+ : plastochinone e plastochinolo (forma ridotta del plastochinone). PC: plastocianina. Fd: ferredossina. Td(ox) e Td(red): forma ossidata e ridotta della tioredossina. LHCII e LHCI: Light Harvesting Complex al PSII e al PSI. SOD: superossido dismutasi. Aa: acido ascorbico. Apox: ascorbato perossidasi. MDHA: monodeidro-ascorbato. Fch: fluorescenza della clorofilla.



1.3.4. Il trasporto pseudociclico di elettroni e fosforilazione pseudociclica

La fosforilazione pseudociclica e il trasporto pseudociclico degli elettroni avvengono quando gli elettroni trasportati dalla ferredossina oltre il PSI non vanno a ridurre il NADP^+ , ma riducono delle molecole di ossige-

no provenienti dalla fotolisi dell'acqua ($2e^- + 2O_2 \rightarrow 2O_2^-$). Questo ciclo è noto anche come reazione di Mehler, e comporta la formazione di anioni $2O_2^-$ (radicale perossido) e, in una fase successiva, di H_2O_2 . Queste sostanze chimiche fanno parte delle cosiddette ROS (*Reactive Oxygen Species*), e sono forti ossidanti, quindi composti pericolosi per la cellula.

Il trasporto pseudociclico costituisce una forma di fotoinibizione perché impedisce il trasporto di elettroni verso il ciclo di Calvin-Benson, e quindi inibisce l'assimilazione della CO_2 .

Una sintesi complessiva delle reazioni che si verificano nella fase luminosa della fotosintesi è mostrata nella Figura 1.12.

1.4. Il ciclo di Calvin-Benson e la fissazione di CO_2 (la "fase oscura della fotosintesi")

La radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) assorbita dai pigmenti viene utilizzata per la sintesi di ATP e NADPH. Questi due prodotti della fase luminosa sono utilizzati per la sintesi degli zuccheri, a partire da CO_2 e H_2O , nel ciclo di Calvin-Benson. Il ciclo di Calvin-Benson (detto anche "fase oscura" perché consiste di reazioni enzimatiche non dipendenti dalla luce) consiste nella fissazione di anidride carbonica (CO_2) e la sintesi degli zuccheri mediante reazioni di ossidoriduzione che implicano l'uso dell'ATP e NADPH prodotti durante la fase luminosa.

La fissazione dell'anidride carbonica (carbossilazione) avviene su un substrato organico (ribulosio-1, 5-bisfosfato, RuBP) a 5 atomi di carbonio. Questa reazione è catalizzata da un enzima chiamato ribulosio-1, 5-bisfosfato carbossilasi ossidasi (Rubisco), e avviene nello stroma del cloroplasto. La Rubisco è considerata un enzima inefficiente perché agisce molto lentamente. Per questo motivo la pianta necessita di grandi quantità di questo enzima. La Rubisco rappresenta da sola circa il 50% delle proteine implicate nella fotosintesi, ed è probabilmente la proteina più abbondante della biosfera.

La fissazione del carbonio e la produzione di glucosio avviene attraverso un ciclo di reazioni enzimatiche (ciclo di Calvin-Benson). L'intero ciclo è descritto in tre fasi (carbossilazione, riduzione e rigenerazione), nel corso delle quali viene prodotto l'acido 3-fosfoglicerico (PGA), necessario per la sintesi degli zuccheri e, al termine del ciclo stesso, viene ricostituito il prodotto di partenza (RuBP).

La carbossilazione del ribulosio-1, 5-bisfosfato porta alla formazione di un composto instabile a 6 atomi di carbonio che si divide velocemente in due molecole a 3 atomi di carbonio, l'acido 3-fosfoglicerico (PGA). Da 3 molecole di RuBP carbossilato si ottengono 6 molecole di PGA. Queste 6 molecole vengono ridotte ottenendo 6 molecole di gliceraldeide-3-fosfato (GAP). Di queste, 1 esce dal ciclo per andare a formare del glucosio (per una molecola di glucosio occorrono 6 molecole di PGA), mentre le altre 5 vanno a riformare il RuBP per la cattura di una successiva molecola di CO_2 .

Gli zuccheri prodotti possono essere utilizzati per la sintesi di saccarosio, amido, e molti altri composti organici. Nella maggior parte delle piante i primi prodotti della incorporazione di CO_2 nel ciclo di Calvin-Benson sono composti a tre atomi di carbonio (PGA) e quindi questo ciclo fotosintetico è chiamato C3.

Nelle piante con ciclo fotosintetico C3 la Rubisco può operare in due modi: come carbossilasi e come ossigenasi. In quest'ultimo caso, a seguito dell'ossidazione del RuBP, si forma acido 3-fosfoglicerico e fosfoglicolato. Questo prodotto alimenta il processo della fotorespirazione, con un consumo netto di carbonio organicato. La fotorespirazione è un processo di tipo respiratorio, dipendente dalla luce. Attraverso vari passaggi, partendo da 2 molecole di fosfoglicolato, viene formato acido glicerico e CO_2 con dispendio di ATP. Il glicerato, quindi, può ritornare al cloroplasto, dove viene riconvertito in PGA. La fotorespirazione è quindi un processo dissipativo, ed ha una duplice funzione: (i) consente di mantenere una elevata concentrazione di CO_2 all'interno dei cloroplasti in condizioni di chiusura stomatica (quando cioè la CO_2 intercellulare viene consumata e si instaura un ambiente ossidativo); (ii) è un meccanismo che utilizza i ROS (*Reactive Oxygen Species*) riducendo pertanto i rischi che derivano da questi composti.

Alle condizioni standard (temperatura di 25°C , con 21% di O_2 e 0,039% di CO_2) l'attività enzimatica di carbossilazione della Rubisco è quasi tre volte più elevata dell'attività di ossigenazione. La Rubisco ha un'affinità più elevata per la CO_2 rispetto all' O_2 , per questo motivo, la concentrazione intracellulare di CO_2 è di primaria importanza nell'attivazione dell'enzima. Per effetto della maggiore concentrazione atmosferica di O_2 rispetto alla CO_2 , nella fase oscura il rapporto carbossilazione/ossigenazione è in genere variabile da 3:1 a 4:1. In altre parole circa il 25% dell'attività della Rubisco è dedicata alla fotorespirazione. Rapporti più svantaggiosi vengono raggiunti in presenza di elevate temperature poiché, in queste condizioni, l'ossigenazione aumenta più rapidamente della carbossilazione e l'assimilazione diminuisce per effetto della rallentata rigenerazione di RuBP.

1.4.1. La fotosintesi C4

Alcune piante hanno sviluppato adattamenti all'aridità che implicano la fissazione della CO_2 per mezzo di un enzima diverso dalla Rubisco. In queste piante l'anidride carbonica è fissata su un substrato organico a tre atomi di carbonio (acido fosfoenolpiruvico, PEP) tramite un enzima chiamato PEP-carbossilasi (PEPc). La fissazione della CO_2 avviene nelle cellule del mesofillo e provoca la formazione di un primo composto stabile a 4 atomi di carbonio (ossalacetato). Per questo motivo il processo fotosintetico qui descritto è chiamato C4. Sono piante C4 il granturco, il sorgo, la canna da zucchero e molte piante erbacee. L'ossalacetato, sintetizzato nelle cellule del mesofillo, viene poi ridotto ad acido malico per l'azione di NADPH,

e in questa forma viene trasferito nelle cellule della guaina del fascio che, nelle piante C₄, hanno una particolare anatomia, detta anatomia Kranz. In queste cellule l'acido malico viene decarbossilato a piruvato con il conseguente rilascio di CO₂.

Ci sono tre differenti meccanismi usati dalle piante C₄ per trasportare il carbonio all'interno delle cellule della guaina del fascio e rigenerare la PEP_C. Queste vie sono note come NAD-ME, NADP-ME e PEPCK, a seconda del principale enzima usato per la decarbossilazione (enzima malico NAD-specifico, enzima malico NADP specifico e fosfoenolpiruvato carbossichinasi). Di questi, NAD-ME a NADP-ME sono i meccanismi più comuni e hanno la maggiore distribuzione nei gruppi tassonomici dei vegetali.

La CO₂ liberata nelle cellule della guaina del fascio è immediatamente fissata dalla Rubisco dando inizio al ciclo di Calvin-Benson. In queste cellule la concentrazione di O₂ è molto bassa. Per cui l'attività di ossigenasi della Rubisco (e la fotorespirazione) è vicina a zero, aumentando la resa fotosintetica. La fotosintesi netta (P_N) è uguale a (P_L - P_R), dove P_L è la fotosintesi lorda e P_R è la fotorespirazione. Il tal modo le piante C₄ sfruttano meglio la CO₂ rispetto a quelle C₃, e ciò conferisce loro una maggiore efficienza nell'utilizzazione delle risorse.

Le piante C₄ sono meglio adattate all'aridità delle C₃ perché la CO₂ viene fissata sul substrato PEP_C quando sono attivi gli scambi gassosi fra la foglia e l'atmosfera (cioè quando gli stomi sono aperti), e viene resa disponibile per il ciclo di Calvin-Benson anche in condizione di stomi chiusi. In tal modo le piante C₄ sono in grado di fotosintetizzare anche in condizioni di stress idrico, a differenza di quanto avviene nelle piante C₃. Un altro tipo di processo fotosintetico è la cosiddetta fotosintesi CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*), o metabolismo acido delle *Crassulaceae*. Allo scopo di limitare le perdite idriche, queste piante tengono gli stomi aperti di notte e chiusi di giorno. Di notte avviene la carbossilazione dell'acido fosfoenolpiruvico (PEP) e la riduzione dell'ossalacetato a malato, che si accumula nei vacuoli. Durante il giorno, in modo simile alle piante C₄, il malato viene decarbossilato e la CO₂ derivante è utilizzata nel ciclo di Calvin-Benson.

La fluorescenza della clorofilla *a*

2.1. Cosa è la fluorescenza

La luce raggiunge la superficie delle foglie (o di altri recettori fotosintetici come fusti, fiori, frutti verdi, licheni, alghe, batteri fotosintetici ecc.) sotto forma di fasci di fotoni che vengono assorbiti dalle molecole dei pigmenti fotosintetici, e soprattutto dalla clorofilla. Questi pigmenti sono organizzati nei complessi antenna per massimizzare l'efficienza della raccolta della luce. L'energia assorbita viene trasferita verso i centri di reazione dei fotosistemi (PSII e PSI), e utilizzata per alimentare le reazioni fotochimiche. Una parte di questa energia non raggiunge il centro di reazione ed è dissipata sotto forma di calore dall'antenna stessa. Un'altra parte, pur raggiungendo il centro di reazione, viene riemessa sotto forma di fluorescenza. La fluorescenza rappresenta pertanto una forma di dissipazione dell'energia (Fig. 2.1), secondo l'equazione:

$$\text{Energia assorbita} = \text{attività fotochimica} + \text{perdita per calore} + \text{perdita per fluorescenza}$$

La quantità di energia dissipata in forma di fluorescenza durante la fotosintesi è piccola, va dal 3% al 5% (Fig. 2.1). La fluorescenza rimane su livelli modesti quando la fotosintesi si svolge regolarmente e senza problemi. L'incremento dell'emissione di fluorescenza indica una riduzione dell'efficienza della fotosintesi (Lichtenthaler e Rinderle, 1988).

Dopo aver assorbito un elettrone, la molecola di clorofilla raggiunge un livello superiore di eccitazione energetica formando un singoletto. Il livello di eccitazione energetica dipende dalla lunghezza d'onda del fotone assorbito: essa è maggiore se questa è nel blu o violetto, ed è minore se è nel rosso. La clorofilla può passare da uno stato di eccitazione superiore ad uno

stato inferiore, con un trasferimento interno di energia. Questa transizione ha la durata dell'ordine di alcuni femtosecondi (10^{-15} s). In un tempo appena più lungo (10^{-13} s) la clorofilla passa ad uno stato di bassa eccitazione e l'energia in eccesso viene dispersa come calore (Fig. 2.2). La molecola di clorofilla tende a tornare rapidamente (circa 10^{-9} s) allo stato base di eccitazione. L'energia di eccitazione delle molecole di clorofilla viene dissipata per mezzo di calore, o tramite emissione di fluorescenza ($\lambda_{\max} = 685$ nm). L'energia rimanente è usata nel trasporto fotosintetico di elettroni (reazioni fotochimiche).

La fluorescenza deriva sempre da una perdita di energia allo stato inferiore di eccitazione della clorofilla, e quindi viene emessa nelle lunghezze d'onda del rosso. Nello spettro della fluorescenza, la massima lunghezza d'onda di emissione è superiore a quella con cui la luce viene assorbita dalla clorofilla (Fig. 2.3). Il picco di emissione di fluorescenza in una soluzione di clorofilla è a 668 nm, mentre il massimo assorbimento si verifica a 663 nm. Questa differenza si chiama "*Stokes shift*". Il picco massimo di emissione di fluorescenza in una foglia a temperatura ambiente è a 685 nm (Hall e Rao, 1999), e lo spettro di fluorescenza si estende fino a 800 nm (Krause e Weis, 1984).

Mediamente nella foglia la Chl_a è tre volte più abbondante della Chl_b . Nelle foglie sane la fluorescenza viene emessa quasi esclusivamente da molecole di Chl_a situate per lo più nel PSII. Infatti l'energia di eccitazione della clorofilla *a* viene trasferita alla clorofilla *b* quasi per il 100%.

Gli studi sulla fluorescenza della clorofilla hanno utilizzato diversi inibitori del trasporto degli elettroni nella fase luminosa della fotosintesi, come DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea), e il paraquat (1,1'-Dimetil-4,4'-bipiridinio dicloruro). Sfruttando la capacità del DCMU di bloccare il trasporto degli elettroni oltre il Q_A , e tramite il congelamento alla temperatura di 77 K, negli ultimi decenni è stato possibile effettuare studi sull'apparato fotosintetico. In condizioni di temperature molto basse (77 K), gli spettri delle emissioni di fluorescenza della clorofilla mostrano bande ben distinte e caratteristiche per i complessi antenna del PSII e del PSI, fornendo informazioni circa lo stato e la distribuzione di energia tra i due fotosistemi (Strasser et al., 2004). Alla temperatura di 77 K ci sono tre massimi nello spettro di emissione della fluorescenza: a 685, a 695 e a circa 735 nm. I primi due provengono da PSII, mentre il picco a 735 nm proviene dal PSI (Schreiber et al., 2000).

La resa quantica (*yield*) di fluorescenza della clorofilla (Φ_F) è definita come il rapporto fra il numero di fotoni di fluorescenza emessa e il numero totale di fotoni assorbiti. Esso può essere calcolato usando la seguente formula:

Dove:

Φ_F è la resa quantica (*yield*) della fluorescenza della clorofilla,
 k_f è la costante della fluorescenza della clorofilla,

Figura 2.1 – Ripartizione della luce assorbita dalla foglia. PAR: radiazione fotosinteticamente attiva. UV: radiazione ultra-violetta. FR: radiazione rosso lontana (far red). IR: radiazione infrarossa.

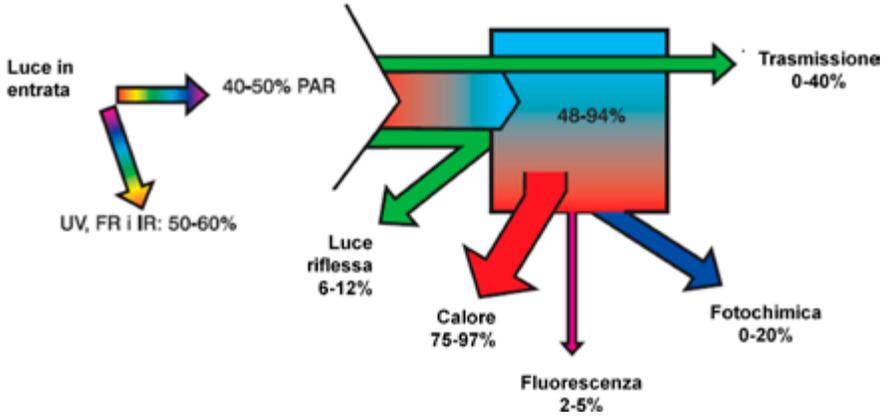


Figura 2.2 – Cambiamenti dei livelli energetici in una molecola di clorofilla dopo aver assorbito la luce, e ritorno allo stato energetico di base (da: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Pistates.jpg>. Ridisegnato da Janusz Golik).

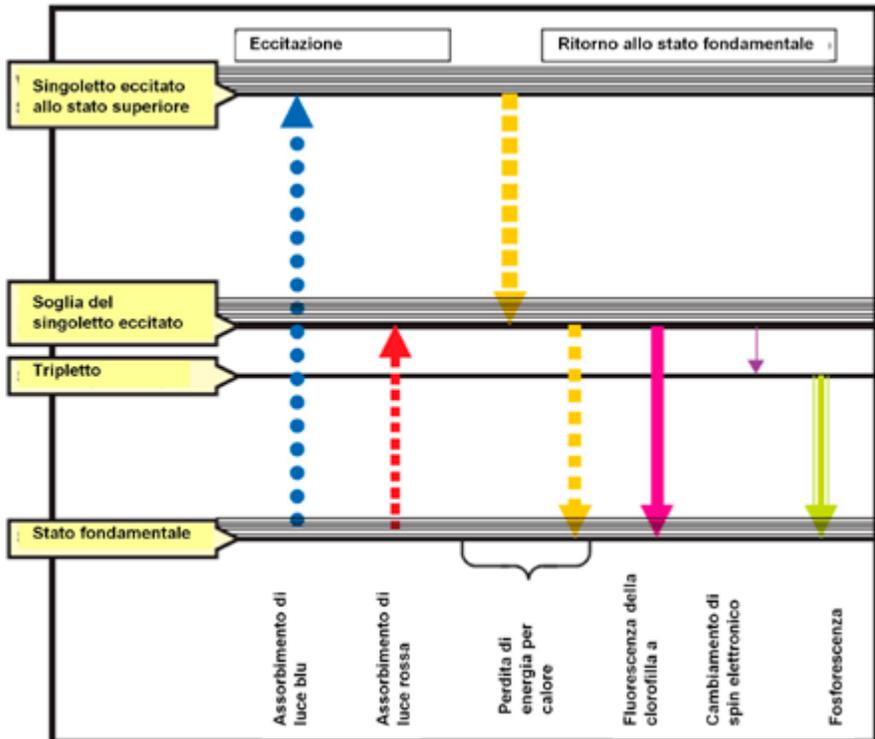
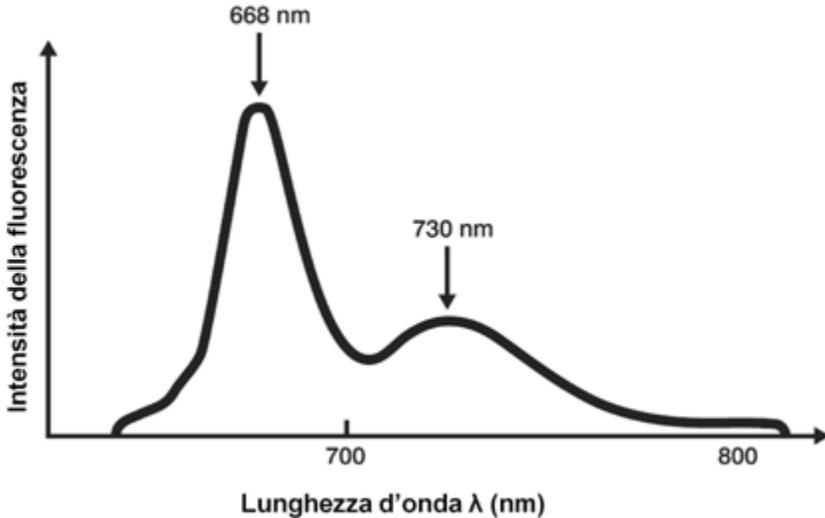


Figura 2.3 – Spettro di emissione della fluorescenza della clorofilla (da Krause e Weiss, 1984. Ridisegnato da Janusz Golik)



k_p è la costante delle reazioni fotochimiche,

k_d è la costante della dissipazione di energia sotto forma di calore.

Tramite l'analisi della fluorescenza della clorofilla si possono ottenere informazioni sull'efficienza degli apparati fotosintetici, consentendo di valutare lo stato fisiologico dei campioni fotosintetici esaminati. La fluorescenza può essere usata anche come metodo indiretto per stimare il contenuto di clorofilla. Le tecniche di analisi usate possono essere basate sull'analisi della fluorescenza attiva o della fluorescenza passiva. Si definisce "attiva" la fluorescenza indotta dall'esposizione a luce artificiale, di intensità e composizione note, di un campione fotosintetico precedentemente adattato a condizioni di buio o di luce. È invece "passiva" la fluorescenza emessa spontaneamente da un campione fotosintetico nelle condizioni reali di illuminazione. In questo trattato ci occuperemo estensivamente dei metodi di fluorescenza attiva, largamente impiegati nelle indagini terrestri. La fluorescenza passiva viene invece usata nelle indagini di *remote sensing*.

La fluorescenza attiva della clorofilla viene misurata con tecniche semplici, non invasive e veloci (a seconda della metodologia usata una misurazione può durare da qualche secondo a diversi minuti). L'analisi delle risposte consente lo studio delle reazioni della fase luminosa e le loro interazioni con le reazioni enzimatiche del ciclo di Calvin-Benson. Il sincronismo della velocità di queste reazioni è un prerequisito per l'alta efficienza del processo fotosintetico (Van der Tol et al., 2009).

La misura della fluorescenza è una tecnica molto sensibile, in grado di rilevare i cambiamenti dello stato bioenergetico nelle piante fornendo, direttamente o indirettamente, informazioni su tutti i momenti della fase luminosa della fotosintesi: la fotolisi dell'acqua, il trasporto di elettroni, la formazione di un gradiente di pH nelle membrane dei tilacoidi e la sintesi di ATP. In tal modo è possibile misurare le risposte degli organismi esaminati ai cambiamenti dei parametri ambientali (radiazioni luminose e UV, temperature, stato idrico, inquinamento ambientale ...), e di conseguenza l'insorgere di condizioni di stress e i meccanismi di acclimatazione. La fluorescenza è quindi una tecnica impiegata nella fisiologia dello stress.

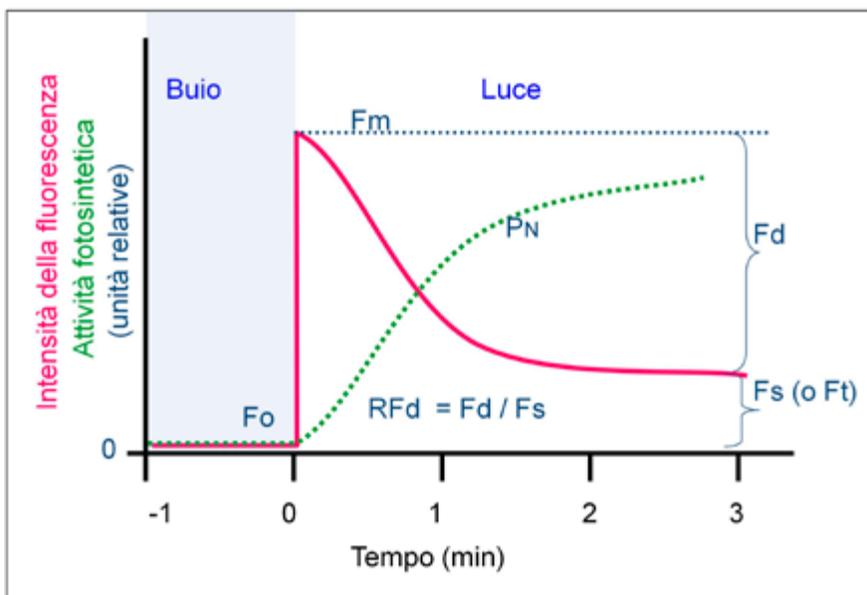
2.2. L'induzione della fluorescenza nella clorofilla *a*

La fluorescenza attiva viene indotta tramite l'applicazione di luce. Se il campione è stato precedentemente adattato al buio, all'inizio dell'induzione luminosa si osserva un forte incremento della fluorescenza fino ad un picco massimo, dopo di che la fluorescenza decresce lentamente fino a raggiungere, in alcuni minuti, un livello stabile. Questo andamento è denominato "effetto Kautsky" (Kautsky e Hirsch, 1931, Govindjee, 1995), dallo studioso che per primo lo ha descritto. La fluorescenza massima viene raggiunta in meno di 1s e indica la riduzione del pool dei plastochinoni (chiusura dei centri di reazione). La successiva fase discendente è associata alle reazioni enzimatiche necessarie alla sintesi di ATP, NADPH e la riduzione della CO₂ nella fase oscura che avviene nello stroma. Infine, il livello stabile esprime l'equilibrio fra l'assorbimento dell'energia luminosa e l'organizzazione del carbonio (Fig. 2.4) (Schreiber et al., 1994).

In un campione fotosintetico adattato al buio tutti i centri di reazione sono nello stato ossidato (centri di reazione "aperti"). Al momento dell'applicazione di una luce attinica (LA = luce in grado di provocare cambiamenti chimici, la cui intensità è generalmente fissata tra 200 – 500 μmol m⁻² s⁻¹) inizia, nel corso di alcuni ns, la prima fase della fluorescenza indotta. Il primo punto rilevabile della fluorescenza indotta si verifica entro i 50 μs (nella curva di induzione è identificato come punto O). Questo valore determina la fluorescenza iniziale (F₀), che è principalmente associata alle perdite di energia del pigmento antenna del PSII (Fig. 2. 5). L'aumento dell'emissione di fluorescenza fra F₀ e F_p (picco) dipende dal buon funzionamento dei donatori e accettori di elettroni nel PSII, e la efficiente connessione fra i vari elementi dell'apparato fotosintetico.

Conseguentemente alla eccitazione del centro di reazione PSII, un elettrone ad alta energia riduce una molecola di feofitina (Feo⁻). Successivamente l'elettrone è trasferito al Q_A (il plastochinone connesso alla proteina D2), che è il primo accettore stabile del PSII. Dopo 2 – 5 ms il centro di reazione è chiuso a causa della riduzione dell'accettore Q_A⁻, e l'intensità della fluorescenza sale fino al punto I (corrispondente allo step J del JIP-test). Nel breve

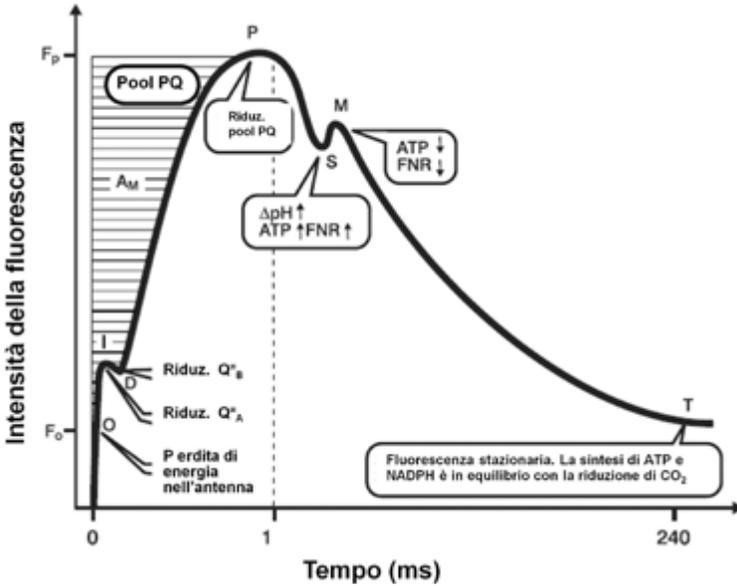
Figura 2.4 – Effetto Kautsky. L'esposizione del campione ad una luce saturante, dopo un periodo di adattamento al buio, provoca l'aumento dell'intensità della fluorescenza da un livello basale (F_0) ad un livello massimo (F_M). Nel corso di un tempo variabile da alcuni secondi a pochi minuti, l'intensità della fluorescenza si stabilizza su un livello S (o T , F_s o F_t). Nel contempo l'attività fotosintetica (misurata come P_N , fotosintesi netta) raggiunge gradualmente un livello in equilibrio con F_s . $F_D = F_M - F_s$; $RFd =$ Relative fluorescence decrease, vedi testo (modificato da Buschmann, 2004).



termine si osserva un leggero declino della fluorescenza stessa da I a D, riflettendo la parziale riossidazione di Q_A dovuta al trasferimento dell'elettrone verso Q_B (accettore secondario associato alla proteina D1). Ciò consente il trasferimento consecutivo di elettroni eccitati dalla Feo al Q_A (Fig. 2.5). Le varie componenti della catena di trasporto degli elettroni (PQ mobile, complesso del citocromo b_6f , accettori del PSI) vengono successivamente ridotti fino a che, attraverso molteplici turn-over, tutti i centri di reazione sono chiusi ed il pool del plastoquinone è completamente ridotto. Alla chiusura di tutti i centri di reazione (che avviene in un tempo compreso fra 0,5 e 1 s), corrisponde l'intensità di fluorescenza massima (punto P, o picco). In questa fase il rendimento delle reazioni fotochimiche è minimo (Fig. 2.5). L'area compresa fra la curva e l'asse delle ordinate fornisce informazioni sul pool complessivo del plastoquinone del PSII (Krause e Weis, 1991).

Tra i punti P e S vi è una netta riduzione della fluorescenza dovuta al rapido trasferimento di energia dal PSII al PSI, mentre aumenta il gradiente di concentrazione di protoni (ΔpH) tra l'interno dei tilacoidi (lumen) e lo

Figura 2.5. Curva di induzione di fluorescenza della clorofilla (con permesso di Murkowski, 2002). Le varie fasi sono marcate sulla curva con le lettere O, I, D, P e T.



stroma. Ciò consente alla fotosforilazione di operare velocemente, e di attivare i processi fotosintetici della fase oscura. Dopo 5 – 9 s l'intensità della fluorescenza aumenta nuovamente fra il punto S e M a causa dell'esaurirsi della FNR (ferredossina riduttasi $NADP^+$) e il conseguente rallentamento della produzione di $NADP^+$. L'aumento della produzione di ATP e la rigenerazione di FNR (e il conseguente aumento di produzione di $NADPH^+$) fanno sì che in breve tempo la fluorescenza della clorofilla riprende a declinare per raggiungere il livello base (*steady*, chiamato T o S) nel corso di alcuni minuti. Il tempo necessario per raggiungere questo livello dipende dallo stato fisiologico delle piante e dal loro grado di sviluppo. A questo livello di emissione della fluorescenza (F_s) vi è un equilibrio fra le reazioni fotochimiche della fase luminosa, la produzione di energia ($NADPH$ e ATP) e l'utilizzo di questi prodotti nella fase oscura.

2.3. I principali parametri della fluorescenza

F_0 - fluorescenza basale di campioni adattati al buio

Il parametro F_0 (oppure: F_{open} , F_{zero} o F_{ground}) indica la perdita di energia durante il trasferimento fra l'antenna ed il centro di reazione del PSII (Baker e Rosenquist, 2004). F_0 rappresenta il primo punto di induzione di

fluorescenza, ed è dovuto alla emissione di fluorescenza da parte delle molecole eccitate di clorofilla nella antenna del PSII, mentre il Q_A è completamente ossidato e tutti i centri di reazione del PSII sono aperti in attesa di ricevere elettroni, e in assenza del decadimento (*quenching*) non fotochimico della fluorescenza stessa. Per soddisfare queste condizioni è necessario l'adattamento al buio del campione. La perdita di energia non dipende solo dall'intensità luminosa, ma anche dall'efficienza del trasferimento di energia da LHCII al sito attivo del PSII. Secondo Lichtenthaler et al. (2004), F_0 è misurato a bassa intensità di PAR, ad esempio $0,01 \mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$. Alti valori di F_0 dimostrano una perdita di efficienza nel trasferimento dell'energia fra i pigmenti dell'antenna del PSII. La minore efficienza può essere causata dalla dissociazione del LHCII dal nucleo di PSII (Havaux, 1993), indicando con ciò danni strutturali al PSII (Krause e Weis, 1991). Al contrario, bassi valori di F_0 possono essere indice di una buona funzionalità del PSII. Secondo Pfündel (1998) il PSI contribuisce in maniera significativa al valore di F_0 (fino al 30%).

F_M - fluorescenza massima di campioni adattati al buio

La fluorescenza massima (F_M) si osserva, in un tempo generalmente inferiore a 1s, quando il campione adattato al buio riceve un impulso di luce attinica saturante (tipicamente nel range $3.500 - 10.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fino a $14.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nei fluorimetri di tipo PAM). Quando viene raggiunto F_M tutti gli accettori di elettroni del PSII (plastoquinoni) sono ridotti ed i centri di reazione sono temporaneamente chiusi. Inoltre non vi è alcun decadimento non fotochimico dell'energia. In una misurazione il valore assoluto di F_M , così come quello di F_v , dipende anche dal contenuto di clorofilla del campione esaminato, per cui questi parametri vengono usati anche come *proxy* del contenuto di clorofilla. La diminuzione di F_M è un indice di stress, dal momento che registra una perdita di capacità nella riduzione degli accettori del PSII.

Il rapporto fra i due estremi (F_M/F_0) è un ulteriore parametro utilizzato in fisiologia. Nelle foglie sane esso ha un valore oscillante fra 4 e 5, ma vari fattori di stress (che comportano l'aumento di F_0 e/o la diminuzione di F_M) possono ridurre significativamente tale valore.

T_{FM} - tempo per raggiungere il livello massimo di fluorescenza della clorofilla (F_M)

T_{FM} indica il tempo, in ms, con cui il valore della fluorescenza cresce da F_0 a F_M . Generalmente è intorno a 500–800 ms (Lichtenthaler et al., 2004). T_{FM} è funzione della quantità di plastoquinone che deve essere ridotto. Fattori di stress possono aumentare il valore di T_{FM} perché il trasporto degli elettroni viene rallentato (Reigosa e Weiss, 2001).

$F_v = (F_M - F_0)$ - fluorescenza variabile di campioni adattati al buio

F_v (o F_{variable}) è la differenza tra i valori F_M e F_0 di campioni adattati al buio. Il valore di F_v dipende dalla massima efficienza quantica del PSII. Valori bassi di questo indice indicano una bassa attività del PSII e la dissipazione dell'energia di eccitazione sotto forma di calore.

 F_v/F_0 - efficienza massima di scissione dell'acqua da parte del donatore del PSII

Il parametro è determinato dopo adattamento al buio del campione. Esso indica l'efficienza di scissione dell'acqua (e conseguentemente la produzione di ossigeno) da parte del PSII. L'OES è considerato un elemento molto sensibile della catena di trasporto degli elettroni nella fotosintesi (Peireira et al., 2000). Teoricamente il valore di F_v/F_0 può variare da 0 a 1.

 F_v/F_M - massima efficienza fotochimica primaria del PSII in un campione adattato al buio

Il parametro $F_v/F_M = [(F_M - F_0)/F_M]$, in campioni adattati al buio, indica la massima efficienza (resa quantica) per la fotochimica primaria da parte del PSII (*maximum quantum yield of primary photochemistry in the dark adapted state*), ed è il parametro maggiormente usato come indicatore affidabile dell'attività fotochimica dell'apparato fotosintetico. Esso indica la probabilità che un elettrone catturato dall'antenna raggiunga il centro di reazione riducendo l'accettore primario Pheo (feofitina).

L'espressione F_v/F_M può essere espressa concettualmente come rapporto fra le costanti di de-eccitazione della clorofilla (k_p = costante di de-eccitazione fotochimica; k_n = costante di de-eccitazione non fotochimica, Paillottin, 1976):

$$F_v/F_M = k_p/(k_n + k_p)$$

Teoricamente il valore di F_v/F_M può variare da 0 a 1, ma il valore ottimale di questo parametro è 0.83 (Björkman e Demmig, 1987). La diminuzione di questo valore, che avviene a seguito dell'azione di vari fattori di stress, indica un danno o una ridotta efficienza del centro di reazione del PSII.

La riduzione di F_v/F_M comporta l'aumento della dissipazione di energia nell'antenna sotto forma di calore ed è indice di fotoinibizione (che può essere dinamica o cronica, vedi par. 2.4). La fotoinibizione consiste nella degradazione della proteina D1 nel centro di reazione del PSII (Ohira et al., 2005). La riduzione di F_v/F_M è considerata pure un meccanismo di *down-regulation* (Stroch et al., 2008), che serve a ridurre l'intensità del flusso di elettroni nella catena di trasporto (ETC) in presenza di una domanda li-

mitata di elettroni da parte del ciclo di Calvin (per es. eccesso di elettroni dovuto ad alte radiazioni luminose insieme alla limitazione dell'assorbimento del carbonio). Quando l'assimilazione del carbonio è bassa (per es. , in condizioni che determinano la chiusura stomatica), un flusso di elettroni elevato non può essere usato per il metabolismo (Lu et al., 2001; Baraldi et al., 2008; Guidi et al., 2009; Bussotti et al., 2011; Ogaya et al., 2011). In queste condizioni il potenziale riducente in eccesso può produrre grandi quantità di elettroni liberi, potenzialmente dannosi in quanto determinano la produzione dei ROS (*Reactive Oxygen Species*), (Hald et al., 2008).

La pianta reagisce alla fotoinibizione con meccanismi detti di fotoprotezione, associati all'aumento del valore del *non-photochemical quenching* (NPQ), o di riparazione, di cui il più importante è il rapido *turnover* della proteina D1 stessa, che viene ricostituita quando cessa l'azione dell'agente di stress (Aro et al., 1993; Leitsch et al., 1994). La fotoprotezione è tuttavia limitata dall'azione dei ROS, che vengono prodotti al sito del PSII dal pigmento antenna eccitato. La fotoprotezione viene ripristinata dissipando (o consumando) l'eccesso di energia attraverso l'azione di appositi "spazzini biochimici" (*scavenger*) dei ROS stessi, e soprattutto attraverso il ciclo delle xantofille (Demmig-Adams e Adams III, 1996). In condizioni naturali di forte luce (ad esempio, a mezzogiorno) la maggior parte dei pigmenti di questa serie è rappresentata dalla zeaxantina (Z) e anteroxantina (A), mentre in assenza di luce prevale la violaxantina (V). La zeaxantina e l'anteroxantina, unitamente con un basso pH nella membrana fotosintetica, facilitano la dissipazione dell'eccesso di energia in maniera non dannosa per l'apparato fotosintetico (de-eccitazione non fotochimica controllata), al livello dell'antenna. La riduzione del valore di F_v/F_M è accompagnata dall'aumento della de-epossidazione delle xantofille e l'aumento del seguente rapporto:

$$EPS = (A + Z)/(V + A + Z)$$

L'attivazione del ciclo delle xantofille è considerato un meccanismo di fotoprotezione atto a proteggere il centro di reazione del PSII (Takahashi e Badger, 2011).

A_M (Area) - area soprastante la curva di induzione della fluorescenza della clorofilla

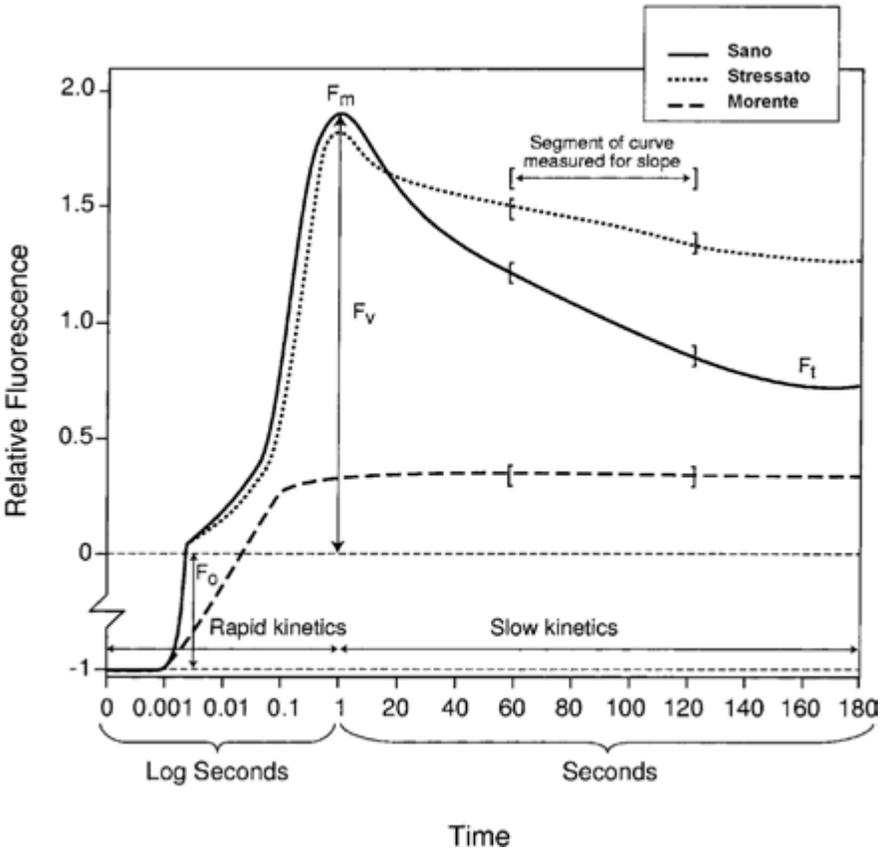
Il valore del parametro A_M (o Area) è proporzionale alla dimensione del pool degli accettori di elettroni nel PSII (plastochinoni). Quanto più rapido è il tempo con cui viene raggiunto F_M , minore è A_M e minore è la quantità di accettori di elettroni implicati nel processo. Nel caso che il trasporto di elettroni dai centri PSII sia bloccato o rallentato, il valore di A_M è ugualmente ridotto (aumento di $F_{0'}$ e/o diminuzione di F_M).

F_s (F_T) - fluorescenza stazionaria (steady fluorescence)

Il parametro F_s (o F_T) indica l'intensità della fluorescenza che accompagna il processo di fotosintesi in condizioni stabili. Dopo l'adattamento al buio, e il successivo raggiungimento di $F_{M'}$ lo stato stazionario (F_s) della curva di induzione della fluorescenza è raggiunto dopo alcuni minuti. In queste condizioni si parla di equilibrio tra la produzione di energia (ATP e NADPH) da parte delle reazioni fotochimiche, e il suo impiego nelle reazioni enzimatiche della fase oscura.

Qualsiasi disturbo nello svolgimento delle reazioni fotosintetiche, causato dall'impatto di fattori di stress, ritarda il raggiungimento dello stato stazionario. Inoltre, l'aumento del valore di F_s indica una perdita di efficienza fotochimica, con aumento dei processi di dissipazione dell'energia (Fig. 2.6).

Figura 2.6 – Esempio di curve di fluorescenza in campioni a differente stato fisiologico. Il campione sano, rispetto a quello stressato, ha un livello di F_M più basso e una fluorescenza stazionaria (F_T) più alta. Il campione deperiente ha un livello di fluorescenza sempre più basso (modificato da Rose e Haase, 2002).



F_s/F_0 - rapporto tra fluorescenza stazionaria e fluorescenza basale

Questo parametro è correlato negativamente con il decadimento non fotochimico dell'energia e, ad elevata intensità di luce, è correlato positivamente con il trasporto di elettroni e l'assimilazione del carbonio.

Unità di misura

L'intensità della fluorescenza ai punti F_0 , F_M , F_S ed intermedi è espressa in un'unità relativa (che dipende dalle caratteristiche tecniche delle lampade dei fluorimetri utilizzati e dalle condizioni di illuminazione), o in mV. Gli *yield* (rese quantiche) possono avere un valore teorico da 0 a 1, anche se il loro valore effettivo è compreso in un *range* molto più ristretto. In generale i parametri di fluorescenza sono espressi tramite unità arbitrarie o come rapporti adimensionali.

2.4. La misura della fluorescenza

La fluorescenza della clorofilla viene misurata per mezzo di fluorimetri, secondo un principio basato sulla spettroscopia di emissione. Ad oggi sono disponibili numerose tecniche di misurazione ed una vasta gamma di fluorimetri, che permettono di misurare la fluorescenza della clorofilla in organismi fotosintetici, in campo ed in laboratorio, sia su piante superiori che su microrganismi compreso il microfitoplancton. I vantaggi dell'uso di questi strumenti sono:

1. le misure sono effettuate in vivo e sono non invasive;
2. i metodi sono applicabili sia in campo che in serra e in laboratorio;
3. possono essere applicati su tutte le parti verdi della piante (foglia, fusto, frutti e semi immaturi);
4. possono essere applicati su piante mature, piantine appena germogliate e su colture di tessuti;
5. il tempo di misura è breve (da pochi secondi a diversi minuti);
6. i costi sono relativamente bassi e un'ampia gamma di strumenti è disponibile in commercio.

In commercio si possono trovare due tipi principali di fluorimetri, a fluorescenza diretta e modulata. I fluorimetri a fluorescenza diretta lavorano su campioni adattati al buio (*dark adapted*), quelli a fluorescenza modulata sono in grado di lavorare in condizioni di luce (*light adapted*).

2.5. Adattamento al buio del campione fotosintetico

L'adattamento al buio di un campione fotosintetico, che può essere una foglia o anche una sospensione di cloroplasti, ha lo scopo di ottenere la

completa ossidazione del plastochinone e quindi di rendere aperti i centri di reazione. Questa operazione è necessaria per misurare le prestazioni fotosintetiche potenziali (massima efficienza delle rese quantiche).

Durante il periodo di adattamento al buio avvengono importanti processi fisiologici. Pochi minuti di buio sono sufficienti perché il pool del plastochinone ed il cluster del manganese nell'OEC vengano riossidati. Periodi più lunghi provocano la rimozione dei substrati respiratori a causa della respirazione al buio. La disattivazione della Rubisco nelle piante vascolari necessita da 12 ai 18 minuti di buio. Il ciclo delle xantofille, così come altri meccanismi di fotoprotezione, vengono disattivati in pochi minuti di buio (4 – 6 minuti, secondo Lichtenthaler, 1999).

Gli effetti della fotoinibizione acuta, o dinamica, causata dall'esposizione ad alte intensità luminose, vengono rimossi dopo 20 – 30 minuti di adattamento al buio (questa è la durata di adattamento al buio che viene normalmente applicata nelle misure di fluorescenza). D'altro canto, la fotoinibizione cronica (causata da molte ore di esposizione alla luce, o da stress prolungati) comincia ad essere rimossa dopo 40 minuti e vengono impiegate da 30 a 60 ore per la sua rimozione completa (Lichtenthaler e Babani, 2004; Thiele et al., 1998). Questo processo è legato al ciclo di rigenerazione della proteina D1.

Si comprende pertanto che nella maggior parte delle ricerche, nelle quali le misure vengono condotte nel corso del giorno, venga rimossa solo la fotoinibizione acuta. Desotgiu et al. (in stampa) hanno mostrato che esiste una notevole differenza fra misure effettuate sulla stessa pianta prima dell'alba e nel corso della giornata, suggerendo in tal modo che una notte di adattamento al buio costituisce un buon compromesso, praticamente fattibile, per la rimozione di gran parte della fotoinibizione.

L'adattamento al buio può essere ottenuto in vari modi:

- uso di clip, che vengono utilizzate in tutte le condizioni di misura (campo, laboratorio, serra, ecc). L'uso di clip permette una misura non distruttiva (non invasiva) della fluorescenza;
- misurazioni effettuate di notte (metodo non distruttivo);
- trasferimento di piante coltivate in vaso in locali oscurati (metodo non distruttivo);
- misura di campioni distaccati dalle piante e conservati al buio (metodo distruttivo). Se conservati adeguatamente, tali campioni sono misurabili fino a 2 – 3 giorni dalla raccolta.

In condizioni di oscurità, è possibile utilizzare una lampada che emette luce verde, consentendo condizioni di misura più facili (migliore visibilità del campione). Tale luce non è attinica, perciò non induce il processo di fotosintesi nelle piante.

La fluorescenza modulata (PAM: *Pulse Amplitude Modulated*)

3.1. Generalità

Strumenti di misura della fluorescenza basati sulla tecnica nota come “*Pulse Amplitude Modulated*” (PAM) sono disponibili in commercio dagli anni '80. La tecnica fu proposta per primi da Bradbury e Baker (1981), e la chiamarono “*light addition technique*”. Successivamente Schreiber (1986) rese questa tecnica disponibile ad un gran numero di ricercatori per ricerche applicate. Per comprendere i principi della tecnica PAM è importante distinguere il concetto di “*intensità di fluorescenza*” da quello di “*yield* (o resa quantica) di fluorescenza”. L'intensità della fluorescenza è un valore assoluto che dipende dalle condizioni di illuminazione e può variare di molti ordini di grandezza. Lo *yield* invece è molto meno variabile (attorno ad un fattore di 5 – 6) perché esprime il rapporto fra fotoni assorbiti e fotoni riemessi. Nella fluorimetria PAM la sorgente di luce usata per misurare la fluorescenza è modulata, cioè applicata con impulsi ad alta frequenza, e la misura avviene solo sulla parte di fluorescenza generata dagli impulsi modulati. Perciò lo *yield* di fluorescenza relativo a tali impulsi può essere misurato anche in presenza di una illuminazione di fondo, come per esempio in condizioni di luce solare.

Alcune review generali e approfondimenti su questa tecnica sono riportate da van Kooten e Snell (1990); Schreiber et al. (1995, 2004); Roháček e Barták (1999); Maxwell e Johnson (2000); Roháček (2002); Baker e Rosenqvist (2004); Baker e Oxborough (2004); Baker (2008); Henriques (2009).

In sintesi, la fluorescenza della clorofilla è misurata in presenza di una fonte supplementare di radiazione attinica. In questo sistema di misurazione la luce viene somministrata ad intervalli di tempo, per periodi brevi (1 – 3 μ s), ma sufficienti per rilevare l'impulso della fluorescenza. Il fluorimetro a fluorescenza modulata misura tre tipi di segnali:

1. la luce ambiente, che agisce come attinica;
2. il segnale di fluorescenza indotto dalla luce attinica;
3. il segnale di fluorescenza indotta da impulsi di luce modulata. Il segnale di fluorescenza è amplificato elettronicamente ignorando tutti gli altri segnali non indotti dagli impulsi luminosi.

La tecnica PAM consente una misurazione accurata della fluorescenza iniziale in campioni adattati al buio (F_0), dal momento che l'intensità iniziale della luce attinica è molto bassa. Un esempio di misurazione PAM su un campione adattato al buio include un impulso di luce modulata (ML = *modulated light*) molto debole ($0,1 - 10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), ma in grado di causare la fluorescenza della clorofilla. ML è originata da un sistema di diodi (LED) che emettono radiazioni nello spettro del rosso (di solito $\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$). La debole radiazione iniziale non ha effetto di induzione della fotosintesi, e la fluorescenza della clorofilla proviene principalmente dalla perdita di energia dall'antenna, e quindi il suo valore può essere assunto come per F_0 . Prima della misura di F_0' può essere applicato un debole impulso di luce nel rosso lontano (*far red*, FR).

Successivamente viene somministrato un impulso di saturazione (SP = *saturation pulse*) per un tempo di circa 0,8s. Si tratta di un impulso con intensità molto forte, fino a $16.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (LED, $\lambda_{\text{max}} = 665 \text{ nm}$), che causa la riduzione di tutti gli accettori del PSII, il blocco momentaneo delle reazioni fotochimiche e, di conseguenza, l'aumento dell'intensità della fluorescenza fino a raggiungere il valore massimo (F_M).

Dopo che l'intensità della fluorescenza è tornata al livello di F_0 , viene nuovamente somministrata una luce attinica con PPF (Photosynthetic Photon Flux Density) = $200 - 500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (LED, $\lambda_{\text{max}} = 665 \text{ nm}$). Questa luce provoca un aumento di fluorescenza fino a F_p (picco di fluorescenza). Nei minuti successivi la fluorescenza diminuisce nuovamente fino al livello costante (stabile) di F_s (*steady state fluorescence*).

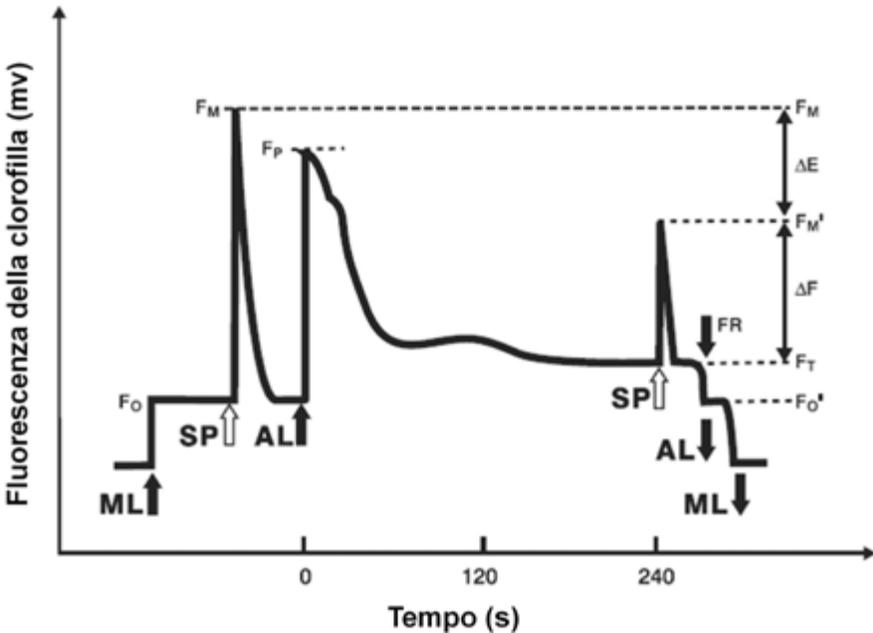
Dopo che è stato raggiunto F_s (circa 240 secondi dopo che è stato raggiunto F_p), viene somministrato il secondo impulso che riduce nuovamente gli accettori di elettroni del PSII. Questo impulso provoca un nuovo aumento di fluorescenza fino al livello F_M' , che è sempre inferiore a F_M . La differenza tra F_M e F_M' è dovuta alla estinzione non fotochimica di energia.

Successivamente, un impulso di luce nel rosso lontano (*far red*, FR) ($30 \mu\text{mol}$ di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a $720 - 730 \text{ nm}$), in assenza di luce attinica (van Kooten e Snel, 1990; Maxwell e Johnson, 2000) consente di misurare F_0' , che è il livello minimo di fluorescenza quando i centri di reazione del PSII sono aperti in una foglia adattata alla luce. Si assume che in tal modo (debole luce nel rosso lontano in assenza di luce attinica) venga eccitato preferenzialmente il PSI rispetto al PSII, rimuovendo così gli elettroni dal sito degli accettori del PSII (ossidazione del pool dei plastochinoni

associati al PSII) e favorendo l'apertura dei centri di reazione del PSII. Alternativamente F_0' può essere calcolato come segue (Oxborough and Baker, 1997).

La Figura 3.1 mostra un tracciato di analisi di un campione fotosintetico effettuata con fluorescenza modulata. La fluorescenza modulata consente, in particolare, l'analisi del *quenching*, cioè dei processi di estinzione della fluorescenza stessa. Questa estinzione può avvenire a causa del trasporto degli elettroni fuori dal PSII, con un meccanismo indotto dall'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo del carbonio, ed è chiamata "estinzione fotochimica" (*photochemical quenching*, qP). Un processo parallelo riguarda la conversione dell'energia in calore, ed è denominato "estinzione non-fotochimica" (*non photochemical quenching*, NPQ). Normalmente le variazioni di stato che avvengono a causa di questi due processi durano circa 15 – 20 minuti, prima che si raggiunga lo stato di emissione costante di fluorescenza (F_s).

Figura 3.1 – Esempio di cinetica di fluorescenza modulata (da Murkowski, 2002. Ridisegnato da Janusz Golik). ML: luce modulata; SP: impulso saturante; AL: luce attinica; FR: impulso nel rosso lontano (far red); FP: fluorescenza massima della clorofilla sotto impulso di luce attinica; F_0 : fluorescenza basale del campione adattato al buio; F_0' : fluorescenza basale del campione adattato alla luce; F_M : fluorescenza massima del campione adattato al buio; F_M' : fluorescenza massima del campione adattato alla luce; F_T (o F_s) fluorescenza stazionaria del campione adattato alla luce; $\Delta E = F_M - F_M'$; $\Delta F = F_M' - F_T$.



3.2. I parametri della fluorescenza modulata in foglie adattate alla luce

F_M' - fluorescenza massima in un campione adattato alla luce

Questo parametro indica la fluorescenza massima indotta da un lampo di luce saturante su un campione adattato ad una luce attinica di intensità costante. Il valore di F_M' è inferiore a $F_{M'}$ perché in condizione di adattamento alla luce gli accettori del PSII sono parzialmente ridotti. Sulla base di F_M' vengono determinati altri valori utili per il calcolo dei principali parametri.

$\Delta F_M = F_M - F_M'$ - Indica la perdita di fluorescenza dovuta a eventi non fotochimici

$\Delta F = F_M' - F_S = Fq'$ - Esprime la fluorescenza variabile indotta da reazioni fotochimiche

F_0' - fluorescenza iniziale in un campione adattato alla luce

Questo parametro indica il livello di fluorescenza quando, dopo l'adattamento alla luce attinica, la luce attinica stessa viene tolta e viene somministrato un impulso di luce nel rosso lontano (*far red*, FR). In queste condizioni il PSI è sovraeccitato rispetto al PSII, la catena di trasporto fra i due fotosistemi è priva di elettroni e i centri di reazione sono nuovamente aperti. F_0' normalmente ha un valore più basso di F_0 .

$F_V' = F_M' - F_0'$ - fluorescenza variabile in un campione adattato alla luce

F_V' è proporzionale alla effettiva efficienza quantica del PSII in un campione adattato alla luce attinica.

$R_{Fd} = (F_M - F_S)/F_S$ - fluorescence decrease ratio, Indice di funzionalità del PSII

Il parametro R_{Fd} (*fluorescence decrease ratio*) è determinato dall'interazione fra le reazioni fotochimiche della fase luminosa e le reazioni enzimatiche del ciclo di Calvin-Benson. Il valore di questo parametro diminuisce quando viene disturbato l'equilibrio fra le reazioni fotochimiche sulle membrane dei tilacoidi, e la velocità delle reazioni enzimatiche nello stroma dei cloroplasti (Croxdale e Omasa, 1990 a, b). Quando è modificato il livello di PAR, R_{Fd} misura il potenziale di attività fotosintetica. Lichtenthaler et al. (2005), utilizzando le misurazioni R_{Fd} di foglie di alberi, ottennero valori $>2,7$ nelle foglie di luce, e $1 - 2,7$ in foglie d'ombra. Valori di R_{Fd} attorno a 2,5 o superiori indicano una elevata attività fotosintetica, mentre valori inferiori a 1 indicano danni al processo di assimilazione della CO_2 . L'impatto di diversi fattori di stress pro-

voca in generale un aumento di F_s cosicché, anche con un F_M relativamente costante, la differenza $F_M - F_s$ si riduce, e di conseguenza anche il valore R_{Fd} .

Un parametro correlato è Ap (*Stress Adaptation Index*), che indica come le foglie riorganizzano il loro apparato fotosintetico durante lo stress.

$$Ap = 1 - (1 + R_{Fd,730}) / (1 + R_{Fd,690})$$

Ap viene determinato mediante la misura di R_{Fd} simultaneamente a due lunghezze d'onda, 690 e 730 nm. Ap è alto in foglie giovani e sane, che hanno una elevata attività fotosintetica, mentre con valori di 0.1 - 0.2 significa che la pianta è stata soggetta all'influenza di stress (Lichtenthaler e Rinderle, 1988; Strasser, 1988).

3.2.1. Parametri relativi ai processi fotochimici

$$\Phi_{PSII} = (F_M' - F_s) / F_M' = \Delta F / F_M' = Fq' / F_M' - \text{effective quantum yield}$$

Questo parametro, detto anche semplicemente *Yield* (Y), consente di valutare la resa quantica effettiva delle reazioni fotochimiche nel PSII, in foglie adattate alla luce (Genty et al., 1989).

L'*effective quantum yield* misura la proporzione di luce assorbita usata per alimentare le reazioni fotochimiche. L'efficienza fotosintetica è determinata dalla quantità di accettori di elettroni disponibili presso il PSI (normalmente NADP⁺), per cui Φ_{PSII} decresce in condizioni di limitato consumo di NADPH, come per esempio quando la concentrazione interna di CO₂ è bassa (stress idrico).

Lo *Yield* fornisce una misura del trasporto lineare degli elettroni e dà un'indicazione della fotosintesi complessiva. In condizioni di laboratorio è stato provato che esiste una stretta relazione fra Φ_{PSII} e Φ_{CO_2} (resa quantica di fissazione di CO₂ in assenza di fotorespirazione, Fig. 3.2). Tuttavia una discrepanza fra Φ_{PSII} e Φ_{CO_2} può avvenire in certe condizioni di stress e può determinare alterazioni nella fotorespirazione e nel trasporto pseudociclico di elettroni (reazione di Mehler, Fryer et al., 1998).

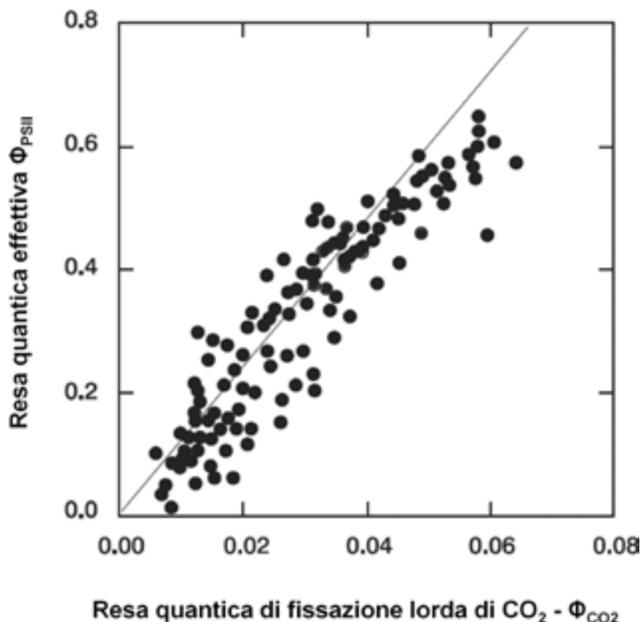
Un grande vantaggio pratico di questo parametro è che entrambi i valori F_M' e F_s sono misurati alla luce e quindi non è necessario l'adattamento al buio del campione. Tuttavia, poiché Φ_{PSII} è fortemente influenzato dall'intensità della luce, sono necessarie delle precauzioni durante la misura in condizioni di campo, dove è difficile evitare cambiamenti repentini nelle condizioni di illuminazione.

$$ETR = \Phi_{PSII} * 0.50 * 0.84 * PPFD - \text{Electron Transport Rate } (\mu\text{mol di elettroni m}^{-2} \text{ s}^{-1})$$

ETR, o *Linear Electron Transport Rate* (J), indica la capacità fotosintetica complessiva in vivo (Genty et al., 1989) e deriva dal parametro precedente

52 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

Figura 3.2 - Relazione lineare fra Φ_{PSII} (Effective quantum yield) e Φ_{CO_2} (resa quantica di fissazione di CO_2 , in assenza di fotorespirazione) (da Genty et al., 1989. Ridisegnato da Janusz Golik).



descritto (Φ_{PSII}). ETR misura la velocità del trasporto degli elettroni ad una data intensità luminosa (*Photosynthetic Photon Flux Density*, PPFD, misurata in $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). È calcolato come:

$$\text{ETR} = \Phi_{PSII} * \text{PPFD} * \alpha$$

dove α è un termine che include il prodotto dell'assorbimento di luce da parte della foglia e la ripartizione dei quanta assorbiti fra il PSI e il PSII. Il termine α è stato determinato sperimentalmente come la pendenza della linea di correlazione fra Φ_{PSII} e Φ_{CO_2} (Valentini et al., 1995).

Da un punto di vista applicativo si assume che solo l'84% della luce incidente venga assorbita, e che per muovere un elettrone sia necessario assorbire due quanta (uno per il PSII e uno per il PSI), per cui la formula sopra indicata diventa:

$$\text{ETR} = \Phi_{PSII} * \text{PPFD} * 0,84 * 0,5$$

ETR viene usato come proxy per la fotosintesi in indagini di campo. Il rapporto fra *Electron Transport Rate* e Assimilazione (ETR/A) indica la richiesta di elettroni per unità di CO_2 assimilata.

$\Phi_{\text{EXC}} = F_V'/F_M' = (F_M' - F_0)/F_M'$ - massima resa quantica del PSII in un campione adattato alla luce

Fornisce una stima dell'efficienza fotochimica massima del PSII ad una data PPF, che corrisponde all'efficienza operativa del PSII quando tutti i centri di reazione del PSII sono aperti (Q_A ossidato). La riduzione del valore di questo parametro è accompagnata dall'aumento della de-epossidazione delle xantofille.

$qP = (F_M' - F_S)/(F_M' - F_0)$ - *Quenching* fotochimico (*photochemical quenching*)

Il *photochemical quenching* è connesso allo stato di ossidoriduzione di Q_A nel PSII. Esso equivale approssimativamente all'ossidazione del PSII, e pertanto esprime il decadimento (*quenching*) della fluorescenza causato dal potenziale fotochimico. In tal modo qP fornisce informazioni sui centri di reazione aperti. Al contrario, l'espressione $(1 - qP)$ indica i centri di reazione chiusi (ridotti).

3.2.2. Parametri relativi ai processi non fotochimici

$NPQ = (F_M - F_M')/F_M'$ - *Quenching* non fotochimico (*non photochemical quenching*)

Esprime l'estinzione della fluorescenza dovuta a processi non fotochimici, in particolare la dissipazione di energia sotto forma di calore.

L'eccesso di eccitazione energetica può essere ridotto attraverso processi di dissipazione termica. Il *quenching* non fotochimico della fluorescenza della clorofilla è indicativo del livello di dissipazione di energia non radiativa che avvengono nel sistema di cattura della luce del PSII. L'importanza di NPQ consiste nel fatto che esso dimostra come il livello di eccitazione energetica dell'antenna può essere regolato, prevenendo così un eccesso di potere riducente della catena di trasporto degli elettroni.

Condizioni di stress, come alte intensità luminose o bassa concentrazione intercellulare di CO_2 dovuta all'aridità o alle basse temperature, possono provocare l'aumento di NPQ.

L'espressione:

$$qN = (F_M - F_M')/(F_M - F_0) = (F_M - F_M')/F_V$$

è una formula alternativa per determinare il NPQ.

3.3. Realizzare un protocollo di fluorescenza modulata

La misura dei parametri di fluorescenza modulata necessita la somministrazione di impulsi luminosi di varia natura, intensità e durata. Alcuni

degli aspetti più delicati nel progettare un protocollo di misura, consistono nella corretta scelta della lunghezza del tempo di illuminazione necessario per raggiungere il livello *steady* (F_s) di fluorescenza, e del numero ed intensità degli impulsi per la stabilizzazione di F_M' . Nei moderni fluorimetri queste operazioni sono completamente automatizzate, una volta che lo strumento è stato programmato con adeguati protocolli. La scelta del protocollo dipende dal tipo di materiale fotosintetico analizzato. È opportuno che i protocolli vengano testati all'inizio di ogni campagna di misure.

Si riporta a titolo di esempio un protocollo utilizzato per la misura di parametri di fluorescenza modulata in foglie pioppo (Desotgiu, 2012, Tesi di Dottorato presso l'Università di Firenze):

1. il campione è stato adattato al buio per 40 minuti mediante l'applicazione di una clip fogliare;
2. dopo qualche secondo dall'accensione dell'impulso di luce modulata (ML = modulated light) il campione è stato esposto a un impulso di luce saturante (SP = *saturation pulse*) per un tempo di 0.8 sec allo scopo di ridurre tutti gli accettori di elettroni e causare l'aumento della fluorescenza fino ad un livello F_M' ;
3. dopo un tempo sufficientemente lungo da permettere alla fluorescenza di tornare su livelli simili a F_0 ($t = 60$ secondi, stimato in seguito a diverse prove effettuate su un nostro campione fogliare) è stata somministrata una luce attinica (LA) con PPFD (*Photosynthetic Photon Flux Density*) = $300 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$;
4. dopo, ancora, un tempo sufficientemente lungo da permettere alla fluorescenza di tornare su un livello stabile individuato da F_s (t stimato di 300 secondi) è stato somministrato un secondo impulso di luce saturante in modo da rilevare il nuovo livello di fluorescenza massimo (espresso dall'indice F_M') stavolta riferito a foglie adattate alle condizioni di luce attinica;
5. successivamente è stato attivato un impulso di luce nel rosso lontano (*far red*, FR) ($30 \text{ } \mu\text{mol}$ di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 720 – 730 nm) in assenza di luce attinica che ha consentito di rilevare il livello di fluorescenza F_0' , ovvero quello minimo per una foglia adattata alla luce.

La fluorescenza diretta e l'analisi del *transient* O-J-I-P

4.1. Generalità

La tecnica della “fluorescenza diretta” consiste nella misura diretta del segnale fluorescente durante l'applicazione di una luce saturante continua. La fluorescenza diretta si applica su campioni adattati al buio, e consente di misurare la “cinetica veloce”, cioè la crescita iniziale della fluorescenza da 0 a P. Questa fase prende il nome di “*transient* fluorescente” (*fluorescence transient*, FT) perché si tratta di una risposta momentanea, non stabile. La misura del *transient* è molto rapida (una misura impiega meno di 1s), e consente l'analisi di centinaia di campioni nel corso di una giornata di lavoro.

Dopo pre-adattamento al buio, il campione viene illuminato con luce continua di lunghezza d'onda inferiore a 670 nm. Un fotorilevatore registra la fluorescenza della clorofilla nell'intervallo di lunghezze d'onda da circa 680 nm a 760 nm. Dalla traiettoria della curva di induzione della fluorescenza si possono ricavare informazioni sulle caratteristiche dell'apparato fotosintetico del campione. Un tipico sistema di misurazione della fluorescenza della clorofilla è chiamato sistema ad eccitazione continua (*continuous excitation type chlorophyll fluorescence system*). Si tratta di una sorgente di luce attinica ad intensità di $3.500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, una lunghezza d'onda di 650 nm e un rivelatore dotato di un filtro, che permette solo la registrazione della radiazione di $\lambda > 680 \text{ nm}$ (Fig. 4.1). Il rilevatore registra la fluorescenza della clorofilla trasmettendo un segnale amplificato e un microprocessore calcola l'intensità della fluorescenza nel corso del periodo di illuminazione.

Nel primo secondo (400 – 800 ms) di illuminazione del campione, la fluorescenza sale da un livello basale (F_0) ad un livello massimo (F_p). La curva di induzione della fluorescenza è rappresentata in grafico riportando il tempo, espresso in ms, sull'asse delle ascisse in scala logaritmica (Strasser e Govindjee, 1992 a, b; Strasser et al., 1995). Il *transient* fluorescente (FT) co-

si rappresentato mostra un andamento polifasico (Fig. 4.2). In particolare, nella curva sono evidenti due punti di flesso principali. Il primo appare a 2 – 3 ms ed è indicato con la lettera J; il secondo appare a 20 – 30 ms ed è indicato con la lettera I. La sequenza di punti O-J-I-P lungo il *transient* da il nome al JIP-test, e descrive gli eventi fotochimici di riduzione e successiva ri-ossidazione degli accettori di elettroni (Fig. 4.3).

Fra il punto O ed il punto P viene calcolata, con frequenza decrescente, l'intensità della fluorescenza ai diversi punti del *transient* (da un centinaio

Figura 4.1 – Rappresentazione della struttura della lampada del fluorimetro HandyPEA (Hansatech Instruments Ltd, UK).

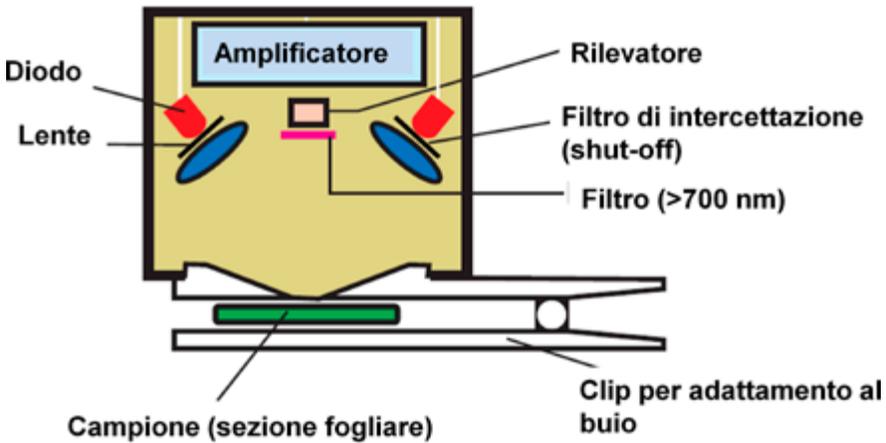


Figura 4.2 – Transient di fluorescenza della clorofilla (cinetica veloce), con indicazione delle diverse fasi (Hansatech Instruments Ltd, UK).

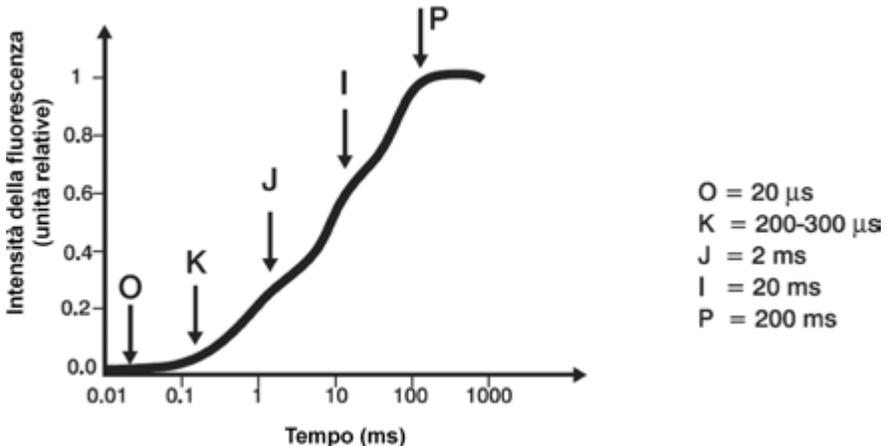
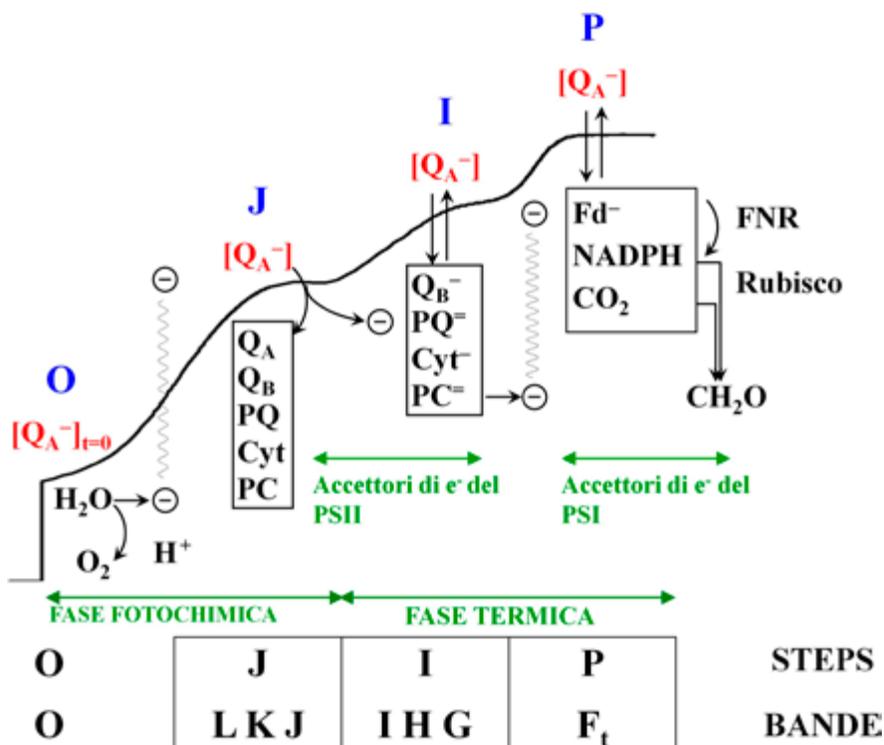


Figura 4.3 – Rappresentazione del transient di fluorescenza (cinetica veloce), da R. J. Strasser. Sono illustrati gli stati di riduzione del plastoquinone nei vari step del transient.



a un migliaio di punti, a seconda dello strumento usato). In tal modo è possibile disegnare la curva di cinetica veloce. Le misure ad intervalli intermedi sono utilizzate per il calcolo dei vari parametri di fluorescenza, e sono eseguite a 50 μ s (F1, o F₀), 100 μ s (F2, o F₁), 300 μ s (F3, o F_K), 2 ms (F4, o F_J), 30 ms (F5, o F_I) e alla massima intensità (F_V o F_M).

Il JIP-test si basa sulla teoria del flusso di energia nelle membrane dei tilacoidi (Strasser 1978, 1981). Questa teoria permette di ricavare semplici equazioni algebriche che esprimono l'equilibrio tra i flussi di energia, e consente di ottenere informazioni sull'utilizzazione dell'energia assorbita. Il JIP test viene utilizzato per ottenere informazioni dettagliate sulla struttura e funzione dell'apparato fotosintetico (soprattutto PSII), coerentemente con la teoria del flusso di energia nelle membrane dei tilacoidi e tra pigmenti fotosintetici nel PSII (Strasser et al., 2004).

L'analisi della curva OJIP consente una migliore comprensione del rapporto tra struttura e funzione degli apparati fotosintetici, e permette di valutare rapidamente la vitalità delle piante. Negli ultimi anni il JIP test è

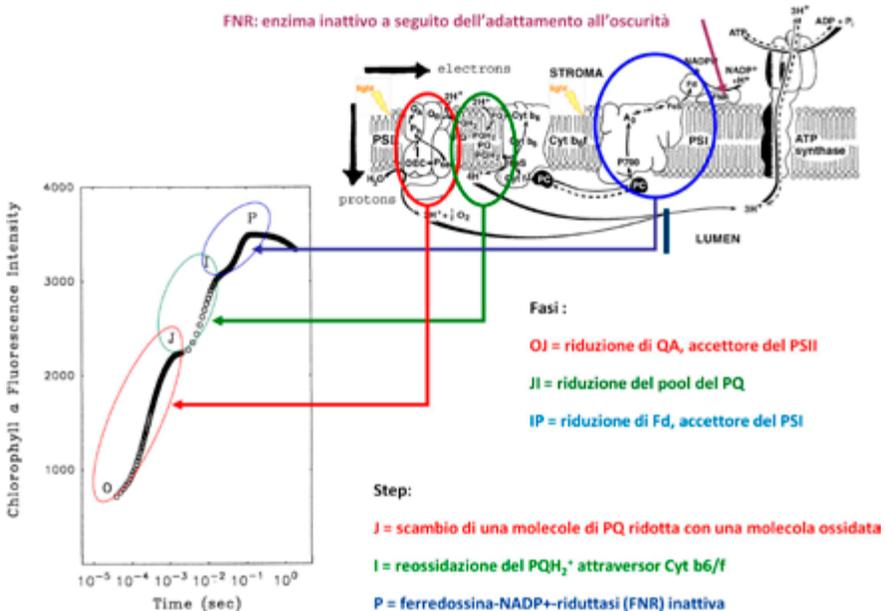
sempre più utilizzato in vari campi della biologia vegetale per valutare lo stato fisiologico del PSII. La valutazione della fisiologia dell'apparato fotosintetico è effettuata sulla base di analisi di vari gruppi di parametri. Per una review generale di questa tecnica e approfondimenti, vedi Strasser et al. 2000, 2004, 2010; Lazar, 1999, 2006; Tomek et al., 2001; Force et al., 2003; Antal e Rubin, 2008; Stirbet e Govindjee, 2011.

4.2. Il transient fluorescente

Il *transient* OJIP contiene tre fasi distinte (Fig. 4.4): O-J, J-I e I-P, che descrivono tre differenti processi. La crescita del segnale di fluorescenza nella fase O-J è legata alla riduzione dell'accettore primario del PSII, fino al primo punto di flesso (J), che indica l'inizio del processo di reossidazione del plastochinone. La fase O-J è detta "fase fotochimica", ed è individuata anche come *single turnover region*, cioè l'accettore primario Q_A è ridotto una sola volta.

La fase J-I rappresenta la riduzione del pool dei plastochinoni, fino al punto I che indica la completa riduzione di Q_B , cui segue la reossidazione del plastoidrochinone da parte del citocromo (cyt b_6/f). (Joliot and Joliot 2002; Schansker et al. 2005; Schreiber et al. 1989, Tóth et al. 2007). Infine, la fase I-P rappresenta la riduzione degli accettori finali di elettroni (NADP e

Figura 4.4 – Relazione fra le diverse fasi della curva O-J-I-P e lo stato di ossidriduzione dei trasportatori di elettroni (modificato da Ceppi, 2009, tesi di dottorato dell'Università di Ginevra, CH).



ferredossina) oltre il PSI (Schreiber et al. 1989; Schansker et al. 2005), fino al picco P (o M) dove avviene l'inattivazione dell'enzima FNR (ferredossina NADP⁺ riduttasi). Quest'ultima costituisce la parte più lenta del *transient* e il suo andamento è parallelo ad una nuova riduzione della plastocianina e del P700 nel PSI, come è stato confermato da vari esperimenti su organismi diversi, dai licheni alle piante superiori (Ilík et al. 2006; Schansker et al. 2005, 2006, 2008). La fase complessiva J-P è detta "fase termica" ed è determinata dai molteplici *turnover* di reazioni redox per giungere alla completa chiusura dei centri di reazione (*multiple turnover region*).

L'area normalizzata fra la curva del *transient* e la linea superiore definita da F_M (S_m), è proporzionale al numero di elettroni trasportati attraverso la catena di trasporto degli elettroni. N (numero di *turnover*) indica il numero di volte che Q_A viene ridotto e reossidato fino a che è raggiunta l'intensità massima di fluorescenza F_M .

L'analisi del *transient* fluorescente permette di descrivere i processi e le reazioni di ossido-riduzione che stanno alla base del trasporto di elettroni dalla eccitazione della clorofilla fino alla riduzione degli accettori finali (Fig. 4.5). Nell'ambito di un disegno sperimentale o di uno studio osservazionale, l'obiettivo è quello di evidenziare e quantificare le differenze di un *transient* proveniente da un trattamento rispetto ad un *transient* di controllo. Per ottenere questo obiettivo i *transient* vengono normalizzati fra F_0 e F_M ($F_0 = 0$, $F_M = 1$), calcolando per ciascun punto t fra gli estremi 0 e P delle due curve, la rispettiva fluorescenza variabile relativa (V_t):

$$V_t = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$$

Ad ogni punto delle curve normalizzate fra F_0 e F_M viene sottratta l'intensità di fluorescenza variabile (V) del campione di controllo dall'intensità di fluorescenza variabile del campione trattato, ottenendo in tal modo la curva ΔV :

$$\Delta V = V_{\text{trattato}} - V_{\text{controllo}}$$

Si può seguire lo stesso procedimento effettuando la normalizzazione solo su settori parziali della curva (per esempio, fra F_0 e F_J). In tal caso il segmento di curva considerato viene indicato in pedice:

$$\Delta V_{(0-J)} = V_{(0-J)\text{trattato}} - V_{(0-J)\text{controllo}}$$

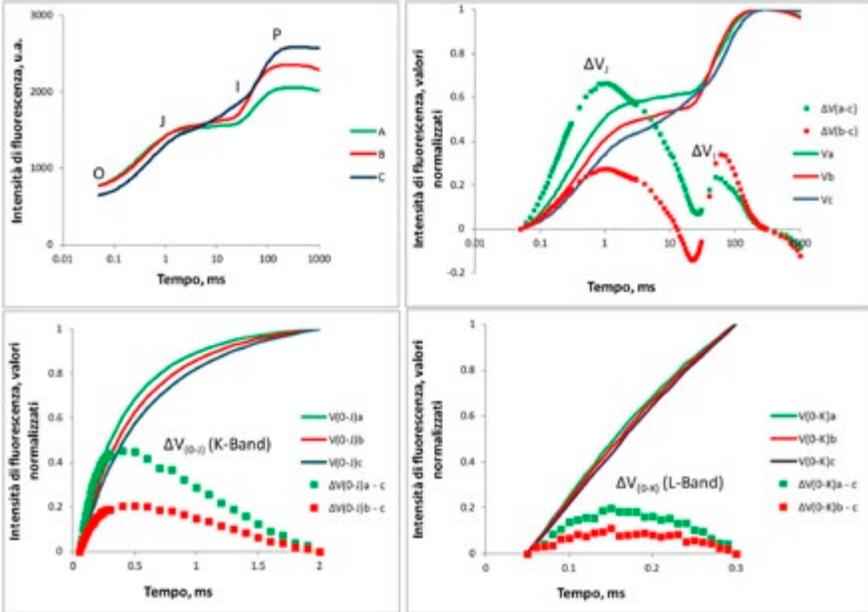
Nel riquadro B della Fig 4.5 sono presentate le curve (V) normalizzate fra F_0 e F_M , in cui ogni punto (V_t) indica la fluorescenza variabile relativa al punto t [$V_t = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$]. Le curve ΔV sono prodotte per sottrazione "trattato - controllo", cioè: [$V(a, b) - V_c$]. Il picco principale al punto J (ΔV_J), e quello meno marcato al punto I (ΔV_I) indicano un rallentamento del trasporto di elettroni in queste due fasi.

60 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

Figura 4.5 - Esempi di normalizzazione e sottrazione di transient di fluorescenza (FT). Nel riquadro A sono presentati 3 FT, di cui uno rappresenta il controllo (C), mentre gli altri 2 derivano da trattamenti con diserbanti, che sono indicati in maniera generica come "trattamento A" e "trattamento B". Gli step O-J-I-P sono indicati sulle curve. Si può vedere che i trattamenti inducono l'aumento del valore di F_0 e la diminuzione di F_M . Ciò comporta la diminuzione di F_V/F_M .

Nel riquadro C sono presentate le curve (V) normalizzate fra F_0 e F_M , in cui ogni punto (Vt) indica la fluorescenza variabile relativa al punto t [$V_{(0)t} = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$]. Le curve $\Delta V_{(0-j)}$ sono prodotte per sottrazione "trattato - controllo", cioè: [$(V_{(0-j)a, b} - V_{(0-j)c})$]. Il picco al punto K ($\Delta V_{(0-j)K}$) rappresenta la Banda K, che indica la inattivazione del OEC (oxygen evolving complex).

Nel riquadro D sono presentate le curve $V_{(0-K)}$ normalizzate fra F_0 e F_K , in cui ogni punto [$V_{(0-K)t}$] indica la fluorescenza variabile relativa al punto t [$V_{(0-K)t} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$]. Le curve $\Delta V_{(0-K)}$ sono prodotte per sottrazione "trattato - controllo", cioè: [$(V_{(0-K)a, b} - V_{(0-K)c})$]. Il picco al punto L ($\Delta V_{(0-K)L}$) rappresenta la Banda L, che indica la perdita di connettività del complesso tripartito antenna principale - LHC - centro di reazione.



4.3. La regione del turnover singolo (single-turnover region)

La regione del *turnover* singolo, o fase fotochimica, è quella parte del *transient* compresa fra i punti O e J (da 0,005 a 2 ms) e descrive il primo ciclo di riduzione del plastochinone, cioè quando Q_A è ridotto una sola volta. L'interpretazione del significato del punto J è basata sull'evidenza sperimentale (Stirbet e Govindjee, 2011), secondo cui la fase O-J (normalizzata

come V_j) della fluorescenza variabile relativa di un campione fotosintetico, è molto simile alla fluorescenza variabile relativa ottenuta in presenza di DCMU (3-(3,4 diclorofenil)-1, 1dimetilurea), quando cioè il trasporto di elettroni da Q_A a Q_B è bloccato. È noto che, in presenza di DCMU, Q_A è ridotto una sola volta fra F_0 e F_M (Fig. 4.6). Il fatto che il livello J è più basso di F_M è dovuto alla re-ossidazione di Q_A^- a seguito del successivo trasporto di elettroni. Perciò $(1 - V_j)$ è assunto come misura per l'efficienza del trasporto di elettroni.

Immediatamente dopo il punto J può verificarsi una riduzione dell'intensità della fluorescenza, espressa graficamente con una depressione indicata dalla lettera D ("dip"). La depressione D indica una parziale riossidazione di Q_A (Ilík et al., 2006) (Fig. 4.7).

Figura 4.6 – *Transient fluorescente in foglie trattate con l'erbicida DCMU ((3-(3,4 diclorofenil)-1,1dimetilurea, Diuron, curve in rosso), che blocca il trasporto degli elettroni da parte degli accettori del PSII. La fluorescenza massima viene registrata al punto J. Le curve in verde rappresentano i campioni non trattati (R.J. Strasser).*

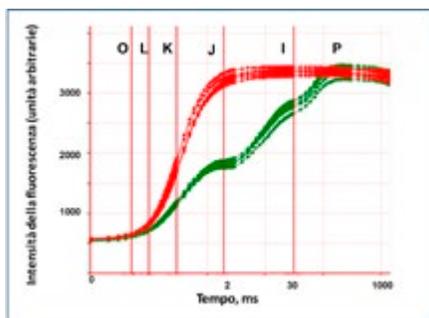
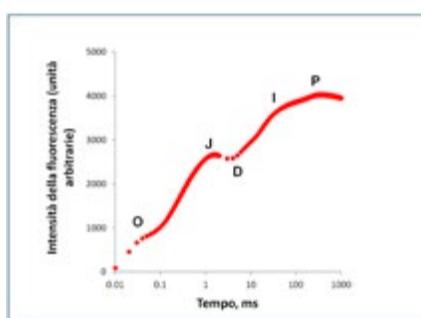


Fig. 4.7 – *Punto D (dip, o depressione) che si manifesta talvolta dopo il punto J.*



4.3.1 La banda K e la limitazione dell'Oxygen Evolving Complex (OEC)

A seguito di uno stress da calore somministrato su dischi fogliari di *Pisum sativum*, Srivastava et al. (1997) hanno mostrato che, oltre agli effetti principali sul *transient* OJIP, un'ulteriore punto K appare fra O e J. La banda K diventa visibile a 200 – 300 μ s e, in tal modo, il *transient* diventa OKJIP. La comparsa del punto K è conseguenza di due eventi: (i) limitazione dell'efficienza del donatore di elettroni dal OEC (*Oxygen Evolving Complex*); (ii) cambio dell'architettura del PSII con un'alterata distribuzione dell'energia nei complessi pigmento-proteina e l'intera unità fotosintetica.

A causa del danneggiamento dell'OEC, il rifornimento continuo di elettroni verso il centro di reazione è diminuito. Dopo un rapido incremento della fluorescenza, dovuto alla riduzione del $Q_{A'}$, continua la riossidazione di Q_A^- a Q_A a causa del trasferimento di elettroni verso Q_B , ma, per la mancanza di elettroni da parte del donatore (OEC), la fluorescenza si riduce formando il punto K. Il punto K nel *transient* fluorescente indica lo stato del centro di reazione del PSII, e può essere considerato un indice del bilancio fra l'attività dei donatori di elettroni e il trasporto attraverso il centro di reazione.

Il valore di K può essere determinato aritmeticamente con la sottrazione della fluorescenza variabile nel *transient* normalizzato fra F_0 e F_J (Fig. 4.5 C), come di seguito riportato:

$$V_{(0-J)K} = (F_{300\mu s} - F_0)/(F_J - F_0)$$

Si osserva che K non appare ad un tempo preciso (piuttosto che di picco si preferisce parlare di banda), per cui talvolta si preferisce usare, per la sua determinazione, un metodo grafico.

4.3.2 La banda L e la connettività

La struttura del PSII può essere descritta per mezzo di un modello tripartito formato da un centro di reazione (RC), un'antenna strettamente connessa ad esso (*core*) e *Light Harvesting Complex* (LHC) (Srivastava et al., 1997). Il sistema si considera ben connesso quando la fase iniziale del *transient* è rappresentata da una curva sinusoidale (con un indice di curvatura della curva (C) uguale a 1), mentre è completamente non connesso quando la forma iniziale del *transient* è un'iperbole (C = 0). La curvatura dell'iperbole è rappresentata dall'equazione (Strasser e Stirbet, 2001; Strasser et al., 2004):

$$C = (W_E - W_{100})/W_{100}(1 - W_E V_J)$$

dove:

$$W_{100} = (F_{100\mu s} - F_{50\mu s})/(F_{2ms} - F_{50\mu s})$$

$$W_{E, 100\mu s} = 1 - [(F_{2ms} - F_{300\mu s})]^{1/5}$$

W_{100} è la fluorescenza variabile a 100 s del *transient* fluorescente normalizzato fra O e J. W_E è la fluorescenza variabile a 100 μs del *transient* fluorescente simulato, corrispondente al campione in assenza di connettività tra le unità del PSII (Joliot e Joliot, 1964). Da qui si arriva al calcolo della

grouping probability (P_{2G}). Questo parametro tiene conto delle possibili vie di comunicazione energetica delle componenti dei fotosistemi. La connessione e la cooperazione fra queste componenti sono la condizione per cui l'energia fluisca fra le antenne e i RC. La *grouping probability* (P_{2G}) (Strasser, 1978, 1981) è espressa dalla formula:

$$P_{2G} = C(F_0/F_V)$$

Il cambiamento della forma all'inizio della curva di induzione riflette cambiamenti nel trasferimento dell'energia di eccitazione fra le unità del PSII. Nella prima fase dell'induzione della fluorescenza è possibile osservare una banda L (L-band), a circa 100 – 150 μ s. La banda L riflette la trasformazione della cinetica del *transient* da sigmoidale a esponenziale (Stirbet et al., 1998; Strasser and Stirbet, 2001) e indica la perdita di connettività.

La banda L può essere determinata sottraendo i *transient* normalizzati fra F_0 e $F_{300\mu s}$ (Fig. 4. 5 D), e può essere espressa come:

$$V_{(OK)100} = (F_{100\mu s} - F_{50\mu s}) / (F_{300ms} - F_{50\mu s})$$

Questo è un modo alternativo per descrivere la perdita di connettività nel complesso tripartito del PSII.

4.3.3. La regione dei *turnover* multipli (*multiple-turnover region*)

La regione dei *turnover* multipli (detta anche fase termica) è compresa fra i punti J e P e riflette le reazioni multiple di ossidoriduzione attraverso le quali si giunge alla completa riduzione del plastochinone. In questa regione si trova il punto I, a circa 30 ms. Secondo vari autori (Schansker et al. 2005; Oukarroum et al., 2009; Kalachanis e Manetas, 2010), la traiettoria nel tratto I-P è influenzata dalla fluorescenza proveniente dal PSI. In particolare, quando gli accettori finali non sono in grado di ricevere il flusso di elettroni si crea una sorta di "ingorgo" che si traduce in un picco allo step I nelle curve ΔV (Fig. 4. 5 B).

Gli eventi fotochimici attorno al PSI possono essere espressi con il parametro ΔV_{I-P} che indica l'ampiezza della fase I-P:

$$\Delta V_{(I-P)} = (F_M - F_I) / (F_M - F_0) = 1 - V_I$$

Graficamente l'ampiezza della fase I-P viene descritta per mezzo delle curve $\Delta V_{(I-P)'}$ dove

$$V_{(I-P)} = (F_{(I-P)} - F_I) / (F_M - F_I)$$

In questa regione della curva sono state inoltre descritte due bande (H e G) che si trovano rispettivamente a circa 20 e 100 ms. La banda H è connessa con la formazione di PQ_B^{2-} da PQ_B^- ; la banda G indica la parziale riossidazione del PQ_B^{2-} a plastididrochinone (Tsimilli-Michael e Strasser, 2008). Queste bande possono essere rese visibili normalizzando e sottraendo i *transient* fra J e P. Si conosce ancora poco sul significato di queste due bande.

4.4. Parametri del JIP-test

Il JIP-test consente di effettuare un'analisi completa dei flussi di energia (**ABS**= *AB*sorption; **TR**= *TR*apping capacity; **DI** = *D*Issipation; **ET** = *E*lectron Transport; **RE** = *R*eduction of End acceptors).

I flussi possono essere espressi come *yield* (rese quantiche, indicate col simbolo ϕ , che indicano la percentuale di quanti assorbiti che vanno ad alimentare un determinato flusso) o come *probabilità*.

Inoltre si hanno i *flussi specifici* (per centro di reazione, **RC**) e i *flussi fenomenologici* per sezione trasversale del campione (per *cross section*, **CS**). La combinazione di diversi parametri consente infine di calcolare gli *indici di vitalità*. I flussi di energia e le relazioni fra i parametri sono schematizzati nella Figura 4.8.

4.4.1. Parametri tecnici misurati e calcolati sul *transient* di fluorescenza

Valori originari del transient

$F_0 \equiv F_{50\mu s}$ ($F_{20\mu s}$) - Fluorescenza basale, misurata dopo 50 (20) microsecondi;

F_T - Fluorescenza al tempo T dall'inizio dell'illuminazione;

$F_L \equiv F_{100\mu s}$ - Fluorescenza a 100 μs (indica lo stato della connettività del sistema tripartito LHCII-antenna-RC);

$F_K \equiv F_{300\mu s}$ - Fluorescenza a 300 μs (indica lo stato di attivazione dell'*Oxygen Evolving System*);

$F_J \equiv F_{2ms}$ - Fluorescenza a 2 ms (indica la riduzione del Q_A);

$F_I \equiv F_{30ms}$ - Fluorescenza a 30 ms indica la riduzione del pool dei plastochinoni - Q_A e Q_B);

F_M ($F_P = \bar{F}_M$) - Fluorescenza massima (P, picco);

t_{FM} - Tempo (in ms) necessario per raggiungere la fluorescenza massima;

A_M - Area sopra la curva di induzione di fluorescenza.

Valori derivati e rapporti

$F_V \equiv F_t - F_0$ - Fluorescenza variabile a un tempo intermedio t;

$F_{V_M} \equiv (F_M - F_0)$ - Fluorescenza variabile massima;

F_V/F_0 - Massima efficienza di fotolisi dell'acqua;

$V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$ - Fluorescenza variabile relativa al tempo t;

$V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$ - Fluorescenza variabile relativa al punto J (2 ms);

$V_I = (F_I - F_0)/(F_M - F_0)$ - Fluorescenza variabile relativa al punto I (30 ms);
 $M_0 \equiv (\Delta V/\Delta t)_0 = 4(F_{300\mu s} - F_0)/(F_M - F_0)$ - Pendenza iniziale, calcolata rispetto a F_{300} (in ms^{-1}) del *transient* di fluorescenza normalizzato sulla fluorescenza variabile $V = f(t)$;

$M_G \equiv dVG/dt = 20(F_{100} - F_0)/(F_M - F_0)$ - Pendenza iniziale calcolata rispetto a F_{100} (in ms^{-1}) del *transient* di fluorescenza normalizzato sulla fluorescenza variabile $V = f(t)$;

$S_s \equiv V_I/M_0$ - Area normalizzata sopra la fase O-J del *transient* (*single turnover events* di riduzione del Q_A). Il valore minimo di S_s si verifica quando ciascuno Q_A è ridotto solo una volta (per esempio, in presenza di DCMU),

$V_{(0-J)300} = (F_{300\mu s} - F_{50\mu s})/(F_{2ms} - F_{50\mu s})$ - Fluorescenza relativa variabile a 300 μs , nella fase F_0-F_J . Indica la banda-K;

$V_{(0-K)100} = (F_{100\mu s} - F_{50\mu s})/(F_{300ms} - F_{50\mu s})$ - Fluorescenza relativa variabile a 100 μs , nella fase F_0-F_K . Indica la banda L;

$P_{2G} = C(F_0/F_V)$ - *Overall grouping probability* (Strasser, 1978), maggiori particolari nel paragrafo 4.3.

$S_M \equiv (A_M)/(F_M - F_0) = A_M/F_V = EC/RC$ - Area normalizzata sopra la curva OJIP (riflette *multiple turnover events* di riduzione del Q_A). Misura il contenuto totale di trasportatori di elettroni (EC= Electron Carriers) per RC. Questo parametro determina il numero di accettori di elettroni nel PSII, rispetto al contenuto di clorofilla del campione (Schreiber et al., 1994, Babani et al., 1996).

$N \equiv (S_M/S_s) = S_M M_0 (1/V_I)$ - Numero di turnover, cioè il numero di eventi di riduzione del Q_A fra il tempo 0 e T_{FM} ;

$V_{AV} = 1 - (S_M/t_{FM})$ - Fluorescenza media variabile da 0 a T_{FM} ;

S_M/T_{FM} - Energia di eccitazione media dei centri di reazione aperti nell'intervallo temporale da 0 a P;

$\Delta V_{I-P} = (F_M - F_I)/(F_M - F_0) = (1 - V_I)$ - Ampiezza della fase I-P.

4.4.2. Yield e probabilità (misurati al tempo 0, $t=0$)

$\phi_{P0} \equiv TR_0/ABS = [1 - (F_0/F_M)] = F_V/F_M$ - Resa quantica massima delle reazioni fotochimiche primarie. Esprime la massima probabilità di catturare l'energia dei fotoni assorbiti dell'antenna da parte dei centri di reazione del PSII;

$\phi_{Pt} \equiv F_{Vt}/F_M$ - Resa quantica ad ogni punto t del *transient*;

$\phi_{D0} \equiv DI_0/ABS = 1 - \phi_{P0} = (F_0/F_M)$ - Resa quantica massima per la dissipazione di energia al livello dell'antenna;

$\psi_0 \equiv ET_0/TR_0 = (1 - V_I)$ - Probabilità ($t=0$) che un elettrone catturato dal centro di reazione sia trasferito oltre il Q_A ;

$\phi_{E0} \equiv ET_0/ABS = [1 - (F_0/F_M)] \psi_0 = \phi_{P0} \cdot \psi_0$ - Resa quantica massima per il trasporto degli elettroni;

$\delta_{R0} \equiv RE_0/ET_0 = (1 - V_I)/(1 - V_J) = (F_M - F_I)/(F_M - F_J)$ - Probabilità che un elettrone proveniente dalla catena di trasporto sia trasferito oltre il PSI per ridurre un accettore finale;

$\phi_{R0} \equiv RE_0/ABS = [1 - (F_0/F_M)] (1 - V_1) = 1 - F_1/F_M$ - Resa quantica massima per la riduzione di accettori finali oltre il PSI;

$\phi_{PAV} = \phi_{P0} (1 - V_{AV}) = \phi_{P0} (S_M/T_{FM})$ - Resa quantica media delle reazioni fotochimiche primarie.

4.4.3. Flussi di energia specifica per centro di reazione (in unità arbitrarie)

$ABS/RC = M_0 (1/V_J) (1/\phi_{P0})$ - Flusso di energia assorbita da un centro di reazione attivo (RC). Misura la dimensione apparente dell'antenna;

$RC/ABS = Chl_{RC}/(Chl_{Antenna}) = [1 - (F_0/F_M)]/(M_0/V_J) = \phi_{P0} (V_J/M_0)$ - Centri di reazione attivi per unità di clorofilla (Chl) costituente l'antenna (è il reciproco di ABS/RC);

$TR_0/RC = M_0 (1/V_J)$ - Flusso di energia (che riduce Q_A) catturato da un centro di reazione attivo (RC) ($t = 0$);

$ET_0/RC = M_0 (1/V_J) \psi_0$ - Trasporto di elettroni oltre Q_A^- per RC ($t=0$);

$DI_0/RC = [(ABS/RC) - (TR_0/RC)]$ - Dissipazione di energia totale per RC (calore, fluorescenza e trasferimento ad altri sistemi), a $t = 0$;

$RE_0/RC = [M_0 (1/V_J) (1 - V_1)]$ - Flusso di elettroni destinati alla riduzione degli accettori finali oltre il PSI, per RC ($t=0$).

4.4.4. Flussi fenomenologici (per sezione trasversale) (in unità arbitrarie)

I flussi fenomenologici vengono determinati in base all'assorbimento (ABS) di energia per sezione trasversale (*Cross Section* = CS).

ABS/CS è correlato alla quantità di clorofilla nel campione. L'assorbimento (ABS) è uguale alla estinzione fotochimica e non fotochimica di energia moltiplicata per la concentrazione di clorofilla, dove (Krüger et al., 1997; Strasser et al., 2000):

$$ABS = (k_N, k_P) Chl$$

k_P = costante fotochimica; k_N = costante non fotochimica

ABS/CS viene determinato empiricamente in base al contenuto di clorofilla. Il JIP-test assume che la quantità di clorofilla sia proporzionale a F_0 e/o a F_M per cui si usano le espressioni: $ABS/CS_0 (\approx F_0)$ e $ABS/CS_M (\approx F_M)$. L'espressione ABS/CS_{chl} indica invece che l'assorbimento è stato determinato con una misura di riflettenza della clorofilla. Più in generale, possiamo usare l'espressione ABS/CS_x (dove $CS_x = CS_0$ o CS_M o CS_{chl}).

$TR_0/CS_x = \phi_{P0} (ABS/CS_x)$ - flusso di energia trattenuto per CS ($t = 0$);

$ET_0/CS_x = \phi_{E0} (ABS/CS_x)$ - trasporto degli elettroni per CS ($t = 0$);

$DI_0/CS_x = [(ABS/CS_x) - (TR_0/CS_x)]$ - flusso di dissipazione termica di energia per CS ($t = 0$);

$RE_0/CS_x = \phi_{R0} (ABS/CS_x)$ - riduzione degli accettori finali per CS ($t = 0$).

4.4.5. Densità dei centri di reazione (in unità arbitrarie)

$RC/CS_x = [\phi_{P0} (V_j/M_0) (ABS/CS_x)]$ - Questo parametro misura la quantità di centri di reazione attivi, cioè in grado di ridurre l'accettore primario del PSII (Q_A). Bassi valori indicano, al contrario, la presenza di centri di reazione inattivi, che non riducono il Q_A e non contribuiscono alla fluorescenza. I centri di reazione inattivi sono definiti anche "*silent centers*" e contribuiscono alla dissipazione di energia sotto forma di calore. Si tratta di un meccanismo di *down-regulation* atto a ridurre l'eccitazione.

4.4.6. Indici di vitalità (in unità arbitrarie)

Structure Function Index (SFI)

$SFI_P \equiv (Chl_{RC}/Chl_{TOT}) \phi_{P0} \psi_0$ - Gli indici struttura-funzione sono 2. Il primo, SFI_P , è relativo ai caratteri strutturali e funzionali del PSII che guidano il trasporto degli elettroni. Il secondo, SFI_N , è relativo all'energia dissipata o persa durante il trasporto fotosintetico degli elettroni.

$SFI_N \equiv [1 - (Chl_{RC}/Chl_{TOT})] (1 - \phi_{P0}) (1 - \psi_0)$ - Da questi deriva il Performance Index (vedi sotto) come rapporto: $PI \equiv SFI_P / SFI_N$.

Performance Index (PI)

La attività fotosintetica allo stato iniziale di un centro di reazione è regolata da tre fasi funzionali: la capacità di assorbimento di energia (ABS), la capacità di trattenere l'energia di eccitazione (TR_0) e la conversione di tale energia in trasporto di elettroni (ET_0). Strasser et al. (2000) hanno introdotto una espressione multiparametrica di queste tre fasi indipendenti che contribuiscono alla fotosintesi. Il Performance Index (PI_{ABS}) esprime la capacità potenziale per la conservazione di energia, dai fotoni assorbiti nel PSII alla riduzione degli accettori di elettroni nell'intersistema fra PSII e PSI.

$$PI_{ABS} = \left[\frac{\gamma_0}{1-\gamma_0} \right] \left[\frac{\phi P_0}{1-\phi P_0} \right] \left[\frac{\psi_0}{1-\psi_0} \right]$$

dove γ è la frazione di clorofilla dei centri di reazione (Chl_{RC}) rispetto alla clorofilla totale ($Chl_{RC} + Chl_{Antenna}$). Perciò, $\gamma/(1-\gamma) = Chl_{RC}/Chl_{Antenna} = RC/ABS$.

Utilizzando i dati originali ed i parametri derivati del *transient* avremo:

$$PI_{ABS} \equiv [1 - (F_0/F_M)]/[M_0/V_j] [(F_M - F_0)/F_0] [(1 - V_j)/V_j]$$

Applicando ulteriormente il flusso RE (*Reduction of End acceptors*) [$\delta_{R0}/(1 - \delta_{R0})$] avremo il Performance Index totale (PI_{TOT}), che esprime la capacità

potenziale per la conservazione di energia dei fotoni assorbiti dal PSII, fino alla riduzione degli accettori finali oltre il PSI.

$$PI_{TOT} \equiv PI_{ABS} [\delta_{R0}/(1 - \delta_{R0})]$$

o, in altri termini

$$PI_{TOT} \equiv [1 - (F_0/F_M)]/[M_0/V_j] [(F_M - F_0)/F_0] [(1 - V_j)/V_j] [(1 - V_i)/(1 - V_i)]$$

A sua volta, il Performance Index per sezione trasversale (CS) è definito come segue:

$$PI_{ABS(CS)} = ABS/CS PI_{ABS} \text{ (dove } ABS/CS = F_0 \text{ o } F_M \text{ o } Chl)$$

$$PI_{TOT(CS)} = ABS/CS PI_{TOT} \text{ (dove } ABS/CS = F_0 \text{ o } F_M \text{ o } Chl)$$

Il Performance Index è il prodotto di espressioni del tipo $[pi/(1 - pi)]$, dove pi ($i = 1, 2, \dots, n$) indica probabilità o rapporto. Simili espressioni sono note in chimica come "equazione di Nernst", dove pi rappresenta la frazione ridotta, e $(1 - pi)$ la frazione ossidata di un certo composto, e $\log[pi/(1 - pi)]$ esprime il potenziale, o *driving force*, della corrispondente reazione di ossido-riduzione.

Driving Forces (D. F.)

Estrapolando dalla chimica le inferenze sopra esposte, $\log(PI)$ può essere definito come *driving force* (DF) totali per la fotosintesi del sistema osservato. DF è ottenuta sommando le DF parziali per ciascuna biforcazione energetica, al tempo 0 (inizio del *transient* O-J-I-P).

$$DF_{ABS} \equiv \log(PI_{ABS}) = \log(RC/ABS) + \log(\phi_{P_0}/1 - \phi_{P_0}) + \log(\Psi_{E_0}/1 - \Psi_{E_0})$$

E, similmente:

$$DF_{TOT} \equiv DF_{ABS} + \log(\delta_{R0}/1 - \delta_{R0})$$

Il potenziale effettivo della reazione di ossido-riduzione è calcolato usando come riferimento il potenziale standard della reazione considerata:

$$\Delta DF = DF_{treated} - DF_{control}$$

4.4.7. Parametri conformazionali

I parametri conformazionali sono **Sumk** (somma delle costanti di de-eccitazione fotochimica e non fotochimica), **k_p** (costante fotochimica di

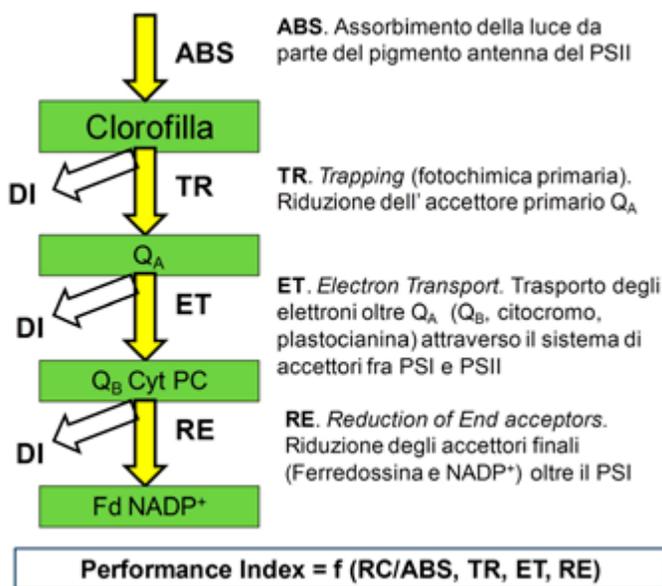
de-eccitazione) e k_N (costante non fotochimica di de-eccitazione). Questi parametri sono basati sulla teoria dei flussi di energia nelle biomembrane (Sironval et al. 1981; Strasser 1978, 1981), e le espressioni ad essi relative sono state elaborate da Havaux et al. (1990, 1991).

La costante di de-eccitazione non fotochimica (k_N) somma k_D (dissipazione sotto forma di calore), k_F (fluorescenza) e k_X (migrazione di energia verso il PSI, o spill-over) [$k_N = k_D + k_F + k_X$], ed è calcolato come [$k_N = (ABS/CS) k_F (1/F_M)$].

La costante di de-eccitazione fotochimica (k_p) esprime la capacità di alimentare la catena di trasporto degli elettroni, ed è calcolata come: [$k_p = (ABS/CS) k_F \{(1/F_0) - (1/F_M)\}$].

Infine, il valore complessivo della costante fotochimica e non fotochimica (Sumk) esprime l'abilità di gestire il flusso di elettroni evitando danni dovuti alla sovra-eccitazione, ed è calcolata come: [$k_N + k_p = (ABS/CS) k_F (1/F_0)$].

Figura 4.8. Rappresentazione schematica della "cascata di energia".



4.5. Protocolli di fluorescenza diretta

Fluorimetri a fluorescenza diretta come HandyPEA o PocketPEA (Hansatech Ltd.) consentono di modificare le impostazioni e di creare dei protocolli di misura personalizzati. L'uso più comune di questo strumento è a "impulso luminoso singolo", cioè viene misurata la risposta nel corso di un singolo flash. In questo caso è consigliato usare la lampada nella massima

intensità consentita dallo strumento stesso (generalmente attorno a 3000 – 3500 μmol di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Qualora si rischi di avere una misura “fuori scala”, per mantenere la comparabilità fra i *transient* è preferibile ridurre il *gain* (cioè l’amplificazione del segnale) piuttosto che l’intensità della lampada. In tal modo si otterrà la massima omogeneità dei *transient*. Il “*gain*” viene invece aumentato quando il contenuto di clorofilla nel campione è molto basso. Il tempo di esposizione consigliato per singoli impulsi di illuminazione è 1 sec.

Altri protocolli prevedono la possibilità di impulsi multipli, di durata e intensità variabile. È possibile inoltre preilluminare il campione portandolo quindi ad uno stato di adattamento alla luce. In tal modo si può misurare F_M' (e quindi determinare NPQ) tramite preilluminazione con luce rossa (per la durata di 5 min) e successivi impulsi saturanti (ogni 30 sec) di 3000 μmol di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Un altro protocollo, consistente in due impulsi saturanti successivi (3000 μmol di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), consente di misurare la velocità di reossidazione al buio del plastochinone (Ceppi G., tesi di dottorato dell’Università di Ginevra, CH). La funzione del primo impulso è quella di saturare la catena di trasporto degli elettroni. Durante l’intervallo di buio tale catena si reossida parzialmente. La differenza di F_J può essere interpretata come una misura del grado di reossidazione del pool del PQ nel corso del periodo di buio (Tóth et al., 2007).

4.6. Le assunzioni del JIP-test

L’interpretazione del *transient* fluorescente dipende dalle assunzioni fatte. Una volta che la tecnica è stabilizzata dall’uso si tende a dimenticare le assunzioni, oppure si dimentica che tali assunzioni non sempre sono state completamente provate sperimentalmente. Per fare un esempio, nell’analisi dei *quenching* l’assunzione fatta è che, applicando un impulso luminoso sufficientemente forte, è possibile avere tutti i centri di reazione chiusi. Tuttavia è stato dimostrato sperimentalmente che in foglie adattate alla luce ciò non è sempre vero. Le assunzioni fatte nel caso del JIP-test sono le seguenti (Stirbet e Govindjee, 2011):

1. La fluorescenza del PSI è costante e, a temperatura ambiente, il suo contributo alla fluorescenza complessiva è molto basso. Di conseguenza il segnale fluorescente del PSI può essere trascurato nella maggior parte dei casi.
2. Per semplificare l’approccio teorico, le unità del PSII sono considerate tutte omogenee e attive, cioè tutte sono ritenute essere capaci di svolgere attività fotochimica.
3. Nel medesimo stato fisiologico (cioè in campioni adattati al buio o alla luce), un centro di reazione aperto del PSII (Q_A ossidato) ha una minima emissione di fluorescenza, mentre un centro di reazione chiuso (Q_A

ridotto) ha una emissione di fluorescenza massima. Si assume pertanto che l'aumento dell'intensità del segnale fluorescente sia dovuto soprattutto alla riduzione del Q_A , che determina la traiettoria complessiva della curva OJIP.

4. Nonostante che il segnale di fluorescenza misurato provenga dal complesso dei pigmenti dell'antenna, la struttura e l'organizzazione delle proteine nell'antenna stessa viene ignorato. L'antenna è considerata un blocco omogeneo di molecole di clorofilla che servono i rispettivi centri di reazione. Inoltre l'eventuale contributo dei pigmenti accessori (Chl_b, carotenoidi, ficobiline) è ignorato. Nelle alghe verdi e nelle piante superiori l'efficienza di trasferimento dell'energia di eccitazione è 100%.
5. I centri di reazione del PSII sono considerati indipendenti, non connessi l'uno con l'altro.
6. L'aumento di fluorescenza da 0 fino a P è considerata essere così veloce da non consentire variazioni significative dello stato fisiologico del campione, cioè la struttura e la conformazione dell'apparato fotosintetico rimane costante nel corso del *transient*.
7. In campioni adattati al buio per 20 – 30 minuti Q_A , così come il pool dei plastochinoni (PQ), è ritenuto essere nello stato ossidato.
8. Tutti i centri di reazione del PSII sono chiusi (ridotti) se soggetti ad un impulso luminoso di sufficiente intensità. Perciò alla fine del *transient* OJIP, quando viene misurata la fluorescenza massima $F_M \equiv F_P$, tutte le molecole Q_A sono considerati essere allo stato ridotto Q_A^- .
9. La capacità di trattenuta del flusso di elettroni rappresenta la frazione dei fotoni assorbiti dall'antenna usati per la separazione di carica primaria e la stabilizzazione del fotosistema come P680⁺ Q_A . Non si ritiene che la possibile ricombinazione di carica fra il centro di reazione P680⁺ e Feo⁻ possa influenzare il valore di ϕ_{p0} .
10. Quando l'intensità della fluorescenza raggiunge il livello J (2 ms) Q_A è ridotto una sola volta (*turnover* singolo) (Strasser e Strasser, 1995).
11. Il valore di F_0 (o F_M) indica il contenuto di clorofilla e rappresenta approssimativamente il flusso dei fotoni assorbiti, espresso dal rapporto ABS/CS (assorbimento su sezione trasversale – *cross section*).

Fotosintesi netta e fluorescenza della clorofilla

La fluorescenza della clorofilla è direttamente collegata agli eventi della fase luminosa, ma non registra ciò che avviene nel ciclo di Calvin-Benson. In altre parole, la fluorescenza descrive l'efficienza nel catturare e trasportare elettroni, ma non sull'utilizzazione degli elettroni stessi. Gli elettroni infatti, oltre che per la riduzione del carbonio, possono essere utilizzati nella fotorespirazione, nella riduzione dei nitrati, nella reazione di Mehler, nel ciclo acqua-acqua e in altri percorsi metabolici che hanno lo scopo di gestire l'eccesso di elettroni indotto dalle alte radiazioni luminose (Maxwell et al., 1997; Ort e Baker, 2002).

Di conseguenza la fluorescenza non riflette direttamente la performance dell'intero processo fotosintetico e non da informazioni sulla fotosintesi netta (P_N). Per avere un quadro più completo, i parametri derivanti dalla fluorescenza dovrebbero essere analizzati congiuntamente ad altri dati come la velocità di evoluzione dell'ossigeno e l'organizzazione della CO_2 (Krause e Weiss 1991).

La fotosintesi può essere misurata per mezzo del consumo di CO_2 o dello sviluppo di O_2 , e vari strumenti (detti *gas analyzer*) permettono di raggiungere questo scopo. L'assimilazione della CO_2 avviene nel ciclo di Calvin-Benson, mentre il rilascio di ossigeno avviene grazie all'attività dell'*Oxygen Evolving Complex* (OEC), direttamente connessa con il funzionamento del PSII. Grazie alla misura dell'ossigeno prodotto è possibile confrontare l'efficienza del PSII con la quantità di gas prodotti dalle reazioni fotochimiche.

Anche se non necessariamente proporzionali, esistono relazioni misurabili anche fra la fluorescenza della clorofilla ed il consumo di CO_2 . La fotosintesi netta può essere considerata come funzione delle seguenti variabili: (i) l'efficienza del trasporto di elettroni; (ii) la limitazione stomatica, cioè la capacità di rifornimento di CO_2 derivante dall'apertura stomatica; e

(iii) la limitazione del mesofillo, cioè la capacità delle cellule fotosintetiche di assumere il carbonio. Di questi tre fattori il primo viene espresso attraverso parametri di fluorescenza.

5.1. Campioni adattati alla luce

Nello studio dei rapporti fra fotosintesi netta (P_N) e fluorescenza, viene generalmente considerata la fluorescenza di campioni nello stato adattato alla luce (misurata tramite la fluorescenza modulata) perché esprimono la capacità "effettiva" di trattenere e trasportare gli elettroni.

In particolare le relazioni fra Φ_{PSII} e Φ_{CO_2} sono state trovate considerando piante mesofile ben irrigate (Genty et al., 1989; Edwards e Baker, 1993; Fryer et al., 1998; Maxwell e Johnson, 2000) (vedi la già citata figura 3.3), ma difficilmente questi risultati sono estendibili in condizioni reali di pieno campo. È realistico ritenere che, quando la CO_2 atmosferica non costituisce un fattore limitante, il principale target del trasporto di elettroni sia la riduzione della CO_2 stessa. Quando invece gli stomi sono chiusi (limitazione stomatica come conseguenza di uno stress idrico), la CO_2 nel cloroplasto viene consumata e gli elettroni sono diretti verso destini diversi dal ciclo di Calvin-Benson.

L'evoluzione della strumentazione commercialmente disponibile ha reso possibile la misura simultanea della fotosintesi e della fluorescenza della clorofilla sul medesimo campione (vedi par. 7.5), consentendo così analisi integrate per lo studio dei fattori limitanti e della conduttanza del mesofillo (g_m) (Sharkey et al., 2007). In condizioni ottimali il trasporto di elettroni (determinato tramite l'analisi della fluorescenza della clorofilla) aumenta con l'aumento di concentrazione di CO_2 , tuttavia la capacità di assimilare il carbonio può essere limitata dalla disponibilità di Rubisco. Quando il trasporto di elettroni non cambia con l'aumento di CO_2 , ciò significa che l'assimilazione del carbonio è limitata dalla capacità di rigenerazione della Rubisco. Infine, se il trasporto di elettroni decresce con l'aumento della CO_2 , questo comportamento indica che siamo in presenza di una limitazione del TPU (*Triose Phosphate Use*). Partendo dalla combinazione di parametri di fluorescenza e di scambi gassosi, Flexas et al. (2007) hanno proposto un metodo per il calcolo di g_m (conduttanza di CO_2 nel mesofillo).

Altri autori (Dai et al., 1992) hanno studiato le relazioni fra parametri di fluorescenza (quali Φ_{PSII} e qN) e assimilazione di CO_2 (P_N) per la determinazione di C_i (concentrazione di carbonio negli spazi intercellulari), in condizioni di basso (senza stress) e alto (in condizioni di stress) VPD (*Vapour Pressure Deficit*). Il mantenimento di alti livelli di Φ_{PSII} a fronte della riduzione di P_N e C_i (aumento del rapporto Φ_{PSII}/P_N) indica che una parte degli elettroni è diretta verso cicli di fotorespirazione. In condizioni di alta CO_2 , l'aumento di C_i corrisponde ad un corrispettivo aumento di P_N e ad una riduzione di qN (riduzione del rapporto qN/P_N).

Infine, il parametro ETR/P_N misura l'efficienza con cui il flusso di elettroni viene destinato ad alimentare i processi fotosintetici.

5.2. Campioni adattati al buio

Le relazioni fra parametri di fluorescenza di campioni adattati al buio (*dark adapted*) e parametri di scambi gassosi sono più difficili da determinare. Infatti l'assimilazione di CO_2 è regolata dallo stato e dall'attività della Rubisco. Queste modificazioni non possono essere determinate nello stato *dark adapted*, quando cioè la Rubisco stessa è inattiva. È noto che la *dark fluorescence* dà informazioni sull'efficienza fotosintetica potenziale (non effettiva), tuttavia ci sono evidenze che il declino di parametri misurati in campioni adattati al buio, come F_v/F_M e PI_{ABS} , sia connesso al declino di P_N (Van Heerden et al., 2003; Albert et al., 2008). Si ritiene pertanto che in condizioni ecologicamente favorevoli ci sia una relazione fra efficienza potenziale ed efficienza effettiva.

L'introduzione dei parametri RE (*Reduction of End acceptors*), che dipendono dalla forma della traiettoria della fase I-P del *transient*, ha fornito uno strumento che da informazioni sulla capacità della catena di trasporto nel fornire elettroni per la riduzione della CO_2 . Desotgiu et al (2012) hanno trovato una correlazione positiva fra i parametri RE della fase I-P e P_N in esperimenti su *Fagus sylvatica* e cloni di pioppo. I parametri RE, inoltre, hanno valori più alti nelle foglie di luce rispetto alle foglie di ombra e sono sensibili alle condizioni di radiazione solare. Le nostre ipotesi per spiegare questo comportamento sono: (i) in condizioni favorevoli gli elettroni che riducono gli accettori finali oltre il PSI hanno più possibilità di entrare nel ciclo di Calvin-Benson rispetto agli elettroni utilizzati per la riduzione degli accettori dell'intersistema fra PSII e PSI; (ii) la regione J-I-P esprime l'abbondanza relativa del PSI rispetto al PSII (Schanker et al., 2003, 2005), e un alto rapporto PSI/PSII permette la rapida riduzione della ferredossina e, di conseguenza una maggiore possibilità di alimentare in ciclo di Calvin-Benson.

Altri metodi fluorimetrici

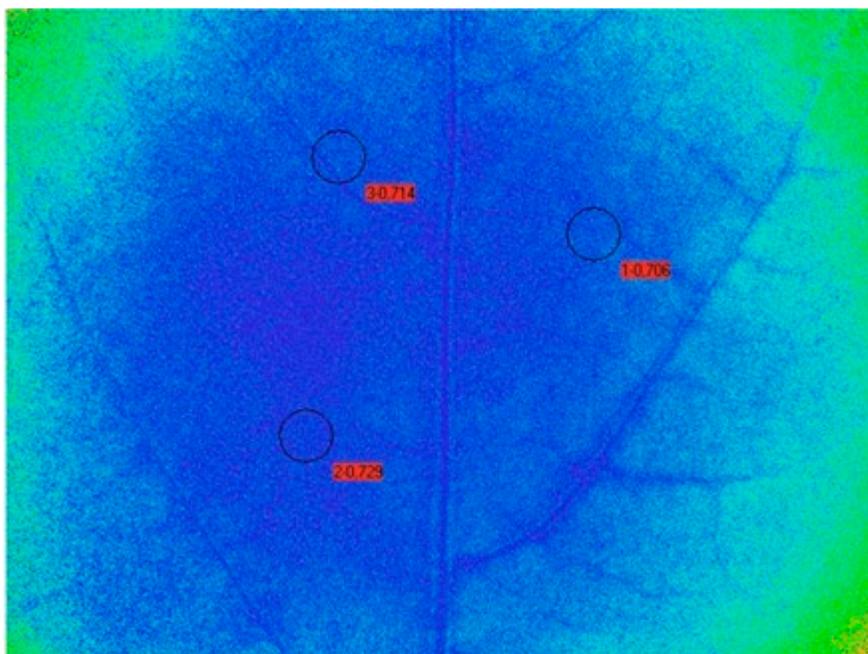
6.1. Chlorophyll Fluorescence Imaging (CFI)

Una recente innovazione è costituita dalla tecnica detta *Chlorophyll Fluorescence Imaging* (CFI). Essa si avvale dei progressi della tecnologia nei campi della emissione della luce, della acquisizione delle immagini e della rapidità nella gestione dei dati (Nedbal e Whitmarsh, 2004). A questo fine sono stati sviluppati dei sistemi modulari che permettono la misura della fluorescenza in condizioni di luce naturale, illuminando il campione con impulsi luminosi di bassa intensità, e catturando l'emissione di fluorescenza alla stessa frequenza dell'illuminazione (Charle e Van Der Straeten, 2001). Sistemi di CFI sono stati sviluppati per essere usati sia ad alta risoluzione, cioè a livello microscopico, sia a bassa risoluzione a livello di foglia o pianta intera. Applicazioni di *remote sensing* permettono di determinare la fluorescenza della clorofilla anche a livello di paesaggio (Zarco-Tejada et al., 2009).

La tecnica CFI consente di ottenere una panoramica della emissione di fluorescenza da parte di singole cellule, foglie o piante intere, fornendo informazioni sul loro stato di stress in maniera visiva, veloce, precisa e intuitiva (Lichtenthaler e Miehé, 1997; Omasa, 1990; Calatayud et al., 2006). Questa tecnica permette lo studio spaziale e temporale della eterogeneità della fluorescenza nell'intera area fogliare. Tale eterogeneità è dovuta a numerosi fattori endogeni, e non può essere evidenziata con i sistemi tradizionali che permettono solo misure puntiformi (Ellenson e Amudson, 1982; Omasa e Takayama, 2003). L'eterogeneità della fluorescenza è rappresentata, pixel per pixel, per mezzo di immagini in falso colore, dove i vari colori codificano differenti valori numerici. L'interpretazione delle misure CFI è basata sugli stessi parametri fondamentali della fluorescenza modulata convenzionale: F_0 , F_0' , F_M , F_M' and F_S .

L'eccitazione della clorofilla *a* viene indotta illuminando il campione con laser a luce blu saturante o con laser UV-A. L'illuminazione UV-A genera due tipi di fluorescenza: la fluorescenza della clorofilla nel rosso e la fluorescenza verde-azzurra. Entrambe gli approcci sono utilizzati per produrre immagini per mezzo di *Charge Coupled Device Cameras* (CCD, Chaerle e Van Der Straeten, 2001). L'uso di laser UV (*Laser-Induced Fluorescence Imaging System*) permette la cattura simultanea della emissione della fluorescenza da 4 bande spettrali tramite eccitazione con una singola lunghezza d'onda: blu (F440), verde (F520), rosso (F690) e rosso lontano (F740). La fluorescenza nel blu e nel verde è originata dagli acidi cinnamici e altri composti fenolici, quella nel rosso e nel rosso lontano è originata dalla clorofilla *a* (Buschmann e Lichtenthaler, 1998). I cambiamenti nell'emissione della fluorescenza della clorofilla, da sola o in relazione ai differenti rapporti (F440/ F690, F440/F740), possono essere utilizzati come indicatori di stress, mentre il rapporto F690/F740 è un indicatore del contenuto di clorofilla. Altre tecniche CFI usate per lo studio dello stress nelle piante sono la termografia (Chaerle e Van Der Straeten, 2000), la riflettanza (Nilsson, 1995) e l'autoluminescenza (Havaux et al., 2006).

Fig. 6.1 – Esempio di *Chlorophyll Fluorescence Imaging* (CFI) su foglia di peperone: i valori riportati indicano il non-photochemical quenching (*qN*) misurato negli spot circolari (foto concessa da A. Calatayud, IVIA, Valencia).



6.2. Assorbimento del P700

L'osservazione dei cambiamenti dell'assorbanza e/o della trasmissione intorno a 820 nm è un metodo usato per determinare lo stato redox del PSI in condizioni di illuminazione continua (Harbinson e Woodward, 1987; Schreiber et al., 1988; Harbinson e Hedley, 1989; Klughammer e Schreiber, 1994; Schansker et al., 2003, 2006, 2008). L'ossidazione del centro di reazione del PSI (P700) causa l'aumento dell'assorbanza nel range di 800 – 850 nm, e la riduzione dell'assorbanza stessa a 700 nm. Il P700 è ossidato in seguito ad illuminazione, quando gli elettroni sono trasferiti alla ferredossina, eventualmente causando la riduzione del NADP e la fissazione di CO₂. Contrariamente al centro di reazione del PSII (P680) la cui forma ossidata ha vita estremamente breve, il P700 ossidato è relativamente stabile. P700 può essere prontamente ossidato da luce nel rosso lontano (*far red*, FR), che è assorbita preferenzialmente dai pigmenti del PSI, ed è ridotto dall'intersistema della catena di trasporto degli elettroni dal PSII. Gli elettroni sono originati dal sistema di fotolisi dell'acqua. I cambiamenti dell'assorbimento del P700 fornisce informazioni sul PSI assai simili a quelli che la fluorescenza della clorofilla fornisce per il PSII (stato degli accettori e donatori di elettroni, rese quantiche ecc.). La luce a 820 nm non è attinica, quindi è possibile utilizzare alte intensità luminose senza disturbare il sistema. Misurare simultaneamente la fluorescenza e la trasmissione della clorofilla rende possibile studiare l'intero processo di trasferimento degli elettroni durante l'induzione ai due estremi della catena di trasporto.

6.3. Fluorescenza ritardata (*Delayed Fluorescence*, DF)

La fluorescenza ritardata (DF, *delayed fluorescence*) è costituita da un'emissione luminosa di lungo termine da parte di cellule fotosintetiche inizialmente stimolate da illuminazione (Strehler e Arnold, 1951; Berden-Zrimec et al., 2010). Essa ha lo stesso spettro di emissione della fluorescenza della clorofilla a, ma avviene con un tempo ritardato, da pochi millisecondi ad alcuni minuti (Arnold e Davidson, 1954). DF è originata dalla ripresa di uno stato eccitato di molecole di clorofilla, determinato dall'uso di energia accumulata dopo la separazione di carica (Joliot et al., 1971). Essa ha una decadimento iperbolico della cinetica durante il primo secondo, seguito talvolta da un picco più o meno pronunciato (Bertsch, 1962; Zrimec et al., 2005; Berden-Zrimec et al., 2010). La maggior fonte di DF sono le retroreazioni nel PSII (Rutherford and Inoue, 1984), mentre il PSI contribuisce molto meno alla emissione di DF (Jursinic, 1986). Nel PSII, durante l'illuminazione vengono generate coppie di cariche. Le cariche positive sono disposte nell'OEC, e quelle negative nei chinoni (Q_A e Q_B). Le componenti lente di DF hanno origine

80 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

nelle retroazioni fra gli stati S2 e S3 dell' OEC e i chinoni Q_A e Q_B . Il vantaggio maggiore di DF è che essa è emessa solo da cellule vive, fotosinteticamente attive, per cui il disturbo provocato da detriti di cellule morte non interferisce nella misura.

Strumenti disponibili sul mercato

I costruttori propongono una vasta gamma di strumenti, disponibili in commercio, per la misura della fluorescenza della clorofilla. Questo settore è in rapida e costante evoluzione, e frequentemente vengono proposti modelli aggiornati, atti a soddisfare le differenti esigenze e rendere più agevole e rapido il lavoro. Inoltre i rapidi progressi nella teoria e negli studi di base vengono continuamente recepiti con nuovi strumenti.

In questo capitolo vengono presentati i principali strumenti, con le loro caratteristiche e applicazioni, disponibili alla data in cui queste note sono state scritte. Si raccomanda il lettore interessato a questa strumentazione di tenersi aggiornato consultando i siti dei costruttori. Gli strumenti maggiormente usati e reperibili in Italia sono quelli delle ditte Hansatech, Walz e ADC. Su questi ci soffermeremo maggiormente, senza tuttavia tralasciare di fornire indicazioni relative anche ad altre ditte attive sul mercato scientifico globale.

7.1. Hansatech Instruments Limited

Pentney, Norfolk, UK

<http://www.hansatech-instruments.com/>

Strumenti per la misura della fluorescenza diretta

Si tratta dei fluorimetri della serie PEA (*Plant Efficiency Analyzer*). Il capostipite è il PEA, successivamente sono stati proposti l'HandyPEA (Fig. 7.1) e il PocketPEA. Questi strumenti sono dotati di lampade ad alta intensità (oltre $2500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Il rilevatore di fluorescenza, tramite un microprocessore, consente una misurazione precisa e rapida (risoluzione a partire da 10 microsecondi). In questo modo è possibile ottenere i valori della curva, da F_0 a F_M , necessari per calcolare i parametri del JIP test. L'evol-

luzione degli strumenti di questa serie è consistita: (i) nella riduzione delle dimensioni e del peso dello strumento, e quindi nel miglioramento della sua maneggevolezza e portabilità; (ii) nell'aumento della capacità di memorizzazione dei dati (da 80 curve nel PEA a 1000 nell'HandyPEA), grazie anche alla riduzione del numero delle misure intermedie (da circa 1000 a 100 punti per ciascuna curva). Inoltre il Pocket PEA ha lo scarico dei dati tramite Bluetooth anziché via cavo.

Strumenti per la misura della fluorescenza modulata

Sono i fluorimetri modulati della serie FMS (FMS1 e FMS2). Consistono entrambe in una unità di controllo che ospita tutte le parti elettroniche, ottiche e le sorgenti di luce, e in un cavo a fibre ottiche che porta la luce al campione. I due modelli possono essere usati in modalità *stand alone*, comandati da un computer esterno su cui sono installati gli appositi programmi. Questo tipo di uso è consigliato soprattutto quando si tratta di effettuare misure in laboratorio, serra o ambiente controllato. FMS2 (Fig. 7.2) ha un minor peso ed una migliore portabilità, per cui può essere usato anche in indagini di campo.

Strumenti multifunzione

Negli ultimi tempi si è sviluppata una nuova generazione di strumenti in grado di effettuare contemporaneamente diversi tipi di analisi su un medesimo campione. m-PEA (*Multi-Function Plant Efficiency Analyzer*, Fig. 7.3) è un analizzatore multifunzione che permette di determinare contemporaneamente, la cinetica veloce (*prompt fluorescence*), l'assorbimento del P700 a 820 nm e la fluorescenza ritardata (*delayed fluorescence*). Si tratta di un sistema da laboratorio che consiste in una unità di controllo ed un sensore che ospita la parte ottica, sia emettitori che rilevatori. Il sistema è controllato via computer per mezzo di un software specifico.

7.2. WALZ (Heinz Walz GmbH)

Effeltrich (Germany)
<http://www.walz.com/>

Fluorimetri modulati della serie PAM

Storicamente gli strumenti PAM della Walz sono i primi che hanno applicato e sviluppato il metodo *Pulse Amplitude Modulation*, che è alla base della fluorescenza modulata. Il capostipite della serie è stato il PAM-2000, cui è seguito il PAM-2100 e, attualmente, il PAM-2500 che sostituisce i precedenti portando una serie di miglioramenti sia nella parte elettronica che

Figura 7.1 – Fluorimetro HandyPEA (Hansatech), per la misura della fluorescenza diretta (cinetica veloce) della clorofilla a in vivo (<http://www.Hansatech-instruments.com/continuousSystems.htm>).



Figura 7.2 – Fluorimetro FMS2 (Hansatech), per la misura della fluorescenza modulata della clorofilla a in vivo (<http://www.Hansatech-instruments.com/fms2.htm>).



ottica. Mentre i primi modelli erano molto pesanti e destinati ad un uso prevalentemente da laboratorio, con il PAM 2500 ne è stata aumentata la maneggevolezza e portabilità. Inoltre PAM-2500 è in grado di misurare anche la cinetica veloce (*transient* fluorescente). Un ulteriore sviluppo della portabilità si ha con MINI-PAM, che a un corpo molto compatto e leggero unisce la possibilità di misurare velocemente i principali parametri della fluorescenza modulata.

Strumenti CFI (Chlorophyll Imaging Fluorescence) - Imaging PAM M-series

Lo studio della CFI (Chlorophyll Fluorescence Imaging) può essere attuato a differenti scale per mezzo degli strumenti della *Imaging PAM M-series*. La serie M comprende le versioni MAXI, MINI (Fig. 7.4), MICRO e MICROSCOPY, basate sulla medesima Multi Control Unit IMAG-CM, e 4 differenti teste di misura. La serie M estende le applicazioni della precedente versione standard IMAGING-PAM, in uso dal 2001. Con gli attuali sistemi della serie M possono essere ottenute immagini di fluorescenza a vari livelli di scala, da singole cellule (Microscopy) fino a piante intere (Maxi). Inoltre il sistema Mini consente applicazioni in condizioni di pieno campo.

Strumenti multifunzione

DUAL-PAM-100 è in grado di misurare contemporaneamente la fluorescenza della clorofilla e l'assorbimento del P700 a 820 nm. Inoltre è in grado di determinare la *prompt fluorescence* (cinetica veloce).

Strumenti PAM per usi speciali

La Walz ha predisposto una varietà di strumenti per usi specifici:

- MONITORING PAM per la misura nel lungo periodo delle caratteristiche fotosintetiche in condizioni di campo, anche in condizioni ambientali difficili;
- WATER PAM per l'analisi di campioni d'acqua con contenuto molto basso di organismi fotosintetici;
- DIVING PAM per l'analisi in situ di ambienti subacquei;
- PHYTO PAM per la determinazione del fitoplancton nelle acque superficiali;
- TOXY PAM per la determinazione di sostanze che inibiscono la fotosintesi;
- MICROFIBER PAM per la misura puntiforme delle caratteristiche fotosintetiche di una vasta gamma di campioni;

Figura 7.3 – Il sistema *m-Pea* (Hansatech) consente la misura simultanea della fluorescenza diretta della clorofilla *a* nel PSII, l'assorbimento nel P700 (PSI) e la fluorescenza ritardata (<http://www.hansatech-instruments.com>).



Figura 7.4 – Sistema di Chlorophyll Fluorescence Imaging (CFI) Walz – Mini (Foto concessa da A. Calatayud, IVIA, Valencia).



- XE PAM consente di misurare la fluorescenza della clorofilla a differenti lunghezze d'onda della luce;
- JUNIOR PAM per finalità didattiche ed educative.

7.3. ADC Bioscientific

Great Amwell, Herts (UK)
<http://www.adc.co.uk/>

Fluorimetri della serie OS

Il fluorimetro OS5p (*Advanced Modulated Fluorometer*) rappresenta la più recente evoluzione della serie rispetto al capostipite ADC: OSI. OS5p pesa 1,4 Kg ed è adatto per un impiego in campo. Misura la fluorescenza in campioni adattati al buio e alla luce, fornendo i parametri della fluorescenza modulata e il *transient* OJIP. Il fluorimetro OS-30p (*Plant Stress Device OJIP Option*) è uno strumento molto maneggevole, adatto per misure rapide e ripetute. Misura F_v/F_m ed i parametri correlati, oltre ai punti OJIP del *transient*, Area a Tm. Il fluorimetro OS1p (*Ultra-Compact Chlorophyll Fluorometer*) è uno strumento portatile con grande capacità di acquisizione dei dati. Misura, in condizioni di campo, F_v/F_m e i principali parametri della fluorescenza modulata.

7.4. Altri produttori

La Photon System Instruments (PSI, Drasov, CZ, <http://www.psi.cz>) offre una vasta gamma di soluzioni per la misura della fluorescenza sia in condizioni di laboratorio che in pieno campo (in particolare, in quest'ultimo caso, con gli strumenti della serie Fluorpen), comprese applicazioni specifiche per la misura del fitoplancton (Aquapen) e della fluorescenza delle proteine verdi (GFP-Pen). Inoltre PSI offre strumenti per la CFI (*Chlorophyll Fluorescence Imaging*), comprese le Fluorcam, che permettono l'analisi simultanea di un gran numero di campioni.

Nell'ambito della CFI, la Qubit Systems Inc. (Kingston, ON, Canada, <http://qubitsystems.com>) e Technologica (<http://www.technologica.co.uk/>) offrono varie soluzioni di Fluorcam aperte e chiuse, a varia scala di dettaglio (da Micro FluorCam a strumenti adatti allo screening su vasta scala).

7.5. Misura simultanea di fotosintesi e fluorescenza

Molti strumenti per la misura della fotosintesi netta possono essere equipaggiati per la misura contemporanea di parametri di fluorescenza. Fra i sistemi basati sulla misura di assimilazione di CO_2 , i più noti riguardano i seguenti produttori:

- Li-Cor, con il gas-analyzer Li-Cor 6400 (<http://www.licor.com/env/products/photosynthesis/>)
- PP-System (Amesbury, MA, USA), con il gas analyzer CIRAS 2 (Fig. 7.4) (http://www.ppsystems.com/ciras2_portable_photosynthesis_system.htm)
- Walz, con il gas analyzer GFS-3000 (http://www.walz.com/products/gas_exchange/gfs-3000/introduction.html)

Per quanto riguarda invece la misura congiunta di fluorescenza della clorofilla e sviluppo di ossigeno, i fluorimetri FMS1 e FMS2 della ditta Hansatech (Fig. 7.5) possono essere accoppiati con l'elettrodo DW2/2 (<http://www.hansatech-instruments.com/dw2.htm>)

Figura 7.5 – Sistema IRGA (Infra Red Gas Analyzer) CIRAS-2 (PP Systems), attrezzato per la misura simultanea sullo stesso campione vegetale degli scambi gassosi e della fluorescenza della clorofilla. A sinistra: pinza e cuvetta per alloggiare il campione. A destra: corpo dell'analizzatore IRGA (http://www.ppsys-tems.com/ciras_cfm.htm).



Tabella 1 - Caratteristiche tecniche dei fluorimetri a fluorescenza diretta

Caratteristiche tecniche	Modello		
	Fluorimetro Handy PEA (Hansatech)	Fluorimetro Pocket Pea (Hansatech)	Fluorimetro OS-30p (ADC)
Illuminazione	3 LED ad alta intensità con emissione massima a 650 nm. Filtro nell'infrarosso vicino (near infrared - NIR)	Singolo LED ad alta intensità con emissione massima a 627 nm. Filtro NIR	Sorgente luminosa fissa (massima emissione a 660 nm)
Intensità luminosa	Massima intensità luminosa alla foglia >3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Massima intensità luminosa alla foglia: 3500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Rilevatori e Filtri	Fotodiode PIN con filtro RG9 (lunghezza d'onda >700 nm)	Fotodiode PIN con filtro RG9 (lunghezza d'onda >700 nm)	Fotodiode PIN - filtro a lunghezza d'onda 700 - 750 nm
Sensore di fluorescenza („testa“ dello strumento)	Sensore unito all'unità centrale con cavo, di lunghezza fino a 10 m. Possibilità di commutazione	Inserito nella struttura	Inserito nella struttura
Temperatura di lavoro	0 - 40 °C	0 - 40 °C	5 - 45 °C
Controllo di amplificazione del segnale, „Gain“	Manuale o automatico	*	*
Durata della misura	0,001 - 300 s	1, 3 - 10 sec	2 - 255 s
Rapidità di acquisizione dati	Alta frequenza di acquisizione (100 kHz) per ottenere curve di induzione cinetica di circa 120 punti in un secondo di misura. Frequenza di 10 μs nei primi 300 μs .	Alta frequenza di acquisizione (100 kHz) per ottenere curve di induzione cinetica di circa 120 punti in un secondo di misura. Frequenza di 10 μs nei primi 300 μs .	Da 10 a 30000 punti per secondo. Frequenza di 20 μs per le curve OJIP.
Display	LCD: 8 linee x 20 caratteri	LCD: 2 linee x 12 caratteri	LCD 128 x 64 dots

Caratteristiche tecniche	Modello		
	Fluorimetro Handy PEA (Hansatech)	Fluorimetro Pocket Pea (Hansatech)	Fluorimetro OS-30p (ADC)
Capacità di memoria	RAM 512K - 1000 <i>transient</i> di fluorescenza	RAM 512K - 200 <i>transient</i> di fluorescenza	8000 data set e 32 tracce sperimentali
Alimentazione	3 batterie interne (Ni-MH) sufficienti per 8 ore di lavoro continuo	A polimeri di litio 3.7V, 570 m.Ahr - 1 giorno di lavoro continuo (ricarica: 4 h)	Accumulatore Ni-MH, sufficiente per 8 ore di lavoro continuo
Dimensioni	17 x 8,5 x 4 cm	17,5 x 7,5 x 3,5 cm	18 cm x 7 cm x 6 cm
Peso	0,565 kg	0,250 kg	0,5 kg
Sistema operativo	Software Windows® 32Bit per acquisire e scaricare i dati	Software Windows® - Scarico dati tramite Bluetooth	*
Utilità del software	Permette di creare protocolli definiti da parte dell'utente	*	mancante
Parametri misurati	$F_o, F_{M'}, T_{im'}, F_v, F_{M'}, OJIP, PI,$	$F_o, F_{M'}, T_{im'}, F_v, F_{M'}, OJIP, PI,$	$F_o, F_{M'}, T_{im'}, F_v, F_{M'}, OJIP$
Altre utilità	Possibilità di essere adattato anche per la fase liquida (sospensione di cloroplasti, alghe...)	*	*
Clip fogliari, per adattamento al buio	Clips con chiusura mobile e superficie di illuminazione di 4 mm in diametro	Clips con chiusura mobile e superficie di illuminazione di 4 mm in diametro	Clips con chiusura mobile

* = informazione mancante

Tabella 2 - Caratteristiche tecniche dei fluorimetri a fluorescenza modulata.

Dati tecnici	Modello					
	Hansatech Instruments		Walz			ADC
	FMS1	FMS2	PAM-2500	Mini-PAM	OSI 5 FL	OSIFL
Sorgente luminosa (fascio modulato)	Fascio modulato a 594 nm (giallo), e controllo di frequenza a 4 step (LED opzionale 470 nm blu).	Fascio modulato a 594 nm (giallo), e controllo di frequenza a 4 step (LED opzionale 470 nm blu).	Fascio modulato a 630 nm, e controllo di frequenza a 20 step.	Fascio modulato a 650 nm, e controllo di frequenza	Fascio modulato a 660 nm, e controllo di intensità da 0 a 1 mmol m ⁻² s ⁻¹	Fascio modulato a 660 nm, e controllo di intensità da 0 a 1 mmol m ⁻² s ⁻¹
Impulso di saturazione	Lampada alogena con luce attinica da 0 a 20000 μmol m ⁻² s ⁻¹ , con controllo di intensità in 100 step.	Lampada alogena con luce attinica da 0 a 20000 μmol m ⁻² s ⁻¹ , con controllo di intensità in 100 step.	Lampada alogena con luce attinica da 0 a 25000 μmol m ⁻² s ⁻¹ , con controllo di intensità in 20 step.	Lampada alogena con luce attinica da 0 a 18000 μmol m ⁻² s ⁻¹	Lampada alogena con luce attinica da 0 a 15000 μmol m ⁻² s ⁻¹	Lampada alogena con luce attinica da 0 a 15000 μmol m ⁻² s ⁻¹
Flash attinico	Lampada alogena con luce attinica da 0 a 3000 μmol m ⁻² s ⁻¹ , con controllo di intensità in 50 step.	Lampada alogena con luce attinica da 0 a 3000 μmol m ⁻² s ⁻¹ , con controllo di intensità in 50 step.	LED 630 nm da 0 a 4000 μmol m ⁻² s ⁻¹ , con controllo di intensità in 20 step	Lampada alogena con luce attinica da 0 a 6000 μmol m ⁻² s ⁻¹ Opzionale: Flash esterno intensità fino a 3000 μmol m ⁻² s ⁻¹	685 nm LED - 0-500 μmol m ⁻² s ⁻¹	Mancante
Lampada far red	LED (735 nm)	LED (735 nm)	LED (750 nm)	Brak	LED (735 nm)	Mancante
Rilevatore	Fotodiodo PIN con filtro >700 nm	Fotodiodo PIN con filtro >700 nm	Fotodiodo PIN con filtro >715 nm	Fotodiodo PIN con filtro >710 nm	Fotodiodo PIN con filtro >700-750 nm	Fotodiodo PIN con filtro >700-750 nm

Fattori ambientali e parametri di fluorescenza

8.1. Radiazione luminosa

La luce è il fattore ambientale più importante che determina cambiamenti morfologici e fisiologici nelle foglie. Questi cambiamenti possono consistere in processi di acclimatazione che agiscono nel lungo periodo influenzandone la struttura, e in aggiustamenti fisiologici di breve periodo che permettono alla foglia di fronteggiare la variabilità dell'ambiente luminoso.

Le differenti caratteristiche delle foglie di luce e di ombra sono state descritte da numerosi autori (Boardman, 1977; Lichtenthaler et al., 1981, 2007; Anderson e Osmond, 1987; Anderson et al., 1995; Terashima et al., 2006; Tatenò e Taneda, 2007). Le foglie di luce hanno una più elevata LMA (*Leaf Mass per Area*, peso secco per unità di superficie) e un maggior spessore rispetto alle foglie d'ombra (vedi Bussotti et al., 2008). L'acclimatazione dei cloroplasti nelle foglie di luce si manifesta con tilacoidi più corti e una maggior quantità di fotosistema 1 (PSI) e Rubisco rispetto alle foglie d'ombra (Chow and Anderson, 1987; Maxwell et al., 1999). In tal modo è possibile una maggiore velocità nella riduzione del carbonio. Le foglie di luce riescono a gestire il flusso di energia riducendo le dimensioni dell'antenna e incrementando i processi di dissipazione controllata (Ballottari et al., 2007). Inoltre la luce stimola la produzione fogliare di antiossidanti e pigmenti schermo. Per quanto riguarda la resa quantica massima di fotochimica primaria (F_v/F_m) in letteratura si ritrovano risultati contrastanti. Lichtenthaler et al. (2004) e Sarijeva et al. (2007), tramite studi condotti su foglie di *Fagus sylvatica* nell'Europa centrale, asseriscono che i valori di questo parametro sono maggiori nelle foglie di luce. Altri studi, ugualmente condotti su *Fagus sylvatica* ma in siti dell'Europa meridionale, hanno ottenuto un risultato opposto, con F_v/F_m sempre significativamente inferiore

nelle foglie di luce (Cascio et al., 2010; Desotgiu et al., in stampa). Questa apparente contraddizione può essere spiegata con il fatto che nella regione mediterranea l'intensità della radiazione luminosa è più elevata, al punto che le foglie adottano strategie strutturali che rendono permanente la capacità di dissipazione dell'energia. Un'altra caratteristica strutturale delle foglie di luce, evidenziata da Pollastrini et al. (2011) e Desotgiu et al. (in stampa) per mezzo dell'analisi del *transient* fluorescente, consiste nella loro maggior capacità di ridurre gli accettori finali oltre PSI. Questa caratteristica deriva dal loro maggior contenuto di PSI e Rubisco, ed è espressa dalla fase I-P del *transient* fluorescente e relativi parametri.

Gli aggiustamenti fisiologici nel breve periodo consistono in strategie atte a ridurre l'eccesso di eccitazione causato dalla luce (fotoprotezione, vedi Bruce e Vasil'ev, 2004; Gilmore, 2004; Takahashi e Badger, 2010). La luce stimola la produzione di specie reattive di ossigeno (ROS) sia al sito del PSI e del PSII. In condizioni di elevata irradianza il flusso di elettroni nella catena di trasporto (ETC, *Electron Transport Chain*) può provocare, oltre il PSI, un eccesso di capacità di riduzione. Questa condizione è determinata da uno squilibrio fra l'intensità del flusso di elettroni provenienti dal PSII e da OES e la capacità di assorbire gli elettroni stessi da parte degli accettori finali (ferredossina, NAD⁺) e della Rubisco oltre il PSI. Gli elettroni "in eccesso" possono attivare l'ossigeno dallo stato fondamentale allo stato eccitato (Powles, 1984; Krieger-Liszkay, 2005; Hald et al., 2008) e conseguentemente indurre la produzione dei ROS, dannosi per la vita delle cellule.

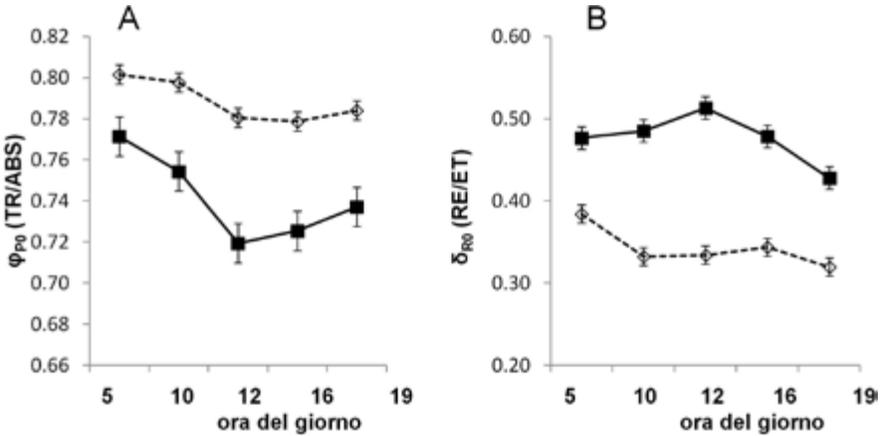
Il fenomeno più noto ascrivibile all'azione diretta della luce consiste nella fotoinibizione, cioè nella disattivazione e turn-over della proteina D1 nel centro di reazione del PSII (vedi par. 2.5), e nei conseguenti meccanicismi di fotoriparazione. La fotoinibizione comporta la riduzione del parametro F_v/F_m e, nella fluorimetria modulata, l'aumento del NPQ. Ciò indica nella fotoinibizione un meccanismo di *down-regulation* che consente di smaltire in maniera controllata l'eccesso di energia radiante che raggiunge la foglia.

L'analisi del *transient* fluorescente ha consentito di verificare che, assieme alla riduzione di F_v/F_m e l'aumento della dissipazione controllata (de-eccitazione non fotochimica), la luce determina l'aumento dell'efficienza del trasporto degli elettroni nell'intersistema fra il PSI e il PSII (espressa dal punto J) e dell'efficienza nella riduzione degli accettori finali (espressa dalla fase I-P) (de-eccitazione fotochimica). L'insieme di queste risposte, illustrate nella Fig. 8.1, mostra un quadro in cui la foglia risponde all'eccesso di radiazioni luminose aumentando l'efficienza di tutte le vie di de-eccitazione, fra cui anche la velocità di riduzione del carbonio come sink di elettroni (aumentando in tal modo l'efficienza della fotosintesi netta).

La luce, tuttavia, non è solo un driver per la fotosintesi, ma produce una situazione di rischio per l'apparato fotosintetico. Oltre alla fotoinibizione, di cui si è già parlato, la luce produce danni all'*oxygen evolving system* (OES) (Takahashi e Murata, 2008; Tyystjärvi, 2008; Takahashi e Badger,

2011). Desotgiu et al. (in stampa) hanno verificato il danno all'OES dovuto alla luce tramite la comparsa della banda-K a circa 300 μs . Inoltre, all'inizio del *transient*, è visibile la banda-L a 100 μs , che indica la perdita di connettività nel sistema tripartito LHC - antenna - RC.

Figura 8.1 – (A) decorso giornaliero di TR/ABS (F_V/F_M), su foglie di luce (simboli pieni) e di ombra (simboli vuoti) di faggio (*Fagus sylvatica* L.). Si osserva la depressione a mezzogiorno, soprattutto nelle foglie di luce. (B) decorso giornaliero del parametro RE/ET , collegato alla fase I-P del *transient* di fluorescenza. In questo caso, l'ampiezza della fase I-P è massima a mezzogiorno nelle foglie di luce.



8.2. Radiazione ultravioletta

La radiazione ultravioletta (UV) è caratterizzata da una lunghezza d'onda inferiore rispetto al visibile (oltre il violetto, 400 nm). L'UV può essere suddiviso in UV vicino (380 – 200 nm) e UV estremo (200 – 10 nm). Quando si considera l'effetto dei raggi UV sulla biosfera (salute umana, vegetazione, ecosistema), la gamma delle lunghezze d'onda UV è in genere suddivisa in UV-A (400 – 315 nm), UV-B (315 – 280 nm) e UV-C (280 – 100 nm). La maggior parte della radiazione UV che arriva alla superficie terrestre (circa il 99%) è costituita da UV-A, in quanto sia l'UV-B che l'UV-C vengono quasi interamente filtrati dallo strato d'ozono che si trova nella stratosfera, a circa 13 – 40 Km di altezza. È ritenuto che la deplezione dello strato di ozono, causata dalle attività umane, possa causare l'aumento della radiazione UV-B soprattutto nelle regioni artiche, con conseguenze sulla vegetazione. Ci sono ecosistemi (per esempio, in alta montagna o nelle regioni mediterranee) in cui la vegetazione è adattata ad alti livelli di UV-B. La risposta più comune consiste nell'accumulo nelle cellule epidermiche di pigmenti UV-screening (flavonoidi, caroteni), che assorbono la radiazione in eccesso preservando dalla sovra-eccitazione l'apparato fotosintetico.

Gli studi sugli effetti della radiazione UV-B sulla vegetazione sono svolti somministrando radiazione supplementare per mezzo di apposite lampade, o riducendo la radiazione esistente per mezzo di filtri UV.

Vari studi (Strid et al., 1990; Melis et al., 1992) hanno messo in evidenza l'impatto degli UV-B (Aro et al., 1993; Jansen et al., 1996) con un effetto di fotoinibizione simile a quello descritto per la luce. Altri autori (Nogués e Baker, 1995; Baker et al., 1997) hanno individuato una riduzione dell'attività fotosintetica indipendente dalla possibile alterazione della efficienza del PSII (F_v/F_m), interpretata come diminuzione del contenuto di Rubisco (Vu et al., 1984; Strid et al., 1990; Jordan et al., 1992; Greenberg et al., 1996).

In una rassegna sui lavori riguardanti la risposta della fluorescenza in piante soggette ad alti livelli di UV-B, Tevini (2004) riferisce che il target principale della radiazione ultravioletta riguarda i centri di reazione del PSII, con la riduzione del valore di F_v/F_m , mentre il PSI è meno sensibile. L'applicazione dell'analisi del *transient* fluorescente (FT) (Albert et al., 2005, 2008, 2011; Pollastrini et al., 2011) ha confermato la diminuzione del valore di F_v/F_m e dei centri di reazione attivi. Inoltre, le piante cresciute in assenza di UV-B hanno mostrato una maggiore efficienza nella riduzione degli accettori finali, espressa dai parametri relativi alla fase I-P.

8.3. Temperatura

8.3.1 Alte temperature

Il processo fotosintetico consta di numerose reazioni di tipo enzimatico, cioè mediate attraverso proteine. Come è noto le proteine vengono disattivate (denaturazione) quando la temperatura supera i 35 – 40°C. La traspirazione stomatica costituisce tuttavia un efficiente sistema di raffreddamento delle foglie.

Occasionalmente le piante possono essere sottoposte a shock termici. In tal caso i fattori influenti sono l'intensità e la durata dell'ondata di calore, nonché le condizioni fisiologiche con cui la pianta affronta le alte temperature. È noto, per esempio, che ad alte temperature il PSII è più stabile se la pianta è soggetta a stress idrico (termostabilità del PSII, vedi Havaux, 1992; Lu e Zhang, 1999). Le alte temperature causano una completa e irreversibile inibizione del PSII in foglie di piante ben irrigate, ma in condizioni di stress idrico la riduzione dell'efficienza del PSII è di piccola entità e del tutto reversibile. Poiché calore e stress idrico sono fattori di stress normalmente associati, si può parlare in questo caso di *cross-resistance*.

Fino a che non viene raggiunta la soglia di denaturazione delle proteine, la fotosintesi si giova dell'aumento della temperatura. Larcher (2000) e Bussotti (2004) hanno osservato che le temperature estive rendono più veloce il trasporto di elettroni. Quando la temperatura supera la soglia dei 35 – 40°C la risposta più comunemente osservata consiste nell'aumento

del livello di F_0 (che indica la disorganizzazione dei tilacoidi, Yamane et al., 1997, 2000) e il conseguente declino di F_v/F_M (Baker e Rosenqvist, 2004; Weng e Lai, 2005). Quando l'assimilazione di CO_2 viene inibita dalla temperatura, si può osservare il declino di F_q/F_M' e F_v'/F_M' . Le elevate temperature provocano inoltre la comparsa della banda-K e la diminuzione della connettività (Srivastava et al., 1997).

8.3.2 Basse temperature

Nel corso dell'inverno le piante sempreverdi sono protette dalle basse temperature (almeno nell'ambito di un determinato range) perché, con la graduale diminuzione delle temperature stesse, sono in grado di porre in atto strategie di acclimatazione (*cold hardening*). Danni all'apparato fotosintetico tuttavia possono verificarsi quando l'abbassamento della temperatura avviene molto rapidamente (*cold shock*), oppure quando le piante si trovano in uno stato fisiologico non acclimatato (gelate precoci alla fine del periodo vegetativo, o tardive in primavera). Nel caso delle piante sempreverdi mediterranee, la combinazione di basse temperature e alte radiazioni luminose determina uno spiccato fenomeno di fotoinibizione, noto come *winter photoinhibition* (García-Plazaola et al., 1999; Oliveira e Peñuelas, 2000, 2002; Martinez-Ferri et al., 2004).

Un effetto primario della riduzione delle temperature consiste nella inibizione della riduzione fotosintetica del carbonio (Leegood e Edwards, 1996; Allen e Ort, 2001; Ort, 2002). Ciò comporta la diminuzione dei *sink* per il trasporto degli elettroni e, di conseguenza, dei parametri F_q/F_M' e F_v'/F_M' (Brüggermann e Linger, 1994; Andrews et al., 1995; Gray et al., 1997; Fracheboud e Leipner, 2003), accompagnata dall'aumento della dissipazione non fotochimica dell'energia (NPQ). Le basse temperature inoltre provocano la diminuzione di F_M e F_v/F_M' nonché l'aumento di F_0 (Fryer et al., 1995; Pietrini et al., 2005). È stato osservato (Fryer et al., 1998) che l'acclimatazione del mais a basse temperature può comportare l'aumento di F_q'/F_M' dal momento che il flusso di elettroni può essere indirizzato a recettori diversi dalla CO_2 . In questo caso l'aumento relativo di F_q'/F_M' è associato alla capacità di detossificare i ROS e, di conseguenza, indica tolleranza nei confronti del freddo. L'analisi del *transient* fluorescente (Liang et al., 2007; Pietrini et al., 2005) ha messo in evidenza l'incremento della fase O-J (aumento del valore di F_j) e una riduzione della fase J-I, in cui lo step I può addirittura scomparire nella curva.

8.4. Carezza idrica

La risposta della fluorescenza della clorofilla in piante soggette a carezza idrica, è assai complessa e i vari studiosi che se ne sono occupati riportano risultati controversi se non addirittura contrastanti. Il primo effetto

dello stress idrico consiste nel ridurre drasticamente, tramite la chiusura stomatica, la quantità di carbonio assimilabile, e quindi l'attività fotosintetica (*carbon starvation*). Solo successivamente si possono osservare degli effetti indotti dalla deidratazione delle cellule (*dessiccation*). Una insufficiente disponibilità di CO₂ causata dalla chiusura stomatica, può alterare il funzionamento relativo di PSI e PSII e la richiesta energetica per la riduzione della CO₂. In questa situazione si generano specie di ossigeno attivo (ROS) e la fotoinibizione dell'apparato fotosintetico (Krause, 1988; Long et al., 1994).

Il parametro maggiormente usato, sia negli studi di fluorescenza diretta che modulata, F_v/F_M (massima resa quantica potenziale) in foglie adattate al buio, è di solito poco influenzato dallo stress idrico, e subisce cambiamenti poco o non significativi, anche in condizioni di forte deidratazione (Lu e Zhang, 1999, Shangguan et al. 2000; Cornic e Fresnau, 2002; Bukhov e Carpentier, 2004). Questo comportamento è stato attribuito alla messa in atto di strategie di acclimatazione del PSII che, unitamente all'incremento della efficienza dell'uso dell'acqua (*Water Use Efficiency*, $WUE = P_N/E$, dove E indica la traspirazione) consentono di massimizzare la resa quantica per il migliore sfruttamento del carbonio disponibile, ivi compreso l'isotopo ¹³C. Quest'ultimo è considerato vero e proprio marcatore di stress idrico (Farquhar et al., 1989). Tuttavia la conservazione o l'aumento dei valori di F_v/F_M può essere un mero epifenomeno dovuto alla eventuale riduzione di F_0 in piante soggette ad aridità. Lo stress idrico infatti produce i propri effetti soprattutto a carico del sito del PSI (Oukarroum et al., 2009), riducendone il contributo alla emissione complessiva di fluorescenza. Secondo Pfündel (1998), infatti, circa il 30% del valore di F_0 è da attribuire al contributo del PSI.

Più in generale vari autori (Schreiber e Bilger, 1993; Calatayud et al., 2003) hanno dimostrato che quando il fattore di stress colpisce soprattutto il ciclo di Calvin-Benson, F_v/F_M rimane spesso stabile mentre i maggiori cambiamenti avvengono nei parametri di fluorescenza relativi ai campioni adattati alla luce.

Nonostante la sua notevole stabilità, il valore di F_v/F_M tende a diminuire nelle condizioni in cui, oltre all'aridità, viene applicato un altro stress di differente natura. Questo accade, per esempio, quando questo parametro viene misurato su piante in stato di stress idrico poste sotto forte illuminazione (Lu et al., 2003), o quando le temperature sono basse (Ogaya e Peñuelas, 2003).

In alcuni casi è stata osservata la riduzione di F_v/F_M in relazione allo stato idrico delle foglie, e il particolare con RWC (*Relative Water Content*) e il potenziale idrico (Scarascia-Mugnozza et al., 1996; Faraloni, 2011), anche se, secondo Zvicak et al. (2008) F_v/F_M declina a livelli di deidratazione molto alti.

Le limitazioni stomatiche imposte alla fotosintesi sono accompagnate dalla diminuzione del consumo di ATP e NADPH per l'assimilazione della CO₂ (Lawlor e Cornic, 2002), che ha come conseguenza la diminuzione del trasporto lineare degli elettroni e quindi F_q'/F_M' (Fracheboud e Leipner,

2003). Tuttavia l'attivazione del ciclo "acqua-acqua" e l'aumento della fotorespirazione in condizioni di stress può tuttavia sostenere un trasporto di elettroni simile a quello di piante non stressate, con piccolo o nessun cambiamento in F_q/F_M' (Ort e Baker, 2002).

Ulteriori informazioni sono fornite dall'applicazione dell'analisi del *transient* fluorescente. Sia pure con F_v/F_M invariato, la riduzione della efficienza complessiva del PSII (Performance Index, PI_{ABS}) in piante sottoposte a stress idrico è stata attribuita ad una ridotta capacità di trasporto degli elettroni nell'intersistema fra il PSII ed il PSI (Oukarroum et al., 2007). Oukarroum et al. (2009) hanno inoltre verificato che l'effetto della carenza idrica si manifesta soprattutto nella regione I-P del *transient*, indicando una ridotta efficienza nel ridurre gli accettori finali oltre il PSI. Questa risposta è legata probabilmente alla scarsa disponibilità di carbonio sottostomatico causata dalla chiusura degli stomi. Infine sono vari i lavori (Oukarroum et al., 2007; Christen et al., 2007) in cui è stato osservato l'insorgere della banda-K e della banda-L in piante soggette a stress idrico.

8.5. Salinità

La salinizzazione dei suoli è un problema crescente in quelle condizioni climatiche (mediterranee, sub-tropicali) in cui i sistemi produttivi implicano l'uso di grandi quantità di acqua e fertilizzanti, in presenza di forti livelli di evapotraspirazione. L'effetto iniziale della salinità del suolo è molto simile a quello dell'aridità. Si parla in questo caso di aridità fisiologica: pur in presenza di acqua, la pianta non riesce ad assumerla a causa del forte abbassamento del potenziale idrico del suolo.

La riduzione del potenziale idrico fogliare determina la riduzione della conduttanza stomatica e inibisce il metabolismo fotosintetico, con conseguente riduzione di F_q/F_M' come discusso nella sezione sullo stress idrico. La salinità non influisce sulla fotochimica primaria del PSII, e non vengono descritti cambiamenti in F_v/F_M (Shabala et al., 1998, Kalaji e Pietkiewicz, 1993).

8.6. Biossido di carbonio

Si stima che la concentrazione atmosferica di biossido di carbonio prima della rivoluzione industriale fosse 280 ppm. Attualmente (agosto 2010) essa è risultata essere 385 ppm, con un aumento del 35%. I principali effetti sulla vegetazione derivano probabilmente dai cambiamenti climatici che ne conseguono (aumento delle temperature, cambiamento del regime pluviometrico ecc.), ma si possono ipotizzare effetti diretti dovuti alla CO_2 stessa.

La CO_2 alimenta i processi fotosintetici, e le piante si giovano del suo incremento aumentando la fotosintesi netta (P_N) rispetto alla conduttanza stomatica (gs) e, di conseguenza, aumentando anche l'efficienza di uso dell'acqua (*Water Use Efficiency*, WUE) nelle piante C3 (Ainsworth e Long,

2005; Ainsworth e Rogers, 2007; Körner, 2006; Leaky et al., 2009). La “concimazione carbonica” è una pratica applicata nelle colture in serra per aumentarne la produttività.

Nel complesso la CO₂ svolge un ruolo benefico per la fotosintesi in tutte le sue fasi. L'aumentata disponibilità di CO₂ deve essere tuttavia sostenuta dall'attività del ciclo di Calvin-Benson, altrimenti si possono instaurare meccanismi di *down-regulation*, includendone la riduzione del contenuto di Rubisco e dell'azoto totale (Ainsworth e Rogers, 2007; Moore et al., 1999). Questi meccanismi possono portare ad una riduzione di F_v/F_M (come limitazione del flusso di elettroni), ed alla diminuzione del pool degli accettori finali.

8.7. Deficienze di nutrienti

Gli elementi strutturali della materia organica sono il carbonio, l'ossigeno e l'idrogeno, che ne costituiscono circa l'85% in peso secco. Questi elementi provengono dalla CO₂ atmosferica e dall'acqua del suolo. Tutti gli altri elementi sono definiti come “nutrienti minerali” e sono disponibili per le piante nella soluzione circolante del suolo. A seconda del loro contributo alla costruzione della materia biologica, vengono suddivisi in macroelementi (azoto - N, solfo - S, fosforo - P, calcio - Ca, magnesio - Mg, potassio - K e, secondo alcuni autori, anche ferro - Fe) e microelementi (la maggior parte degli elementi esistenti e, in particolare, manganese - Mn, rame - Cu, molibdeno - Mo, zinco - Zn, ecc.). Sia macroelementi che microelementi sono ugualmente essenziali alla vita delle piante. La loro assimilazione avviene per proporzioni grosso modo costanti, riflettendo la composizione dei tessuti vegetali, e non la loro disponibilità nel suolo. In tal modo essi seguono la “legge del minimo” o dei fattori limitanti. La loro carenza può dare origine a specifiche sintomatologie fogliari.

L'azoto è il macronutriente di gran lunga più importante per la costruzione della materia biologica, e ne costituisce circa il 2,5%. Nelle piante l'azoto è presente quasi totalmente sotto forma proteica, e il 50% dell'azoto totale è impiegato nella costruzione degli enzimi dell'apparato fotosintetico (Langsdorf et al., 2000), compresa la Rubisco, che è l'enzima più abbondante in natura. Il contenuto d'azoto per unità di superficie fogliare è usato come indice di efficienza fotosintetica (Reich et al., 1991).

Le foreste e la vegetazione naturale di gran parte d'Italia vegeta su suoli oligotrofici, con scarso contenuto di nutrienti minerali e soprattutto d'azoto. In queste condizioni si verificano processi di acclimatazione, che consistono in modificazioni fogliari in senso sclerofillico, aumentando la proporzione delle strutture di supporto rispetto a quelle plasmatiche, e aumentando la densità e lo spessore fogliare. Con queste strategie vengono mantenuti (o anche aumentati) i contenuti di clorofilla e azoto per unità di superficie (e quindi l'efficienza fotosintetica), sia pure in presenza di foglie più piccole. La sclerofillia della vegetazione sempreverde mediterranea è

considerata un adattamento evolutivo a suoli carenti di azoto e altri nutrienti minerali (Gutschick, 1999).

Se la vegetazione naturale e forestale è adattata e acclimatata a suoli poveri di nutrienti, gravi problemi derivano dalla carenza di azoto nelle colture agrarie. Per l'importanza che l'azoto riveste in agricoltura, molti studi sono stati indirizzati al rilievo precoce degli stati di stress derivanti dalla carenza di questo elemento. La finalità è ottimizzare le fertilizzazioni, intervenendo sulle carenze ed evitando gli eccessi, assicurando in tal modo una produttività ottimale.

La carenza di azoto si riflette sulla costruzione dell'intero apparato fotosintetico, con conseguenze negative su ogni fase della fotosintesi. Lu et al. (2001) riferiscono che la carenza di azoto ha scarsi effetti sulla resa quantica massima (F_v/F_M), ma viene depressa la resa quantica effettiva (F_q/F_M), insieme all'aumento del quenching non fotochimico. Inoltre è ridotta la capacità di trasporto degli elettroni nell'intersistema fra il PSII e il PSI. È plausibile che una ridotta produzione di Rubisco dovuta alla scarsa disponibilità di azoto si rifletta sulla funzionalità del PSI e sulla regione I-P del *transient* di fluorescenza, ma al momento attuale non disponiamo di studi a questo proposito.

Per molte specie esiste una forte correlazione fra il contenuto totale di azoto e l'assimilazione di CO_2 alle alte intensità luminose (Evans, 1989) e, di conseguenza, la fluorescenza è un metodo per stimare lo stato nutrizionale in relazione all'azoto. La riduzione del contenuto di azoto in foglie di melo è stata associata con la diminuzione di F_q/F_M e F_v/F_M (Cheng et al., 2000), anche se il contenuto di azoto deve raggiungere un livello molto basso prima che F_v/F_M sia alterato.

La carenza di azoto viene inoltre determinata per mezzo di tecniche di chlorophyll fluorescence imaging (CFI). Differenze nell'assorbimento dell'azoto e nel contenuto in clorofilla possono essere misurate con *flash-lamp fluorescence imaging system* (FL-FIS) (Langsdorf et al., 2000; Lichtenthaler et al., 2005). Questo sistema è stato proposto da Lichtenthaler e Babani (2000) come sostituto economico per il laser UV-A. Per esempio, nella barbabietola da zucchero, che ha alto contenuto di N, questo può essere determinato per mezzo di bassi valori di F440/F690 e F440/F740. I cambiamenti nei rapporti sopra citati sono dovuti alla diminuzione dell'emissione di fluorescenza a 690 e 740 nm, in quanto il contenuto di clorofilla si riduce in presenza di basso N (Heisel et al., 1996). La riduzione del contenuto di clorofilla è stato misurato anche con l'aumento del rapporto F690/F740 (Lichtenthaler e Rinderle, 1988; Babani e Lichtenthaler, 1996; Lichtenthaler et al., 2005), che pare essere meno sensibile al periodo di misura o all'età delle foglie piuttosto che i rapporti F440/F690 e F440/F740 (Heisel et al., 1996).

Per quanto riguarda gli altri macroelementi, essi sono tutti a vario titolo coinvolti nel processo fotosintetico, e quindi la loro eventuale deficienza comporta conseguenze negative sull'efficienza complessiva della fotosinte-

si. Vari studiosi si sono occupati degli effetti della carenza di elementi singoli e/o in combinazione su differenti organismi fotosintetici (licheni, alghe, piante superiori) (Belkhodja et al, 1998; Morales et al., 2001; Jia et al., 2008; Ripley et al., 2004; Boyce, 2007; Antal et al., 2007). Gli effetti dipendono dal genotipo, dal livello di carenza e dalle numerose possibili interazioni con altri fattori di stress. Fra le risposte osservate dai differenti autori, la riduzione del parametro F_v/F_m (l'indicatore di risposta più comunemente usato) è dovuta in molti casi alla contemporanea riduzione di F_m e aumento di F_0 . Altre risposte includono la riduzione di F_v/F_m nella fluorescenza modulata e, nell'analisi del *transient*, la riduzione del numero dei centri di reazione attivi, l'aumento della dissipazione agli step J e I e la comparsa della banda K.

8.8. Tossicità da metalli pesanti

I metalli pesanti sono presenti in natura in molte matrici geologiche (per esempio rocce ofiolitiche, aree geotermiche ecc.) Essi possono inoltre essere presenti localmente come inquinanti prodotti da varie attività urbane e industriali. Nelle piante i metalli pesanti possono essere essenziali come microelementi, svolgendo importanti funzioni nelle varie attività enzimatiche (Cu, Zn, Mo, Co, Ni ecc.), oppure possono essere non essenziali e la loro presenza dipende dall'influenza delle matrici ambientali, sia naturali che antropiche (Pb, Cd, Hg, Al ecc.).

Quando i metalli pesanti sono naturalmente presenti nell'ambiente, la vegetazione spontanea ha sviluppato adattamenti specifici per vivere e riprodursi (come, per esempio, sui terreni serpenticolici). Nel caso invece che siano presenti come contaminanti, essi possono venire assunti dal suolo in forma ionica e interferire nei processi metabolici in vari modi. Si rende brevemente conto di alcune caratteristiche dei principali MP (Parys et al., 1998; Joshi e Mohanty, 2004; Balakhina et al., 2005; Kalaji e Łoboda, 2007; Burzyński e Żurek, 2007; Jiang et al., 2008; Husted et al., 2009).

Cadmio (Cd). Metallo non essenziale, altamente tossico per le piante. È prodotto da vari processi industriali, agricoli e dal traffico automobilistico. Inibisce la fotosintesi agendo su numerosi siti: biosintesi e degradazione della clorofilla, degradazione di composti lipidici, disorganizzazione di OEC e del complesso antenna LHCII.

Rame (Cu). Micronutriente essenziale per le piante, quando è presente in eccesso è fortemente tossico. È presente nella formulazione di fitofarmaci, medicinali e mangimi. A concentrazioni elevate il rame interferisce con il metabolismo del ferro, causando carenza ferrica.

Mercurio (Hg). Metallo non essenziale. Composti del mercurio sono usati in varie preparazioni agricoli (fungicidi) e industriali. L'azione del mercurio include l'alterazione della permeabilità delle membrane e l'inibizione del trasporto foto sintetico degli elettroni.

Zinco (Zn). Micronutriente essenziale per le piante. Così come il rame, quando lo zinco è in eccesso va in concorrenza con il ferro causando carenza di quest'ultimo.

Cobalto (Co). Micronutriente essenziale per le piante. Quando è in eccesso inibisce la fotosintesi tramite l'aumento della resistenza stomatica e la riduzione dell'attività della Rubisco.

Alluminio (Al). È il più comune metallo pesante non essenziale per le piante. La tossicità da alluminio è un problema che interessa il 40% dei terreni coltivabili nel mondo. Alti livelli di alluminio nelle foglie determinano la riduzione di molti nutrienti quali Ca, Mg e P.

Piombo (Pb). Metallo non essenziale. Deriva da attività industriali e dal traffico automobilistico. Interferisce con la fotosintesi e la traspirazione, mentre stimola la respirazione.

Nickel (Ni). Elemento essenziale in alcune piante. Deriva da attività agricole e industriali. Inibisce il trasporto fotosintetico degli elettroni.

Quasi tutti i parametri di fluorescenza vengono alterati dai metalli pesanti. L'ampiezza della risposta dipende dalla fase di sviluppo della pianta, dalla dose e dalla durata del tempo di esposizione. Un effetto importante è costituito dalla riduzione della differenza fra F_M e F_S (riduzione di R_{FD}). Questo effetto viene attribuito al rallentamento del ciclo Calvin-Benson nelle piante trattate con metalli pesanti. Infatti vari studi effettuati applicando la cinetica veloce e quella lenta (Joshi e Mohanty, 2004) hanno dimostrato che il target primario dei metalli pesanti è il ciclo di Calvin-Benson piuttosto che il trasporto di elettroni nei tilacoidi.

8.9. Erbicidi

L'erbicida DCMU (3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea) (prodotto nel 1954 dalla Bayer con il nome commerciale Diuron) è stato molto usato negli studi sulla fotosintesi (Hodges et al., 1986; Schreiber, 1984). DCMU è un inibitore specifico della fotosintesi, che blocca esclusivamente il flusso degli elettroni dal PSII, mentre non ha effetti sul PSI o su altri siti come il ciclo di Calvin. La fase iniziale della induzione di fluorescenza (*transient* fluorescente) fornisce informazioni circa l'azione degli erbicidi di tipo DCMU. In foglie trattate con DCMU la massima emissione di fluorescenza avviene a circa 2 ms (step J nel *transient* di fluorescenza, con la soppressione quindi della fase J-P), senza alterazione di F_V/F_M (vedi Fig. 4. 6).

Altri erbicidi, oltre il DCMU, svolgono la loro azione inibendo la catena di trasporto degli elettroni dal PSII al PSI, come per esempio quelli del gruppo delle triazine (atrazina). Alcuni erbicidi, come il diquat e paraquat, bloccano invece i recettori degli elettroni al livello del PSI, causando pertanto la soppressione della fase I-P (Joly et al., 2005).

8.10. Ozono

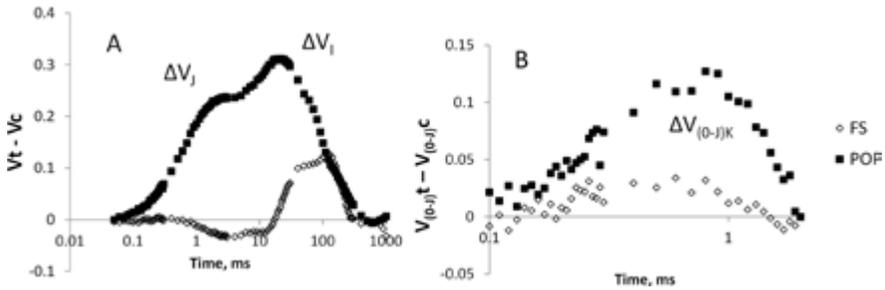
Nella troposfera l'ozono [O₃] è l'inquinante gassoso oggi più diffuso, con il maggiore potenziale impatto fitotossico. È ritenuto corresponsabile della perdita di produttività nelle foreste, negli ambienti naturali e nelle colture agrarie. Inoltre è un gas serra, che contribuisce al riscaldamento globale ed ai cambiamenti climatici. L'ozono non viene prodotto da fonti dirette di inquinamento, ma si forma partendo da ossidi di azoto e composti organici volatili (originati da combustioni e dal traffico automobilistico), grazie all'azione della radiazione luminosa e delle alte temperature.

L'azione principale è la depressione della fotosintesi netta, che può avvenire a causa della chiusura stomatica (*carbon starvation*) per evitare l'assorbimento e l'azione nociva dell'inquinante, oppure tramite la inattivazione della Rubisco (Brendley e Pell, 1998) e la conseguente riduzione dei processi di carbosilazione (Calatayud et al., 2002). In entrambi i casi non viene alimentato il ciclo di Calvin-Benson e viene a mancare la riduzione del carbonio.

Il parametro F_v/F_M si è dimostrato poco sensibile all'azione dell'ozono, e quindi pessimo indicatore per questo tipo di stress (Bussotti et al., 2011). Una significativa diminuzione del valore di questo parametro viene di solito riscontrata dopo periodi di esposizione molto lunghi, anticipando i normali processi di senescenza. Guidi et al. (2009), lavorando su cultivar ozono-sensibili e ozono-resistenti, conclude che la diminuzione della fotochimica primaria è un meccanismo di *down-regulation* che serve per ristabilire l'equilibrio fra il flusso elettronico spedito attraverso la ETC (*electron transport chain*) e la capacità di ricezione degli accettori finali oltre il PSI. Questo meccanismo serve ad evitare una sovra-eccitazione dello stroma prevenendo il manifestarsi di danni visibili, ed è connesso con l'aumento del valore di tutti i parametri che indicano la dissipazione controllata di energia come in NPQ (nella fluorescenza modulata), e la riduzione dei centri di reazione attivi nell'analisi del *transient* OJIP (Bussotti et al., 2007 a, b). La fluorescenza basale all'inizio dell'induzione fluorescente (F_0), in foglie con sintomi visibili da ozono, ha un comportamento specie-specifico (Bussotti et al., 2005). Nelle piante più sensibili è stato osservato spesso un aumento di questo parametro, indicando la disorganizzazione dei tilacoidi. In altri casi è stato verificato il comportamento opposto, facendo supporre la presenza di meccanismi di compensazione, o quanto meno di mantenimento, dell'efficienza fotosintetica nelle parti di foglia non sintomatiche.

Nell'analisi del *transient* fluorescente, i cambiamenti più rilevanti sono stati osservati nella fase I-P (Bussotti et al., 2011) e nei parametri ad essa collegati, a conferma che l'azione primaria dell'ozono avviene a carico degli accettori e degli enzimi che alimentano la fase oscura della fotosintesi. L'alterazione della fase I-P, assieme alla comparsa della banda-K a 300 μ s, è considerata una risposta precoce nei confronti dell'ozono (Desotgiu et al., 2010).

Figura 8.2 – Analisi della risposta all'inquinamento da ozono, per mezzo dell'analisi del transient fluorescente, in un clone di pioppo (POP) e di faggio (FS) (da Desotgiu et al., 2010, modificato). (A) Curva ΔV , ottenuta per sottrazione delle curva normalizzata fra F_0 e F_M (V) di piante trattate con ozono (T) meno quelle di controllo (C) [$\Delta V = V_T - V_C$]. Il principale effetto del trattamento con ozono consiste in un picco negativo, in entrambe le specie, a 30 (ΔV_I) ms, che indica la diminuzione della capacità di riduzione degli accettori finali oltre il PSI. (B) Curva ΔW , ottenuta per sottrazione delle curva normalizzata fra F_0 e F_J (W) di piante trattate con ozono (T) meno quelle di controllo (C) [$\Delta W = W_T - W_C$]. Il picco positivo a 300 μs (ΔV_K) indica la riduzione dell'efficienza dell'oxygen evolving complex (OEC).



Infine, in alcuni casi è stato osservato un miglioramento temporaneo dell'efficienza fotosintetica (Bussotti et al., 2011). Questo comportamento può essere interpretato in termini di acclimatazione, permettendo alla pianta di fare fronte ai danni dovuti all'ozono.

Applicazioni

9.1. Screening

Frequentemente un limite dei programmi di miglioramento genetico consiste nella scarsa disponibilità di tecniche rapide di fenotipizzazione per lo screening di grandi numeri di piante (fenotipizzazione, o *phenotyping*), per individuare i genotipi più idonei in determinate condizioni. I metodi tradizionalmente usati per valutare il comportamento di piante in serra si basano su valutazioni visive nel corso di alcune settimane. Sono metodi che implica l'impiego di molto tempo e sono difficilmente applicabili su un grande numero di piante. I metodi basati sulla fluorescenza della clorofilla offrono grandi potenzialità per attuare un rapido screening di un gran numero di piccole piante, grazie anche allo sviluppo di nuove tecniche e strumenti commerciali. L'applicazione del JIP-test, per mezzo di fluorimetri facilmente maneggiabili e di basso costo, rende possibile l'analisi di un gran numero di campioni in tempi brevi. Inoltre metodologie avanzate di CFI (*Chlorophyll Fluorescence Imaging*) permettono, con adeguati strumenti, l'analisi simultanea di molte piante (Barbagallo et al., 2003; Oxborough, 2004).

In campo agrario la fluorescenza della clorofilla è stata usata come metodo per selezionare su base fenotipica le varietà di cereali (riso, grano, orzo: Panda et al., 2006; Munns et al., 2010) e di fagioli (Petkova et al., 2007) maggiormente resistenti a stress idrico, salinità e alte temperature. Nel campo del verde urbano la fluorescenza è stata usata per individuare specie legnose tolleranti dell'aridità (Percival e Sheriffs, 2002; Percival et al., 2006), genotipi di *Crataegus* (Percival e Fraser, 2001) e di *Acer* (Percival et al., 2003) resistenti a somministrazioni fogliari di sale.

9.2. Vivaistica e verde urbano

Nella vivaistica forestale, l'analisi delle caratteristiche di fluorescenza della clorofilla costituisce uno dei test fisiologici atti a determinare la qualità delle piantine (Binder et al., 1996; Mattsson, 1996), in modo da poter selezionare precocemente gli individui d'avvenire (L'Hirondelle et al., 2007) per le successive fasi di coltivazione.

Una pratica vivaistica diffusa consiste nella conservazione a bassa temperatura di semenzali di conifere a radice nuda. L'analisi della fluorescenza della clorofilla consente di tenere sotto controllo i danni da gelo che avvengono a livello del fogliame e del cambio (Rose e Haase, 2001). Quando il parametro F_v/F_M scende al di sotto di 0,4 la mortalità dei semenzali supera il 50% (Perks et al., 2004). La fluorescenza permette inoltre di controllare l'entrata in dormienza delle piantine, e quindi di scegliere il momento migliore per la somministrazione del trattamento con le basse temperature. L'entrata in dormienza in autunno è contrassegnata dalla riduzione di F_v/F_M . Le piante che vengono sottoposte a freddo quando hanno ancora un valore di F_v/F_M alto, hanno minore possibilità di sopravvivere al trapianto primaverile (Perks et al., 2001). Oltre che per stabilire il momento migliore per la conservazione al freddo, il parametro F_v/F_M è usato per valutare gli effetti di differenti tecniche di coltivazione per migliorare la sopravvivenza dopo il trattamento al freddo, come per esempio l'applicazione di Ca^{2+} (Percival et al., 1999).

La somministrazione controllata di un moderato stress idrico in vivaio (*drought hardiness*, o indurimento) ne fa aumentare la sopravvivenza post-trapianto. Anche se non sono disponibili studi specifici, dati raccolti nel corso di ricerche con differente finalità fanno ritenere che i processi di "indurimento" siano accompagnati da un aumento dell'efficienza fotosintetica, misurata per mezzo della fluorescenza.

Più in generale, la fluorescenza può essere usata per tenere sotto controllo l'efficacia dei trattamenti colturali in vivaio (fertilizzazione, micorizzazione ecc.) e la vitalità delle piante post-trapianto, monitorando il successo o meno degli impianti in modo da poter intervenire prontamente con le necessarie cure colturali (Percival, 2004).

9.3. Post-harvest quality

Nella produzione orticola commerciale i prodotti (frutta, ortaggi) sono raccolti freschi e trasportati dal luogo di produzione al mercato. Alla stessa maniera le piante ornamentali sono trasportate intatte. Durante la raccolta ed il trasporto, piante e prodotti sono soggetti a numerosi fattori di stress che possono alterare la qualità del prodotto. Ortaggi e fiori recisi possono essere soggetti a stress idrico successivamente alla loro raccolta se non vengono gestiti adeguatamente, così come prodotti di origine tropicale

possono soffrire delle basse temperature cui sono sottoposte nel corso della conservazione. Molti frutti sono soggetti a trattamenti con alte temperature per rimuovere le infestazioni parassitari prima del loro trasporto. I frutti freschi e gli ortaggi sono spesso trasportati in confezioni con atmosfera modificata per ritardare la senescenza, con basso ossigeno ed elevata CO_2 (DeEll and Toivonen, 2003). Le piante ornamentali in vaso sono tenute al buio per lungo tempo, e sono spesso tenute a bassi livelli di luce nelle case degli acquirenti.

La fluorescenza può essere usata utilmente per monitorare i disturbi che derivano dalla gestione di prodotti verdi (DeEll e Toivonen, 2003), e anche per rilevare eventuali danni a frutti che contengono clorofilla nell'endocarpo (Nebdal et al., 2000). Le parti danneggiate dei frutti, che ammuffiscono in pochi giorni, hanno valori di F_v/F_M più bassi, rispetto alle parti che non sviluppano muffa. Lo studio di Nebdal et al. (2000) ha mostrato che tecniche di CFI (*Chlorophyll Fluorescence Imaging*) possono essere usate per la selezione automatica dei limoni. La fluorescenza è stata usata anche per determinare la concentrazione ottimale di O_2 e CO_2 da usare negli imballaggi ad atmosfera modificata (MAP, *Modified Atmosphere Packages*) usati per il trasporto e la conservazione dei prodotti orticoli. Misure effettuate su confezioni intatte di broccoli hanno mostrato che la diminuzione di F_v/F_M e F_q/F_M è correlata con la produzione di etanolo, acetato di etile e lo sviluppo di odori che indicano il deterioramento del prodotto (Toivonen e DeEll, 2001). Molti prodotti vengono refrigerati nel corso del loro trasporto e conservazione. In molti casi essi sono sensibili al freddo, e la fluorescenza può essere usata per determinare le risposte nei confronti di differenti e innovative pratiche (DeEll et al., 2000; Purvis, 2002).

9.4. Monitoraggio ambientale

Il monitoraggio della vegetazione spontanea, dei licheni e delle foreste per mezzo della fluorescenza della clorofilla (Mohammed et al., 2003, Fernández-Salegui et al., 2006) può essere fatto per differenti finalità, per esempio:

- valutazione di impatto ambientale in relazione a specifiche situazioni presenti sul territorio ante e post opera;
- valutazione delle relazioni fra differenti specie e del loro equilibrio ecologico nei popolamenti misti, per la previsione delle dinamiche vegetazionali e quindi la conservazione o meno della biodiversità;
- valutazione delle condizioni di stress in relazione a cambiamenti ambientali (cambiamenti climatici, inquinamento ecc.).

L'uso della fluorescenza della clorofilla per il monitoraggio della vegetazione spontanea e delle foreste può essere applicato ad un rilievo di tipo

terrestre, come tecnica aggiuntiva alle azioni che vengono svolte nei normali inventari forestali e/o rilievi di tipo sanitario, oppure a rilievi remoti (telerilevamento, o *remote sensing*).

9.4.1 Monitoraggio terrestre

L'uso di metodologie basate sulla fluorescenza della clorofilla può integrare utilmente le tecniche e i tipi di analisi terrestri usati tradizionalmente per la valutazione delle condizioni e la vitalità degli alberi. Queste tecniche sono basate, fra le altre cose, su valutazioni visive e sull'analisi chimica di campioni di chioma (vedi, per esempio, il programma paneuropeo per il monitoraggio delle condizioni delle foreste, www.icp-forests.org). Tuttavia emergono anche nuovi problemi, soprattutto quando si tratta di ricerche di grandi dimensioni che implicano l'analisi di un gran numero di campioni e l'impiego di più operatori e strumenti.

Una volta stabilito un disegno campionario adeguato (gli studi vegetazionali e gli inventari forestali propongono una vasta gamma di possibilità), per il campionamento stesso e le misure è necessario porre attenzione ad alcuni punti critici. Il campionamento è infatti una delle fasi più delicate di una indagine, e pone numerosi problemi.

Cosa campionare (rappresentazione dell'unità campionaria). Si tratta di valutare la variabilità interna del campione, decidendo se utilizzare solo un determinato strato allo scopo di limitare tale variabilità (per es. foglie di luce vs. foglie d'ombra), oppure rappresentare i differenti strati con un'adeguata numerosità di campionamento.

Come campionare. Nel caso di disegni campionari complessi, oppure quando si abbiano difficoltà ad eseguire misure non distruttive (per es. , chiole degli alberi), può essere preferibile lavorare con campioni staccati. In questo caso le operazioni di raccolta e di misura possono avvenire in momenti e luoghi distinti. È necessario quindi organizzare, insieme alla raccolta, la conservazione e il trasporto in maniera da evitare danni al campione stesso. La raccolta di campioni sulle chiole degli alberi propone problemi non sempre di facile soluzione (forbici su pali telescopici, tree climbing ecc.).

Quando campionare. Nell'ambito di una indagine è necessario minimizzare i fattori di variabilità dovuti al possibile cambiamento di stato fisiologico nel corso della stagione (senescenza, eventi di stress idrico, estremi termici...), per cui è necessario restringere il periodo di campionamento nell'ambito di una finestra di tempo limitata per rendere comparabili i dati raccolti. Anche l'ora di campionamento ha una sua influenza, dal momento che le risposte risentono sia delle variazioni di temperatura nel corso del giorno, sia dell'azione della luce diretta del sole (fotoinibizione). Per questo motivo può essere consigliabile conservare i campioni al buio per alcune ore in un ambiente a temperatura costante per rendere le misure omogenee.

Alcuni accorgimenti sono necessari per limitare le fonti di errore e migliorare la comparabilità dei dati.

Prima dell'inizio della campagna devono essere preparati dei dettagliati protocolli di campionamento, in modo che tutte le procedure siano standardizzate.

Gli strumenti usati devono essere possibilmente della stessa casa e dello stesso modello, opportunamente revisionati e ben calibrati, applicando le medesime impostazioni operazionali (durata e intensità del lampo, gain ecc.). Difformità fra singoli strumenti sono tuttavia sempre possibili (Bussotti et al., 2011), per cui è necessario determinare le differenze fra gli strumenti prima dell'inizio della campagna di misura (intercalibrazione), applicando poi ai risultati ottenuti i coefficienti di correzione necessari.

9.4.2 Telerilevamento

Varie tecniche e indici ottici sono usati nelle applicazioni di remote sensing sulla vegetazione. Gli scopi che vengono normalmente perseguiti riguardano il rilievo del Leaf Area Index (LAI), della biomassa, di indici di biodiversità ecc.

Recentemente sono state introdotte tecniche basate sul monitoraggio delle vie dissipative dell'energia assorbita (Moya e Cerovic, 2004). La dissipazione sotto forma di calore (*Non Photochemical Quenching*, NPQ) è collegata con l'attivazione del ciclo delle xantofille. Cambiamenti nello stato di de-epossidazione delle xantofille, producono variazioni della riflettanza in una stretta regione nel dominio visibile centrata a 531 nm (Bilger et al., 1990; Gamon et al., 1992). Per rilevare l'entrata in funzione di questo meccanismo fotoprotettivo e monitorarne l'andamento, Gamon et al. (1992, 1997) hanno formulato un indice spettrale, il Photochemical Reflectance Index (PRI), calcolato come rapporto normalizzato tra la riflettanza a 531 nm e una banda spettrale di riferimento 570 nm, non influenzata dallo stato di de-epossidazione (Penuelas et al., 1995, 1997). Altri approcci prendono invece in considerazione la misura di Fs utilizzando tecniche passive (Meroni e Colombo, 2006).

Bibliografia

- Ainsworth E.A., Long S. 2005. What have we learned from 15 years of Free-Air CO₂ Enrichment (FACE)? A metaanalytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* 165, 351-372.
- Ainsworth E.A., Rogers A. 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell Environment* 30, 258-270.
- Albert K.R., Mikkelsen T.N., Ro-Poulsen H. 2005. Effects of ambient versus reduced UV-B radiation on high arctic *Salix arctica* assessed by measurements and calculations of chlorophyll *a* fluorescence parameters from fluorescence transient. *Physiologia Plantarum* 124, 208-226.
- Albert K.R., Mikkelsen T.N., Ro-Poulsen H. 2008. Ambient UV-B radiation decreases photosynthesis in high arctic *Vaccinium uliginosum*. *Physiologia Plantarum* 133, 199-210.
- Albert K.R., Mikkelsen T.N., Ro-Poulsen H., Arndal M.F., Michelsen A. 2011. Ambient UV-B doses reduces PSII performance and net photosynthesis under natural irradiance in high Arctic *Salix arctica*. *Environmental Experimental Botany* 73, 10-18,
- Allen D.J., Ort D.R. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* 6, 36-42.
- Anderson J.M., Osmond C.B. 1987. Shade-sun responses: compromises between acclimation and photoinhibition. In: Kyle D.J., Osmond C.B., Arntzen C.J.(Eds.). *Photoinhibition*. Amsterdam, The Netherland, Elsevier. p. 1-38.
- Anderson J.M., Chow W.S., Park Y.I. 1995. The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynthesis Research* 46, 129-139.
- Andrews J.R., Fryer M.J., Baker N.R. 1995. Characterization of chilling effects on photosynthetic performance of maize crops during early season growth using chlorophyll fluorescence. *Journal of Experimental Botany* 46, 1195-1203.

- Antal T., Rubin A. 2008. *In vivo* analysis of chlorophyll *a* fluorescence induction. *Photosynthesis Research* 96, 217-226.
- Antal T.K., Krendeleva T.E., Rubin A.B. 2007. Study of photosystem 2 heterogeneity in the sulfur-deficient green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research* 94, 13-22.
- Arnold W., Davidson J.B. 1954. The identity of the fluorescent and delayed light emission spectra in *Chlorella*. *Journal General Physiology* 37, 677-684.
- Aro E.M., McCaffery S., Anderson J.M. 1993. Photoinhibition and D1 Protein Degradation in Peas Acclimated to Different Growth Irradiances. *Plant Physiology* 103, 835-843.
- Babani F., Lichtenthaler H.K., 1996. Light-induced and age-dependent 550 development of chloroplast in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO₂ assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *Journal of Plant Physiology* 148, 555-566.
- Babani F., Richter P., Lichtenthaler H.K. 1996. Changes in chlorophyll fluorescence signatures during greening of etiolated barley seedling as measured with the CCD-OMA fluorometer. *Journal of Plant Physiology* 148, 471-477.
- Baker N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review Plant Biology* 59, 89-113.
- Baker N.R., Rosenqvist E., 2004. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: and examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55, 1607-1621.
- Baker N.R., Oxborough K. 2004. Chlorophyll fluorescence as a probe of photosynthetic productivity. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherland, Springer. p. 65-82.
- Baker N.R., Nougés S., Allen D.J. 1997. Photosynthesis and photoinhibition. In: Lumsden P.J. (Ed.) *Plants and UV-B Responses to Environmental Change*, Society for experimental biology, Seminar Series 64. Cambridge, UK, Cambridge University Press. pp 95-112
- Balakhnina T.I., Kosobryukhov A.A., Ivanov A.A., Kreslavskii V.D. 2005. The effect of cadmium on CO₂ exchange, variable fluorescence of chlorophyll, and the level of antioxidant enzymes in pea leaves. *Russian Journal of Plant Physiology* 52, 15-20.
- Ballottari M., Dall'Osto L., Morosinotto T., Bassi R. 2007. Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *Jornal Biological Chemistry* 282, 8947-8958.
- Baraldi R., Canaccini F., Cortes S., Magnani F., Rapparini F., Zamboni A., Raddi S. 2008. Role of xanthophyll cycle-mediated photoprotection in *Arbutus unedo* plants exposed to water stress during the Mediterranean summer. *Photosynthetica* 46, 378-386.
- Barbagallo R.P., Oxborough K., Pallett K.E., Baker N.R. 2003. Rapid, non-invasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 132, 485-493.
- Belkhdja R., Morales F., Quílez R., López-Millán A. F., Abadía, J. Abadía A. 1998. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the

- reduction in the dark of the Photosystem II acceptor side. *Photosynthesis Research* 56, 265-276.
- Berden-Zrimec M., Drinovec L., Zrimec A. 2010. Delayed fluorescence. In: Sugget D.J., Prasil O., Borowitzka M. (Eds.). *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Dordrecht, The Netherland, Springer. p. 293-309.
- Bertsch W.F. 1962. Two photoreactions in photosynthesis: evidence from delayed light emission of *Chlorella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48, 2000-2004.
- Bilger W., Björkman O. 1990. Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25, 173-185.
- Binder W.D., Fielder P., Mohammed G.H., L'Hirondelle S.J. 1996. Applications of chlorophyll fluorescence for stock quality assessment with different types of fluorometers. *New Forests* 13, 63-89.
- Björkman O., Demmig B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489-504.
- Boardman N.K. 1977. Comparative Photosynthesis of Sun and Shade Plants. *Annual Review Plant Physiology* 28, 355-377.
- Boyce R.L. 2007. Chlorophyll fluorescence response of red spruce and balsam fir to a watershed calcium fertilization experiment in New Hampshire. *Canadian Journal of Forest Research* 37, 1518-1522.
- Bradbury M., Baker N.R. 1981. Analysis of the slow phases in the in vivo chlorophyll fluorescence induction curve. Changes in the redox state of photosystem II electron acceptors and fluorescence emission from photosystem I and II. *Biochem Biophys Acta* 63, 542-551
- Brendley B.W., Pell, E.J. 1998. Ozone-induced changes in biosynthesis of Rubisco and associated compensation to stress in foliage of hybrid poplar. *Tree Physiology* 18, 81-90.
- Bruce D., Vasil'ev S. 2004. Excess light stress: multiple dissipative processes of excess excitation. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherland, Springer. p.497-523.
- Brüggemann W., Linger P. 1994. Long-term chilling of young tomato plants under low light. IV. Differential responses of chlorophyll fluorescence quenching coefficients in *Lycopersicon* species of different chilling sensitivity. *Plant and Cell Physiology* 35, 585-591.
- Bukhov N.G., Carpentier R. 2004. Effects of water stress on the photosynthetic efficiency of plants. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherland, Springer. p. 321-362.
- Burzyński M., Żurek A. 2007. Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. *Photosynthetica* 45, 239-244.
- Buschmann, C., Lichtenthaler, H.K., 1998. Principles and characteristics of multicolour fluorescence imaging of plants. *Journal Plant Physiology* 152, 297-314

- Bussotti F. 2004. Assessment of stress conditions in *Quercus ilex* L. leaves by O-J-I-P chlorophyll *a* fluorescence analysis. *Plant Biosystems* 138, 101-109.
- Bussotti F., Agati G., Desotgiu R., Matteini P., Tani C., 2005. Ozone foliar symptoms in woody plants assessed with ultrastructural and fluorescence analysis. *New Phytologist* 166, 941-955.
- Bussotti F, Desotgiu R, Cascio C, Pollastrini M, Gravano E, Gerosa G, Marzuoli R, Nali C, Lorenzini G, Salvatori E, Manes F, Schaub M, Strasser R.J., 2011. Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll *a* fluorescence. A critical reassessment of existing data. *Environmental Experimental Botany* 73, 19-30.
- 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.
- Bussotti F. 2008. Functional leaf traits, plant communities and acclimation processes in relation to oxidative stress in trees: a critical overview. *Global Change Biology* 14, 2727-2739.
- Bussotti F., Desotgiu R., Cascio C., Strasser R.J., Gerosa G., Marzuoli R. 2007a. Photosynthesis responses to ozone in young trees of 3 species with different sensitivities, in a two-year open-top chamber experiment (Curno, Italy). *Physiologia Plantarum* 130, 122-135.
- Bussotti F., Strasser R.J., Schaub M. 2007b. Photosynthetic behavior of woody species under high ozone exposure probed with the JIP-Test - A review. *Environmental Pollution* 147, 430-437.
- Calatayud A., Ramirez J.W., Iglesias D.J., Barreno E. 2002. Effects of ozone on photosynthetic CO₂ exchange, chlorophyll *a* fluorescence and antioxidant systems in lettuce leaves. *Physiologia Plantarum* 116, 308-316.
- Calatayud A., Iglesias D.J., Talón M., Barreno E., 2003. Effects of 2-month ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 839-845.
- Calatayud A., Roca D., Martínez P.F. 2006. Spatial-temporal variations in rose leaves under water stress conditions studied by chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 564-573.
- Cascio C., Schaub M., Novak K., Desotgiu R., Bussotti F., Strasser R.J. 2010. Foliar responses to ozone of *Fagus sylvatica* L. seedlings grown in shaded and in full sunlight conditions. *Environmental Experimental Botany* 68, 188-197.
- Chaerle L. Van Der Straeten D. 2001. Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochimica Biophysica Acta* 1519, 153-166
- Cheng L., Fuchigami L.H., Breen P.J. 2000. Light absorption and partitioning in relation to nitrogen content in 'Fuji' apple leaves. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 125, 581-587.
- Chow W.S., Anderson J.M. 1987. Photosynthetic responses of *Pisum sativum* to an increase in irradiance during growth II. Thylakoid membrane component. *Australian Journal of Plant Physiology* 14, 9-19.

- Christen D., Schönmann S., Jermini M., Strasser R.J., Défago G., 2007. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by *in situ* chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental Experimental Botany* 60, 504-514.
- Cornic C., Fresnau C. 2002. Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for Photosystem II activity during a mild drought. *Annals of Botany* 89,887-894.
- Croxdale J., Omasa K. 1990a. Chlorophyll-*a* fluorescence and carbon assimilation in developing leaves of light-grown cucumber. *Plant Physiology* 93, 1078-1082.
- Croxdale J., Omasa K. 1990b. Patterns of chlorophyll fluorescence kinetics in relation to growth and expansion in cucumber leaves. *Plant Physiology* 93, 1083-1088.
- Dai Z., Edwards G.E., Ku M.S.B. 1992. Control of photosynthesis and stomatal conductance in *Ricinus communis* L. (Castor bean) by leaf to air vapor pressure deficit. *Plant Physiology* 99, 1426-1434.
- DeEll J.R., Toivonen P.M.A. 2003. Use of chlorophyll fluorescence in postharvest quality assessments of fruits and vegetables. In: DeEll J.R., Toivonen P.M.A. (Eds.) *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*. Boston, Kluwer Academic Publishers. p. 201-242.
- DeEll J.R., Vigneault C., Lemerre S. 2000. Water temperature for hydrocooling field cucumbers in relation to chilling injury during storage. *Postharvest Biology and Technology* 18, 27-32.
- Demmig-Adams B., Adams W.W. III. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1, 21-26
- Desotgiu R., 2012. Valutazione dell'effetto di stress ambientali su piante legnose per mezzo di tecniche di fluorescenza della clorofilla a. Università degli Studi di Firenze, Dottorato di Ricerca in Biosistemica ed Ecologia Vegetale, Scuola di Dottorato "Ubaldo Montelatici", XXIII Ciclo.
- Desotgiu R., Bussotti F., Faoro F., Iriti M., Agati G., Marzuoli R., Gerosa G., Tani C. 2010. Early events in *Populus* hybrid and *Fagus sylvatica* leaves exposed to ozone. *TheScientificWorld Journal* (TSWJ) 10, 512-527.
- Desotgiu R., Cascio C., Pollastrini M., Gerosa G., Marzuoli R., Bussotti F. 2012. Chlorophyll a fluorescence analysis along a vertical gradient of the crown in a poplar (Oxford clone) subjected to ozone and water stress. *Tree Physiology* 32, 976-986
- Desotgiu R., Cascio C., Pollastrini M., Gerosa G., Marzuoli R., Bussotti F. (*in stampa*). Long and short term photosynthetic adjustments in sun and shade leaves of *Fagus sylvatica* L., investigated with the fluorescence transient (FT) analysis. *Plant Biosystems*.
- Edwards G.E., Baker N.R. 1993. Can CO₂ assimilation in maize leaves be predictive accurately from chlorophyll fluorescence analysis? *Photosynthesis Research* 37, 89-102.
- Ellenson J.L., Amundson R.G. 1982. Delayed light imaging for the early detection of plant stress. *Science* 215, 1104-1106.
- Evans J.R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78, 9-19.

- Faraloni C., Cutino I., Petrucelli R., Leva A.R., Lazzeri S., Torzillo G. 2011. Chlorophyll fluorescence techniques as a rapid tool for *in vitro* screening of olive cultivars (*Olea europaea* L.) tolerant to drought stress. *Environmental Experimental Botany* 73, 49-56.
- Farquhar G.D., Ehleringer J.R., Hubick K.T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40, 503-537
- Fernández-Salegui A.B., Calatayud A., Terrón A., Barreno E.M., 2006. Chlorophyll *a* fluorescence in transplants of *Parmelia sulcata* Taylor near a power station (La Robla, León, Spain). *The Lichenologist* 38, 457-468 (2006)
- Flexas J., Diaz-Espejo A., Galmés J., Kaldenhoff R., Medrano H., Ribas-Carbo M. 2007. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant Cell and Environment* 30, 1284-1298.
- Force L., Critchley C., van Rensen J.J.S. 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test. *Photosynthesis Research* 78, 17-33.
- Fracheboud Y., Leipner J. 2003. The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress. In: DeEll J.R., Tiovonen P.M.A. (Eds.) *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*. Boston, Kluwer Academic Publishers. p. 125-150.
- Fryer M.J., Andrews J.R., Oxborough K., Blowers D.A., Baker N.R. 1998. Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport and active oxygen metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology* 116, 571-580.
- Fryer M.J., Oxborough K., Martin B., Ort D.R., Baker N.R. 1995. Factors associated with the depression of photosynthetic quantum efficiency in maize at low growth temperatures. *Plant Physiology* 108, 761-767.
- Gamon J.A., Penuelas J., Field C.B. 1992. A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sensing of Environment* 41, 35-44.
- Gamon J.A., Serrano L., Surfus J.S. 1997. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia* 112, 492-501.
- García-Plazaola J.L., Artetxe U., Becerril J.M. 1999. Diurnal changes in anti-oxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* L. during winter. *Plant Science* 143, 125-133.
- Genty B., Briantais J.-M., Baker N.R. 1989. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica Biophysica Acta* 990, 87-92.
- Gilmore A.M. 2004. Excess light stress: probing excitation dissipation mechanisms through global analysis of time- and wavelength-resolved chlorophyll *a* fluorescence. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherland, Springer. p. 555-581.
- Govindjee 1995. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll *a* fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 131-160.

- Gray G.R., Cauvin L.P., Sarhan F., Huner N.P.A. 1997. Cold acclimation and freezing tolerance. A complex interaction of light and temperature. *Plant Physiology* 114, 467-474.
- Greenberg B.M., Wilson M.I., Gerhardt K.E., Wilson, 1996. Morphological and physiological responses of *Brassica napus* to ultraviolet-B radiation: Photo-modification of ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase and potential acclimation processes. *Journal of Plant Physiology* 148, 78-85.
- Guidi L., Degl'Innocenti E., Martinelli F., Piras M. 2009. Ozone effects on carbon metabolism in sensitive and in sensitive *Phaseolus* cultivars. *Environmental Experimental Botany* 66, 117-125.
- Gutschick V.P. 1999. Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytologist* 144, 3-18.
- Hald S., Nandha B., Gallois P., Johnson G.N. 2008. Feedback regulation of photosynthetic electron transport by NADP(H) redox poise. *Biochimica et Biophysica Acta* 1777, 433-440
- Hall D.O., Rao K.K. 1999. *Photosynthesis (Studies in Biology)*. Fifth edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Harbinson J., Hedley C.L. 1989. The kinetic of P-700+ reduction in leaves: a novel in situ probe of thylakoid functioning. *Plant, Cell Environment* 12, 357-369.
- Harbinson J., Woodward F.I. 1987. The use of light induced absorbance changes at 820 nm to monitor the reduction state of P-700 in leaves. *Plant Cell Environment* 10, 131-140.
- Havaux M. 1992. Stress tolerance of Photosystem II in vivo. Antagonistic effects of water, heat and photoinhibition stress. *Plant Physiology* 100, 424-432.
- Havaux M. 1993. Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. *Plant Cell Environment* 16, 461-467.
- Havaux M., Strasser R.J., Greppin G. 1990. In vivo photoregulation of photochemical and nonphotochemical deactivation of photosystem II in intact plant leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 28, 735-746.
- Havaux M., Strasser R.J., Greppin G. 1991. A theoretical and experimental analysis of the q_p and q_n coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events. *Photosynthesis Resesarch* 27, 41-55.
- Havaux M., Triantaphylides C., Genty B. 2006. Autoluminescence imaging: a non-invasive tool for mapping oxidative stress. *Trends in Plant Science* 11, 480-484.
- Heisel F., Sowinska M., Mieke J.A., Lang M., Lichtenthaler H.K. 1996. Detection of nutrient deficiencies of maize by laser induced fluorescence imaging. *Journal of Plant Physiology* 148, 622-631
- Henriques F.S. 2009. Leaf chlorophyll fluorescence: background and fundamentals for plant biologists. *Botanical Review* 75, 249-270.
- Hodges M., Barber J. 1986. Analysis of chlorophyll fluorescence induction kinetics exhibited by DCMU-inhibited thylakoids and the origin of α and β centres. *Biochimica Biophysica Acta - Bioenergetics* 848, 239-246.
- Hopkins W.G., Hüner N.A. 2008. *Fisiologia vegetale*. McGraw-Hills Companies, Italia.

- Hopkins W.G., Hüner N.A. 2009. Introduction to plant physiology. Fourth edition. John Wiley & Sons Inc., USA.
- Husted S., Laursen K. H., Hebborn C. A., Schmidt S.B., Pedas P., Haldrup A., Jensen P. E. 2009. Manganese Deficiency Leads to Genotype-Specific Changes in Fluorescence Induction Kinetics and State Transitions. *Plant Physiology* 150, 825-833.
- Ilík P., Schansker G., Kotabová E., Váczi P., Strasser R.J., Barták M. 2006. A dip in the chlorophyll fluorescence induction at 0.2-2 s in *Trebouxia*-possessing lichens reflects a fast reoxidation of photosystem I. A comparison with higher plants. *Biochimica Biophysica Acta* 1757, 12-20.
- Jansen M.A.K., Gaba V., Greenberg B.M., Mattoo A.K., Edelman M. 1996. Low threshold levels of ultraviolet-B in a background of photosynthetically active radiation trigger rapid degradation of the D2 protein of photosystem II. *Plant Journal* 9, 693-696
- Jia Y., Yang X., Islam E., Feng Y. 2008. Effects of Potassium Deficiency on Chloroplast Ultrastructure and Chlorophyll Fluorescence in Inefficient and Efficient Genotypes of Rice. *Journal of Plant Nutrition* 31, 2105-2118.
- Jiang H.X., Chen L.S., Zheng J.G., Han S., Tang N., Smith B.R. 2008. Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in *Citrus* leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiology* 28, 1863-1871
- Joliot A, Joliot P. 1964. Etude cinétique de la réaction photochimique libérant l'oxygène au cours de la photosynthèse. *CR Acad Sci Paris* 258, 4622-4625
- Joliot P, Joliot A. 2002. Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10209-10214.
- Joliot P., Joliot A., Bouges B., Barbieri G. 1971. Studies of system-II photocenters by comparative measurements of luminescence, fluorescence, and oxygen emission. *Photochemistry Photobiology* 14, 287-305.
- Joly D., Bigras C., Harnois J., Govindachary S., Carpentier R. 2005. Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* 84, 107-112.
- Jordan B.R., He J., Chow W.S., Anderson J.M. 1992. Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose 1,5-biphospahte carboxylase in response to supplemental UV-B radiation. *Plant Cell Environment* 15, 91-98
- Joshi M.K., Mohanty P. 2004. Chlorophyll a fluorescence as a probe of heavy metal ion toxicity in plants. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherland, Springer. p. 637-661.
- Juneau P., Green B.R., Harrison P.J. 2005. Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. *Photosynthetica* 43, 75-83.
- Jursinic P.A. 1986. Delayed fluorescence: Current concepts and status. In: Govindjee, Fork D.C. (Eds.). *Light emission by plant and bacteria*. New York, Academic Press. p. 291-328.
- Kalachanis D., Manetas Y. 2010. Analysis of fast chlorophyll fluorescence rise (O-K-J-I-P) curves in green fruits indicates electron flow limitations at the

- donor side of PSII and the acceptor sides of both photosystems. *Physiologia Plantarum* 139, 313-323.
- Kalaji M.H., Łoboda T. 2007. Photosystem II of barley seedlings under cadmium and lead stress. *Plant Soil Environment* 53, 511-516.
- Kalaji M.H., Pietkiewicz S. 1993. Salinity effects on plant growth and other physiological processes. *Acta Physiologia Plantarum* 143, 89-124.
- Kautsky H., Hirsch A. 1931. Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* 19, 96-106.
- Klughammer C., Schreiber U. 1994. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P-700+ - absorbance changes at 830 nm. *Planta* 192, 261-268.
- Körner C. 2006. Plant CO₂ responses: An issue of definition, 666 time and resource supply. *New Phytologist* 172, 393-411.
- Krause G.H. 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiologia Plantarum* 74, 566-574.
- Krause G.H., Weis E. 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research* 5, 139-157.
- Krause G.H., Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 42, 313-49.
- Krieger-Liszkay A. 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56, 337-346.
- 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. *Physiologia Plantarum* 101, 265-277.
- L'Hirondelle S., Simpson D.G., Binder W.D. 2007. Chlorophyll fluorescence, root growth potential, and stomatal conductance as estimates of field performance potential in conifer seedlings. *New Forests* 34, 235-251.
- Langsdorf G., Buschmann C., Sowinska M., Babani F., Mokry M., Timmermann F., Lichtenthaler H.K. 2000. Multicolor fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation. *Photosynthetica* 38, 539-551.
- Larcher W. 2000. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems* 134, 279-295.
- Lawlor D.W., 2001. *Photosynthesis*. 3rd Edition. BIOS Scientific Publisher Limited, Oxford, UK.
- Lawlor D.W., Cornic G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environment* 25, 275-294.
- Lazar D. 1999. Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica Biophysica Acta* 1412, 1-28.
- Lazar D. 2006. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology* 33, 9-30.
- Leakey A.D.B., Ainsworth E.A., Bernacchi C.J., Rogers A., Long S.P., Ort D.R. 2009. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal Experimental Botany* 60, 2859-2876.

- Leegood R.C., Edwards G.E. 1996. Carbon metabolism and photorespiration: temperature dependence in relation to other environmental factors. In: Baker NR, ed. Photosynthesis and the environment. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 191-221.
- Leitsch J., Schnettger B., Critchley C., Krause G.H. 1994. Two mechanisms of recovery from photoinhibition *in vivo*: Reactivation of photosystem II related and unrelated to D1- protein turnover. *Planta*; 194, 15-21.
- Liang Y., Chen H., Tang M.J., Yang P.F., Shen S.H. 2007. Responses of *Jatropha curcas* seedlings to cold stress: photosynthesis-related proteins and chlorophyll fluorescence characteristics. *Physiologia Plantarum* 131, 508-517.
- Lichtenthaler H.K., Babani F. 2000. Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology Biochemistry* 38, 889-895
- Lichtenthaler H.K., Babani F. 2004. Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Change in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherlands, Springer. p. 713-736.
- Lichtenthaler H.K., Burkart S. 1999. Photosynthesis and high light stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 25, 3-16.
- Lichtenthaler H., Miehé J.A. 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2, 316-320.
- Lichtenthaler H.K., Rinderle U. 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 19, S29-S85.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Döll M., Fietz H.J., Bach T., Kozel U., Meier D., Rahmsdorf U. 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Research* 2, 115-141.
- Lichtenthaler H., Buschmann C., Knapp M. 2004. Measurement of chlorophyll fluorescence kinetics (Kautsky effect) and the chlorophyll fluorescence decrease ratio (R_{fd} -values) with the PAM-fluorometer. In: *Analytical methods in plant stress biology*. Filek M., Biesaga-Kościelniak J., Marcińska I.(Eds.) The Franciszek Górski Inst. Plant Physiol., Polish Academy of Sciences, Kraków, Poland. p. 93-111.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Knapp M. 2005. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{fd} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43, 379-393.
- Lichtenthaler H.K., Ač A., Marek M.V., Kalina J., Urban O. 2007. Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. *Plant Physiology Biochemistry* 45, 577-588.
- Long S.P., Humphries S., Falkowski P.G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 633-662.

- Lu C., Zhang J. 1999. Effect of water stress on photosystem II photochemistry thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany* 336, 1199-1206.
- Lu C, Lu Q, Zhang J, Zhang Q, Kuang T. 2001. Xanthophyll cycle, light energy dissipation and photosystem II down-regulation in senescent leaves of wheat plants grown in the field. *Australian Journal Plant Physiology* 28, 1023-1030.
- Lu C., Qiu N., Lu Q., Wang B., Kuang T. 2003. PSII photochemistry, thermal energy dissipation, and the xanthophyll cycle in *Kalanchoë daigremontiana* exposed to a combination of water stress and high light. *Physiologia Plantarum* 118, 173-182.
- Martinez-Ferri E., Manrique E., Valladares F., Balaguer L. 2004. Winter photoinhibition in the field involves different processes in four co-occurring Mediterranean tree species. *Tree Physiology* 24, 981-990.
- Mattsson A. 1996. Predicting field performance using seedling quality assessment. *New Forests* 13, 223-248
- Maxwell C., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – A practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659- 668.
- Maxwell K., Bjorkman O., Leegood R. 1997. Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends in Plant Science* 2, 119-121.
- Maxwell K., Marrison J.L., Leech R.M., Griffiths H., Horton P. 1999. Chloroplast acclimation in leaves of *Guzmania monostachia* in response to high light. *Plant Physiology* 121, 89-95.
- Melis A., Nemson J.A., Harrison M.A. 1992. Damage to functional components and partial degradation of photosystem II reaction centre proteins upon chloroplast exposure to ultraviolet-B radiation. *Biochimica Biophysica Acta* 1109, 312-320.
- Meroni M., Colombo R. 2006. Leaf level detection of solar induced chlorophyll fluorescence by means of a subnanometer resolution spectroradiometer. *Remote Sensing of Environment* 103, 438-448.
- Mohammed G.H., Zarco-Tejada P., Miller J.R. 2003. Applications of chlorophyll fluorescence in forestry and ecophysiology. In: DeEll J.R., Tiovonen P.M.A. (Eds.) *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*. Boston: Kluwer Academic Publishers. p. 80-124.
- Moore B.D., Cheng S.H., Sims D., Seemann J.R. 1999. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell Environment* 22, 567-582.
- Morales F., Moise N., Quílez R, Abadía A., Abadía J., Moya I. 2001. Iron deficiency interrupts energy transfer from a disconnected part of the antenna to the rest of Photosystem II. *Photosynth Research* 70, 207-20.
- Moya I., Cerovic Z.G. 2004. Remote sensing of chlorophyll fluorescence: instrumentation and analysis. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherland, Springer. p. 429-445.
- Munns R., James R.A., Sirault X.R.R., Furbank R.T., Jones H.G. 2010. New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. *Journal of Experimental Botany* 61, 3499-3507.

- Nedbal L., Whitmarsh J. 2004. Chlorophyll fluorescence 699 imaging of leaves and fruits. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), Chlorophyll *a* fluorescence. A signature of photosynthesis. Springer, The Netherlands, pp. 389-407.
- Nedbal L., Soukupova J., Whitmarsh J., Trtílek M. 2000. Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality. *Photosynthetica* 38, 571-579.
- Nilsson H.E. 1995. Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Ann. Rev. Plant Pathol.* 33, 489-527.
- Nogués S., Baker N.R. 1995. Evaluation of the role of damage to photosystem II in the inhibition of CO₂ assimilation in pea plants on exposure to UV-B radiation. *Plant Cell Environment* 18, 781-787.
- Ogaya R., Peñuelas J. 2003. Comparative field study of *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*: photosynthetic response to experimental drought conditions. *Environmental Experimental Botany* 50, 137-148.
- Ogaya R., Peñuelas J., Asensio D., Llusà J. 2011. Chlorophyll fluorescence responses to temperature and water availability in two co-dominant Mediterranean shrub and tree species in a long-term field experiment simulating climate change. *Environmental Experimental Botany* 73, 89-93.
- Ohira S., Morita N., Suh H.J., Jung J., Yamamoto Y. 2005. Quality control of Photosystem II under light stress - turnover of aggregates of the D1 protein in vivo. *Photosynthesis Research* 84, 29-33.
- Oliveira G., Peñuelas J. 2000. Comparative photochemical and phenomorphological responses to winter stress of an evergreen (*Quercus ilex* L.) and a semi-deciduous (*Cistus albidus* L.) Mediterranean woody species. *Acta Oecologica* 21, 97-107.
- Oliveira G., Peñuelas J. 2002. Comparative protective strategies of *Cistus albidus* and *Quercus ilex* facing photoinhibitory winter conditions. *Environmental and Experimental Botany* 47, 281-289.
- Omasa K. 1990. Images instrumentation methods of plant analysis. In: Linskens, H.F., Jackson, J.F. (Eds.), *Physical Methods in Plant Science*. Berlin, Springer-Verlag. p. 203-243.
- Omasa K., Takayama K., 2003. Simultaneous measurement of stomatal conductance, non-photochemical quenching, and photochemical yield of photosystem II in intact leaves by thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Cell Physiology* 44, 1290-1300.
- Ort DR. 2002. Chilling-induced limitations on photosynthesis in warm climate plants: contrasting mechanisms. *Environmental Control in Biology* 40, 7-18.
- Ort D.R., Baker N.R. 2002. A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology* 5, 193-198.
- Oukarroum A., El Madidi S., Schansker G., Strasser R.J. 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental Experimental Botany* 60, 438-446.
- Oukarroum A., Schansker G., Strasser R.J. 2009. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl

- a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiologia Plantarum* 137, 188-199.
- Oxborough K. 2004. Using chlorophyll *a* fluorescence imaging to monitor photosynthetic performance. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherlands, Springer. p. 409-28.
- Oxborough K., Baker N. R. 1997. Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components: calculation of qP and F_v/F_m' without measuring F_o' . *Photosynthesis Research* 54, 135-142.
- Paillotin G. 1976. Capture frequency of excitations and energy transfer between photosynthetic units in the photo system II. *Journal of Theoretical Biology* 58, 219-235.
- Panda D., Rao D.N., Sharma S.G., Strasser R.J., Sarkar R.K. 2006. Submergence effects on rice genotypes during seedling stage: Probing of submergence driven changes of photosystem 2 by chlorophyll *a* fluorescence induction O-J-I-P transients. *Photosynthetica* 44, 69-75.
- Peñuelas J., Filella I., Gamon J.A. 1995. Assessment of Photosynthetic Radiation-Use Efficiency with Spectral Reflectance. *New Phytologist* 131, 291-296.
- Peñuelas J., Llusia J., Piñol J., Filella I. 1997. Photochemical reflectance index and leaf photosynthetic radiation-use-efficiency assessment in Mediterranean trees. *International Journal of Remote Sensing* 18, 2863-2868.
- Percival G.C. 2004. Evaluation of physiological tests as predictors of young tree establishment and growth. *Journal of Arboriculture* 30, 80-91.
- Percival G.C., Fraser G.A. 2001. Measurement of the salinity and freezing tolerance of *Crataegus* genotypes using chlorophyll fluorescence. *Journal of Arboriculture* 27, 233-245.
- Percival G.C., Boyle C., Baird L. 1999. The influence of calcium supplementation on the freezing tolerance of woody plants. *Journal of Arboriculture* 25, 285-291.
- Percival G.C., Sheriffs C.N. 2002. Identification of drought-tolerant woody perennials using chlorophyll fluorescence. *Journal of Arboriculture* 28, 215-223.
- Percival G.C., Gillian A., Oxenham G. 2003. Foliar salt tolerance of *Acer* genotypes using chlorophyll fluorescence. *Journal of Arboriculture* 29, 61-65.
- Percival G.C., Kearyb I.P., Al-Habsib S. 2006. An assessment of the drought tolerance of *Fraxinus* genotypes for urban landscape plantings. *Urban Forestry & Urban Greening* 5, 17-27.
- Pereira W.E., de Siqueira D.L., Martínez C.A., Puiatti M. 2000. Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under aluminium stress. *Journal Plant Physiology* 157, 513-520.
- Perks J.P., Monaghan S., O'Reilly C., Osborne B.A., Mitchell D.T. 2001. Chlorophyll fluorescence characteristics, performance and survival of freshly lifted and cold stored Douglas fir seedlings. *Annals of Forest Science* 58, 225-235.
- Perks M.P., Osborne B.A., Mitchell D.T. 2004. Rapid predictions of cold tolerance in Douglas-fir seedlings using chlorophyll fluorescence after freezing. *New Forests* 28, 49-62.

- Petkova V., Denev I.D., Cholakov D., Porjazov I. 2007. Field screening for heat tolerant common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) by measuring of chlorophyll fluorescence induction parameters. *Scientia Horticulturae* 111, 101-106.
- Pfündel E. 1998. Estimating the contribution of Photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* 56, 185-195.
- Pietrini F., Chaudhuri D., Thapliyal A.P., A. Massacci. 2005. Analysis of chlorophyll fluorescence transients in mandarin leaves during a photo-oxidative cold shock and recovery. *Agriculture, Ecosystems Environment* 106, 189-198.
- Pollastrini M., Desotgiu R., Cascio C., Bussotti F., Cherubini P., Saurer M., Gerosa G., Marzuoli R. 2010. Growth and physiological responses to ozone and mild drought stress of trees species with different ecological requirements. *Trees Structure and Function* 24, 695-704.
- Pollastrini M., Di Stefano V., Ferretti M., Agati G., Grifoni D., Zipoli G., Orlandini S., Bussotti F. 2011. Influence of different light intensity regimes on leaf features of *Vitis vinifera* L. in UV-B radiation filtered conditions. *Environmental Experimental Botany* 73, 108-115.
- Powles S.B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review of Plant Physiology* 35, 15-44.
- Purvis A.C. 2002. Diphenylamine reduces chilling injury of green bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology* 25, 41-48.
- Reich P.B., Walters M.B., Ellsworth D.S. 1991. Leaf age and season influence the relationships between leaf nitrogen, leaf mass per area and photosynthesis in maple and oak trees. *Plant Cell Environment* 14, 251-259.
- Reigosa R.M.J., Weiss O. 2001. Fluorescence techniques. In: Reigosa R.M. (ed.): *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Dordrecht, the Netherlands, Acad. Publ. p. 155-171.
- Ripley B.S., Redfern S.P., Dames J. 2004. Quantification of the photosynthetic performance of phosphorus-deficient *Sorghum* by means of chlorophyll-*a* fluorescence kinetics. *South African Journal of Science* 100, 615-618.
- Roháček K. 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40, 13-29.
- Roháček K., Barták M. 1999. Techniques of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters and some applications. *Photosynthetica* 37, 339-363.
- Rose R., Haase D. 2002. Chlorophyll fluorescence and variations in tissue cold hardiness in response to freezing stress in Douglas-fir seedlings. *New Forests* 23, 81-96.
- Sarijeva G, Knapp M, Lichtentaler HK. 2007. Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of *Ginkgo* and *Fagus*. *Journal Plant Physiology* 164, 950-955.
- Scarascia-Mugnozza G., De Angelis P., Matteucci G., Valentini R. 1996. Long-term exposure to elevated [CO₂] in a natural *Quercus ilex* L. community: net photosynthesis and photochemical efficiency of PSII at different levels of water stress. *Plant Cell Environment* 19, 643-654.

- Schansker G., Srivastava A., Govindjee Strasser R.J. 2003. Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll a fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Functional Plant Biology* 30, 785-796.
- Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J. 2005. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochimica Biophysica Acta* 1706, 250-261.
- Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J. 2006. Dark-recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: the qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochim Biophys Acta*; 1757, 787-797
- Schansker G., Yuan Y., Strasser R.J. 2008. Chl a fluorescence and 820 nm transmission changes occurring during a dark-to-light transition in pine needles and pea leaves: a comparison. In: Allen J.F., Gantt E., Golbeck J.H., Osmond B. (Eds.). *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherlands, Springer. p. 945-949
- Schreiber U. 1984. Comparison of ATP-induced and DCMU-induced increases of chlorophyll fluorescence. *Biochimica Biophysica Acta - Bioenergetics* 767, 80-86.
- Schreiber U. 1986. Detection of rapid induction kinetics with a new type of High Frequency Modulated Chlorophyll Fluorescence. *Photosynthesis Research* 9, 261-272.
- Schreiber U. 2004. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherlands, Springer. p 279-319
- Schreiber U., Bilger W. 1993. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. *Progress in Botany* 54, 51-173.
- Schreiber U., Klughammer C., Neubauer C. 1988. Measuring P700 changes around 830 nm with a new type of pulse modulation system. *Zeitschrift für Naturforschung* 43c, 686-6978.
- Schreiber U., Neubauer C., Klughammer C. 1989. Devices and methods for Room-Temperature Fluorescence Analysis. *Phil. Trans. Royal Soc. London. S. B, Biol. Sci.* 323: No. 1216, *New Vistas in Measurement of Photosynthesis* 241-251.
- Schreiber U., Bilger W., Neubauer C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Schulze E.D., Caldwell M.M. (Eds.), *Ecophysiology of Photosynthesis*. *Ecol. Studies*, 100. Berlin, Germany, Springer. p. 49-70.
- Schreiber U., Bilger W., Hormann H., Neubauer C. 2000. Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: *Photosynthesis. A Comprehensive Treatise*. Raghavendra A.S. (Ed.). Cambridge UK, Cambridge Univ. Press. p. 320-336.
- Shabala S.N., Shabala S.I., Martynenko A.I., Babourina O., Newman I.A. 1998. Salinity effect on bioelectric activity, growth, Na⁺ accumulation and chlorophyll fluorescence of maize leaves: a comparative survey and prospects for screening. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 609-616.

- Shangguan Z., Shao M., Dyckmans J. 2000. Effects of nitrogen nutrition and water deficit on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in winter wheat. *Journal Plant Physiology* 156, 46-51.
- Sharkey T.D., Bernacchi C.J., Farquhar G.D., Singaas E.L. 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant Cell and Environment* 30, 1035-1040.
- Sironval. C., Strasser R.J., Brouers M. 1981. Equivalence entre la théorie des flux et la théorie des relations entre proportions de pigments pour la description de la répartition de l'énergie lumineuse absorbée par le membranes photoactives. *Bulletin et Memoires de l'Academie Royale de Belgique (Brussels)* 67, 248-259.
- Srivastava A., Guissé B., Greppin H., Strasser R.J. 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient: OKJIP. *Biochimica Biophysica Acta* 1320, 95-106.
- Stirbet A., Govindjee. 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104, 236-257.
- Stirbet A., Govindjee, Strasser B.J., Strasser R.J. 1998. Chlorophyll *a* fluorescence induction in higher plants: modelling and numerical simulation. *Journal Theoretical Biology* 193, 131-151.
- Strasser R.J. 1978. The grouping model of plant photosynthesis. In: Akayunoglou G., Argyroudi-Akoyunoglou J. (Eds.) *Chloroplast Development*. Amsterdam, The Netherland. p. 513-524.
- Strasser R.J. 1981. The grouping model of plant photosynthesis: heterogeneity of photosynthetic units in thylakoids. In: Akoyunoglou, G. (Eds.) *Photosynthesis. III. Structure and molecular organization of the photosynthetic apparatus*. Balaban International Science Service, Philadelphia, PA. p. 727-737.
- Strasser R.J. 1988. A concept for stress and its application in remote sensing. In: *Applications of Chlorophyll Fluorescence*. Lichtenthaler H.K. (Ed.). Academic Press, The Netherlands. P. 333-337.
- Strasser R.J., Govindjee 1992a. The F_0 and the O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae. In: Argyroudi-Akoyunoglou, J.H. (Eds.) *Regulation of Chloroplast Biogenesis*. New York, USA, Plenum Press. p 423-426.
- Strasser R.J., Govindjee 1992b. On the O-J-I-P fluorescence transient in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas Reinhardtii*. In: Murata, N. (Ed.), *Research in Photosynthesis*, Vol. 4. Dordrecht, Germany, Kluwer Academic Publisher. P. 29-32.
- Strasser R.J., Stirbet A.D. 2001. Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O-J-I-P. Fitting of experimental data to three different PS II models. *Mathematics and Computers in Simulation* 56, 451-461.
- Strasser B.J., Strasser R.J. 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: Mathis P. (Ed.) *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Vol V. Dordrecht, The Netherland, Kluwer Academic Publishers. pp 977-980.

- Strasser A., 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. p. 445-483.
- Strasser R.J., Srivastava A., Govindjee 1995. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology* 61, 32-42.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. 2004. Analysis of the fluorescence transient. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherland, Springer. p. 321-362.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V. 2011. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 1313-1326.
- Strehler B.L., Arnold W. 1951. Light production by green plants. *Journal General Physiology* 34, 809-820.
- Strid Å., Chow W.S., Anderson J.M. 1990. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis of in *Pisum sativum*. *Biochim Biophys Acta* 1020, 260-268
- Stroch M., Kuldova K., Kalina J., Spunda V. 2008. Dynamics of the xanthophyll cycle and non-radiative. *Journal Plant Physiology* 165, 612-622.
- Taiz L., Zeiger E. 2009. *Fisiologia Vegetale. Terza edizione italiana sulla quarta in lingua inglese, a cura di Massimo Maffei*. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova.
- Takahashi S, Badger MR. 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trend in Plant Science* 16, 53-60.
- Takahashi S, Murata N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trend in Plant Science* 13, 178-182.
- Tateno M, Taneda H. 2007. Photosynthetically versatile thin shade leaves: a paradox of irradiance-response curves. *Photosynthetica* 45, 299-302.
- Terashima I, Hanba Y.T., Tazoe Y., Vyas P., Yano S. 2006. Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *Journal Experimental Botany* 57, 343-354.
- Tevini M. 2004. Plant Responses to Ultraviolet Radiation Stress. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherland, Springer. p. 605-621.
- Thiele A., Krause G.H., Winter K. 1998. In situ study of photo-inhibition of photosynthesis and xanthophyll cycle activity in plants growing in natural gaps off the tropical forest. *Australian Journal Plant Physiology* 25, 189-195.
- Toivonen P.M.A., DeEll J.R. 2001. Chlorophyll fluorescence, fermentation product accumulation, and quality of stored broccoli in modified atmosphere packages and subsequent air storage. *Postharvest Biology and Technology* 23, 61-69.
- Tomek P., Lazár D., Ilík P., Naus J. 2001. On the intermediate steps between the O and P steps in chlorophyll *a* fluorescence rise measured at different intensities of exciting light. *Australian Journal Plant Physiology* 28, 1151-1160

- Tóth S.Z., Schansker G., Garab G., Strasser R.J. 2007. Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: the role of internal alternative electron donors to photosystem II. *Biochimica Biophysica Acta* 1767, 295-305.
- Tsimilli-Michael M., Strasser R.J. 2008. Experimental resolution and theoretical complexity determine the amount of information extractable from chlorophyll fluorescence transient OJIP. In: Allen J.F., Gantt E., Golbeck J.H., Osmond B. (Eds.) *Photosynthesis. Energy from the sun*. Dordrecht, The Netherlands, Springer. p. 697-701.
- Tyystjärvi E. 2008. Photoinhibition of Photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chemistry Reviews* 252, 361-376.
- Valentini R., Epron D., De ngelis P., Matteucci G., Dreyer E. 1995. In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Quercus cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant Cell Environment* 20, 25-36.
- Van der Tol C., Verhoef W., Rosema A. 2009. A model for chlorophyll fluorescence and photosynthesis at leaf scale. *Agricultural Forest Meteorology* 149, 96-105.
- Van Heerden F.D.R., Tsimilli-Michael M., Krüger G.H.J., Strasser R.J. 2003. Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO₂ assimilation, chlorophyll *a* fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation. *Physiologia Plantarum* 117, 476-491.
- van Kooten O., Snel J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25, 147-150.
- Vu C.V., Allen D.J., Garrard L.A. 1984. Effects of enhanced UV-B radiation (280 – 320 nanometers) on ribulose 1,5-bisphosphate carboxylation in pea [*Pisum sativum* cultivar Little Marvel] and soybean [*Glycine max* cultivar Bragg]. *Environmental Experimental Botany* 24, 131-144.
- Weng J.H., Lai M.F. 2005. Estimating heat tolerance among plant species by two chlorophyll fluorescence parameters. *Photosynthetica* 43, 439-444.
- Yamane Y., Kashino Y., Koile H., Satoh K. 1997. Increase in the fluorescence *F_o* level reversible inhibition of Photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants. *Photosynthesis Research* 52, 57-64.
- Yamane Y., Shikanai T., Kashino Y., Koike H., Satoh K. 2000. Reduction of QA in the dark: Another cause of fluorescence *F_o* increases by high temperature in higher plants. *Photosynthesis Research* 63, 23-34.
- Zarco-Tejada P.J., Berni J.A.J., Suarez L., Sepulcre-Canto G., Morales F., Miller J.R. 2009. Imaging chlorophyll fluorescence with an airborne narrow band multispectral camera for vegetation stress detection. *Remote Sensing of Environment* 113, 1262-1275
- Živčák M., Brestič M., Olšovská K., Slamka P. 2008. Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant Soil Environment* 54, 133-139.
- Zrimec A., Drinovec L., Berden-Zrimec M. 2005. Influence of chemical and physical factors on longterm delayed fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. *Electromagnetic Biology Medicine* 24, 309-318.

Autori

Filippo Bussotti, Rosanna Desotgiu, Martina Pollastrini

Università degli Studi di Firenze
Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e
dell'Ambiente-DISPAA
Piazzale delle Cascine 28, 50144 Firenze, Italia

Mohamed Hazem Kalaji

Warsaw University of Life Sciences - SGGW
Department of Plant Physiology
Faculty of Agriculture and Biology
Warsaw, Poland

Tadeusz Łoboda

Bialystok University of Technology
Division of Sanitary Biology and Biotechnology
Faculty of Civil and Environmental Engineering
Bialystok, Poland

Karolina Bosa

Warsaw University of Life Sciences - SGGW
Department of Pomology
Faculty of Horticulture and Landscape Architecture
Warsaw, Poland

Per corrispondenza:

Filippo Bussotti

Tel. +39 055 3288269
Fax. +39 055 360137
Email: filippo.bussotti@unifi.it

Filippo Bussotti, Mohamed Hazem Kalaji, Rosanna Desotgiu, Martina Pollastrini, Tadeusz Łoboda, Karolina Bosa, *Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla*, ISBN 978-88-6655-215-4 (print), ISBN 978-88-6655-216-1 (online PDF), ISBN 978-88-6655-217-8 (online ePub), © 2012 Firenze University Press

STRUMENTI
PER LA DIDATTICA E LA RICERCA

1. Brunetto Chiarelli, Renzo Bigazzi, Luca Sineo (a cura di), *Alia: Antropologia di una comunità dell'entroterra siciliano*
2. Vincenzo Cavaliere, Dario Rosini, *Da amministratore a manager. Il dirigente pubblico nella gestione del personale: esperienze a confronto*
3. Carlo Biagini, *Information technology ed automazione del progetto*
4. Cosimo Chiarelli, Walter Pasini (a cura di), *Paolo Mantegazza. Medico, antropologo, viaggiatore*
5. Luca Solari, *Topics in Fluvial and Lagoon Morphodynamics*
6. Salvatore Cesario, Chiara Fredianelli, Alessandro Remorini, *Un pacchetto evidence based di tecniche cognitivo-comportamentali sui generis*
7. Marco Masseti, *Uomini e (non solo) topi. Gli animali domestici e la fauna antropocora*
8. Simone Margherini (a cura di), *BIL Bibliografia Informatizzata Leopardiana 1815-1999: manuale d'uso ver. 1.0*
9. Paolo Puma, *Disegno dell'architettura. Appunti per la didattica*
10. Antonio Calvani (a cura di), *Innovazione tecnologica e cambiamento dell'università. Verso l'università virtuale*
11. Leonardo Casini, Enrico Marone, Silvio Menghini, *La riforma della Politica Agricola Comunitaria e la filiera olivocolo-olearia italiana*
12. Salvatore Cesario, *L'ultima a dover morire è la speranza. Tentativi di narrativa autobiografica e di "autobiografia assistita"*
13. Alessandro Bertirotti, *L'uomo, il suono e la musica*
14. Maria Antonietta Rovida, *Palazzi senesi tra '600 e '700. Modelli abitativi e architettura tra tradizione e innovazione*
15. Simone Guercini, Roberto Piovan, *Schemi di negoziato e tecniche di comunicazione per il tessile e abbigliamento*
16. Antonio Calvani, *Technological innovation and change in the university. Moving towards the Virtual University*
17. Paolo Emilio Pecorella, *Tell Barri/Kahat: la campagna del 2000. Relazione preliminare*
18. Marta Chevanne, *Appunti di Patologia Generale. Corso di laurea in Tecniche di Radiologia Medica per Immagini e Radioterapia*
19. Paolo Ventura, *Città e stazione ferroviaria*
20. Nicola Spinosi, *Critica sociale e individuazione*
21. Roberto Ventura (a cura di), *Dalla misurazione dei servizi alla customer satisfaction*
22. Dimitra Babalis (a cura di), *Ecological Design for an Effective Urban Regeneration*
23. Massimo Papini, Debora Tringali (a cura di), *Il pupazzo di garza. L'esperienza della malattia potenzialmente mortale nei bambini e negli adolescenti*
24. Manlio Marchetta, *La progettazione della città portuale. Sperimentazioni didattiche per una nuova Livorno*
25. Fabrizio F.V. Arrigoni, *Note su progetto e metropoli*
26. Leonardo Casini, Enrico Marone, Silvio Menghini, *OCM seminativi: tendenze evolutive e assetto territoriale*
27. Pecorella Paolo Emilio, Raffaella Pierobon Benoit, *Tell Barri/Kahat: la campagna del 2001. Relazione preliminare*
28. Nicola Spinosi, *Wir Kinder. La questione del potere nelle relazioni adulti/bambini*
29. Stefano Cordero di Montezemolo, *I profili finanziari delle società vinicole*
30. Luca Bagnoli, Maurizio Catalano, *Il bilancio sociale degli enti non profit: esperienze toscane*
31. Elena Rotelli, *Il capitolo della cattedrale di Firenze dalle origini al XV secolo*
32. Leonardo Trisciuzzi, Barbara Sandrucci, Tamara Zappaterra, *Il recupero del sé attraverso l'autobiografia*
33. Nicola Spinosi, *Invito alla psicologia sociale*
34. Raffaele Moschillo, *Laboratorio di disegno. Esercitazioni guidate al disegno di arredo*
35. Niccolò Bellanca, *Le emergenze umanitarie complesse. Un'introduzione*

36. Giovanni Allegretti, *Porto Alegre una biografia territoriale. Ricercando la qualità urbana a partire dal patrimonio sociale*
37. Riccardo Passeri, Leonardo Quagliotti, Christian Simoni, *Procedure concorsuali e governo dell'impresa artigiana in Toscana*
38. Nicola Spinosi, *Un soffitto viola. Psicoterapia, formazione, autobiografia*
39. Tommaso Urso, *Una biblioteca in divenire. La biblioteca della Facoltà di Lettere dalla penna all'elaboratore. Seconda edizione rivista e accresciuta*
40. Paolo Emilio Pecorella, Raffaella Pierobon Benoit, *Tell Barri/Kahat: la campagna del 2002. Relazione preliminare*
41. Antonio Pellicanò, *Da Galileo Galilei a Cosimo Noferi: verso una nuova scienza. Un inedito trattato galileiano di architettura nella Firenze del 1650*
42. Aldo Burresi (a cura di), *Il marketing della moda. Temi emergenti nel tessile-abbigliamento*
43. Curzio Cipriani, *Appunti di museologia naturalistica*
44. Fabrizio F.V. Arrigoni, *Incipit. Esercizi di composizione architettonica*
45. Roberta Gentile, Stefano Mancuso, Silvia Martelli, Simona Rizzitelli, *Il Giardino di Villa Corsini a Mezzomonte. Descrizione dello stato di fatto e proposta di restauro conservativo*
46. Arnaldo Nesti, Alba Scarpellini (a cura di), *Mondo democristiano, mondo cattolico nel secondo Novecento italiano*
47. Stefano Alessandri, *Sintesi e discussioni su temi di chimica generale*
48. Gianni Galeota (a cura di), *Traslocare, riaggregare, rifondare. Il caso della Biblioteca di Scienze Sociali dell'Università di Firenze*
49. Gianni Cavallina, *Nuove città antichi segni. Tre esperienze didattiche*
50. Bruno Zanoni, *Tecnologia alimentare 1. La classe delle operazioni unitarie di disidratazione per la conservazione dei prodotti alimentari*
51. Gianfranco Martiello, *La tutela penale del capitale sociale nelle società per azioni*
52. Salvatore Cingari (a cura di), *Cultura democratica e istituzioni rappresentative. Due esempi a confronto: Italia e Romania*
53. Laura Leonardi (a cura di), *Il distretto delle donne*
54. Cristina Delogu (a cura di), *Tecnologia per il web learning. Realtà e scenari*
55. Luca Bagnoli (a cura di), *La lettura dei bilanci delle Organizzazioni di Volontariato toscane nel biennio 2004-2005*
56. Lorenzo Grifone Baglioni (a cura di), *Una generazione che cambia. Civismo, solidarietà e nuove incertezze dei giovani della provincia di Firenze*
57. Monica Bolognesi, Laura Donati, Gabriella Granatiero, *Acque e territorio. Progetti e regole per la qualità dell'abitare*
58. Carlo Natali, Daniela Poli (a cura di), *Città e territori da vivere oggi e domani. Il contributo scientifico delle tesi di laurea*
59. Riccardo Passeri, *Valutazioni imprenditoriali per la successione nell'impresa familiare*
60. Brunetto Chiarelli, Alberto Simonetta, *Storia dei musei naturalistici fiorentini*
61. Gianfranco Bettin Lattes, Marco Bontempi (a cura di), *Generazione Erasmus? L'identità europea tra vissuto e istituzioni*
62. Paolo Emilio Pecorella, Raffaella Pierobon Benoit, *Tell Barri / Kahat. La campagna del 2003*
63. Fabrizio F.V. Arrigoni, *Il cervello delle passioni. Dieci tesi di Adolfo Natalini*
64. Saverio Pisaniello, *Esistenza minima. Stanze, spazi della mente, reliquiario*
65. Maria Antonietta Rovida (a cura di), *Fonti per la storia dell'architettura, della città, del territorio*
66. Ornella De Zordo, *Saggi di anglistica e americanistica. Temi e prospettive di ricerca*
67. Chiara Favilli, Maria Paola Monaco, *Materiali per lo studio del diritto antidiscriminatorio*
68. Paolo Emilio Pecorella, Raffaella Pierobon Benoit, *Tell Barri / Kahat. La campagna del 2004*
69. Emanuela Caldognetto Magno, Federica Cavicchio, *Aspetti emotivi e relazionali nell'e-learning*
70. Marco Masseti, *Uomini e (non solo) topi (2ª edizione)*
71. Giovanni Nerli, Marco Pierini, *Costruzione di macchine*
72. Lorenzo Viviani, *L'Europa dei partiti. Per una sociologia dei partiti politici nel processo di integrazione europea*
73. Teresa Crespellani, *Terremoto e ricerca. Un percorso scientifico condiviso per la caratterizzazione del comportamento sismico di alcuni depositi italiani*

74. Fabrizio F.V. Arrigoni, *Cava. Architettura in "ars marmoris"*
75. Ernesto Tavoletti, *Higher Education and Local Economic Development*
76. Carmelo Calabrò, *Liberalismo, democrazia, socialismo. L'itinerario di Carlo Rosselli (1917-1930)*
77. Luca Bagnoli, Massimo Cini (a cura di), *La cooperazione sociale nell'area metropolitana fiorentina. Una lettura dei bilanci d'esercizio delle cooperative sociali di Firenze, Pistoia e Prato nel quadriennio 2004-2007*
78. Lamberto Ippolito, *La villa del Novecento*
79. Cosimo Di Bari, *A passo di critica. Il modello di Media Education nell'opera di Umberto Eco*
80. Leonardo Chiesi (a cura di), *Identità sociale e territorio. Il Montalbano*
81. Piero Degl'Innocenti, *Cinquant'anni, cento chiese. L'edilizia di culto nelle diocesi di Firenze, Prato e Fiesole (1946-2000)*
82. Giancarlo Paba, Anna Lisa Pecoriello, Camilla Perrone, Francesca Rispoli, *Partecipazione in Toscana: interpretazioni e racconti*
83. Alberto Magnaghi, Sara Giacomozzi (a cura di), *Un fiume per il territorio. Indirizzi progettuali per il parco fluviale del Valdarno empoese*
84. Dino Costantini (a cura di), *Multiculturalismo alla francese?*
85. Alessandro Viviani (a cura di), *Firms and System Competitiveness in Italy*
86. Paolo Fabiani, *The Philosophy of the Imagination in Vico and Malebranche*
87. Carmelo Calabrò, *Liberalismo, democrazia, socialismo. L'itinerario di Carlo Rosselli*
88. David Fanfani (a cura di), *Pianificare tra città e campagna. Scenari, attori e progetti di nuova ruralità per il territorio di Prato*
89. Massimo Papini (a cura di), *L'ultima cura. I vissuti degli operatori in due reparti di oncologia pediatrica*
90. Raffaella Cerica, *Cultura Organizzativa e Performance economico-finanziarie*
91. Alessandra Lorini, Duccio Basosi (a cura di), *Cuba in the World, the World in Cuba*
92. Marco Goldoni, *La dottrina costituzionale di Sieyès*
93. Francesca Di Donato, *La scienza e la rete. L'uso pubblico della ragione nell'età del Web*
94. Serena Vicari Haddock, Marianna D'Ovidio, *Brand-building: the creative city. A critical look at current concepts and practices*
95. Ornella De Zordo (a cura di), *Saggi di Anglistica e Americanistica. Ricerche in corso*
96. Massimo Moneglia, Alessandro Panunzi (edited by), *Bootstrapping Information from Corpora in a Cross-Linguistic Perspective*
97. Alessandro Panunzi, *La variazione semantica del verbo essere nell'Italiano parlato*
98. Matteo Gerlini, *Sansone e la Guerra fredda. La capacità nucleare israeliana fra le due superpotenze (1953-1963)*
99. Luca Raffini, *La democrazia in mutamento: dallo Stato-nazione all'Europa*
100. Gianfranco Bandini (a cura di), *noi-loro. Storia e attualità della relazione educativa fra adulti e bambini*
101. Anna Taglioli, *Il mondo degli altri. Territori e orizzonti sociologici del cosmopolitismo*
102. Gianni Angelucci, Luisa Vierucci (a cura di), *Il diritto internazionale umanitario e la guerra aerea. Scritti scelti*
103. Giulia Mascagni, *Salute e disuguaglianze in Europa*
104. Elisabetta Cioni, Alberto Marinelli (a cura di), *Le reti della comunicazione politica. Tra televisioni e social network*
105. Cosimo Chiarelli, Walter Pasini (a cura di), *Paolo Mantegazza e l'Evoluzionismo in Italia*
106. Andrea Simoncini (a cura di), *La semplificazione in Toscana. La legge n. 40 del 2009*
107. Claudio Borri, Claudio Mannini (edited by), *Aeroelastic phenomena and pedestrian-structure dynamic interaction on non-conventional bridges and footbridges*
108. Emiliano Scampoli, *Firenze, archeologia di una città (secoli I a.C. - XIII d.C.)*
109. Emanuela Cresti, Iørn Korzen (a cura di), *Language, Cognition and Identity. Extensions of the endocentric/exocentric language typology*
110. Alberto Parola, Maria Ranieri, *Media Education in Action. A Research Study in Six European Countries*
111. Lorenzo Grifone Baglioni (a cura di), *Scegliere di partecipare. L'impegno dei*

- giovani della provincia di Firenze nelle arene deliberative e nei partiti*
112. Alfonso Lagi, Ranuccio Nuti, Stefano Taddei, *Raccontaci l'ipertensione. Indagine a distanza in Toscana*
 113. Lorenzo De Sio, *I partiti cambiano, i valori restano? Una ricerca quantitativa e qualitativa sulla cultura politica in Toscana*
 114. Anna Romiti, *Coreografie di stakeholders nel management del turismo sportivo*
 115. Guidi Vannini (a cura di), *Archeologia Pubblica in Toscana: un progetto e una proposta*
 116. Lucia Varra (a cura di), *Le case per ferie: valori, funzioni e processi per un servizio differenziato e di qualità*
 117. Gianfranco Bandini (a cura di), *Manuali, sussidi e didattica della geografia. Una prospettiva storica*
 118. Anna Margherita Jasink, Grazia Tucci e Luca Bombardieri (a cura di), *MUSINT. Le Collezioni archeologiche egee e cipriote in Toscana. Ricerche ed esperienze di museologia interattiva*
 119. Ilaria Caloi, *Modernità Minoica. L'Arte Egea e l'Art Nouveau: il Caso di Mariano Fortuny y Madrazo*
 120. Heliana Mello, Alessandro Panunzi, Tommaso Raso (edited by), *Pragmatics and Prosody. Illocution, Modality, Attitude, Information Patterning and Speech Annotation*
 121. Luciana Lazzeretti, *Cluster creativi per i beni culturali. L'esperienza toscana delle tecnologie per la conservazione e la valorizzazione*
 122. Maurizio De Vita (a cura di / edited by), *Città storica e sostenibilità / Historic Cities and Sustainability*
 123. Eleonora Berti, *Itinerari culturali del consiglio d'Europa tra ricerca di identità e progetto di paesaggio*
 124. Stefano Di Blasi (a cura di), *La ricerca applicata ai vini di qualità*
 125. Lorenzo Cini, *Società civile e democrazia radicale*
 126. Francesco Ciampi, *La consulenza direzionale: interpretazione scientifica in chiave cognitiva*
 127. Lucia Varra (a cura di), *Dal dato diffuso alla conoscenza condivisa. Competitività e sostenibilità di Abetone nel progetto dell'Osservatorio Turistico di Destinazione*
 128. Riccardo Roni, *Il lavoro della ragione. Dimensioni del soggetto nella Fenomenologia dello spirito di Hegel*
 129. Vanna Boffo (a cura di), *A Glance at Work. Educational Perspectives*
 130. Raffaele Donvito, *L'innovazione nei servizi: i percorsi di innovazione nel re-tailing basati sul vertical branding*
 131. Dino Costantini, *La democrazia dei moderni. Storia di una crisi*
 132. Thomas Casadei, *I diritti sociali. Un percorso filosofico-giuridico*
 133. Maurizio De Vita, *Verso il restauro. Temi, tesi, progetti per la conservazione*
 134. Laura Leonardi, *La società europea in costruzione. Sfide e tendenze nella sociologia contemporanea*
 135. Antonio Capestro, *Oggi la città. Riflessione sui fenomeni di trasformazione urbana*
 136. Antonio Capestro, *Progettando città. Riflessioni sul metodo della Progettazione Urbana*
 137. Filippo Bussotti, Mohamed Hazem Kalaji, Rosanna Desotgiu, Martina Pollastrini, Tadeusz Łoboda, Karolina Bosa, *Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla*

