

STIMA DELLA FLUORESCENZA PASSIVA PER LA VALUTAZIONE DEL DANNO DA OZONO SULLA VEGETAZIONE

Sergio COGLIATI^(*), Michele MERONI^(*), Micol ROSSINI^(*), Valentina PICCHI^(**), Cinzia PANIGADA^(*), Roberto COLOMBO^(*)

^(*)Lab. Telerilevamento delle Dinamiche Ambientali, DISAT, Università Milano-Bicocca, Milano, Italia

^(**)Istituto di Patologia Vegetale, Università di Milano e Istituto di Virologia Vegetale, Milano, Italia

Riassunto

In questo contributo sono presentati i risultati ottenuti a seguito di un esperimento condotto al fine di valutare la possibilità di detezione remota del danno da ozono sulla vegetazione nella fase pre-sintomatica, tramite misure spettroradiometriche a distanza e ad elevata risoluzione spettrale.

E' stato realizzato un esperimento in camere di fumigazione (esposizione cronica) in cui sono stati acquisiti dati relativi alle proprietà ottiche a livello di *canopy*, misure del contenuto di pigmenti fotosintetici, fluorescenza attiva, assimilazione e conduttanza stomatica.

I risultati ottenuti mostrano che gli indici ottici tradizionali del telerilevamento (e.g. NDVI) non si prestano ad essere impiegati come indicatori precoci del danno da O₃. Al contrario, la ricerca ha evidenziato che tecniche innovative legate a processi fisiologici quali attivazione di meccanismi di fotoprotezione e dissipazione dell'energia in eccesso attraverso la fluorescenza identificano il danno prima della comparsa dei sintomi visibili. L'impiego di un indice ottico a banda stretta (PRI) legato al ciclo delle xantofille e la risposta in fluorescenza indotta dal sole sono risultati utili indicatori precoci.

Abstract

This paper shows the results obtained from an experiment, aimed to evaluate the possibility to remotely detect the ozone damage in vegetation by using new high spectral resolution spectroradiometer with a full width at half maximum of 0.06 nm. An experiment at *canopy* level was designed and realised in fumigation chambers, in order to collect optical data in parallel to meteorological and key physiological variables (active fluorescence, net photosynthesis). Results show that traditional remote sensing indices (e.g. NDVI) are not fully suitable for the early detection of ozone damages of vegetation. On the contrary, two novel developments in passive optical remote sensing that quantify the physiological processes related to the de-epoxidation state of the xanthophylls cycle pigments and the solar induced chlorophyll fluorescence have demonstrated useful for early detection purposes. Specifically, in a framework of a stress-induction ozone experiment we have developed a method to detect and quantify the sun-induced fluorescence that can be monitored with field spectroscopy techniques and then exploited for plant physiological status. Measurements of spectral radiance emerging from leaf and *canopy* provide a fast, non-destructive method for the assessment of excess energy dissipation.

Introduzione

Il telerilevamento ottico consente la misura a distanza delle proprietà ottiche della vegetazione, le quali variano in funzione delle caratteristiche biofisiche e dello stato fisiologico. In presenza di fattori di stress la vegetazione risponde mediante variazioni nelle caratteristiche biochimiche (concentrazione fogliare di pigmenti fotosintetici), strutturali (indice di area fogliare) e nei processi

fisiologici (efficienza fotosintetica). Questo, a sua volta, comporta variazioni significative nelle proprietà ottiche della vegetazione (riflettanza e trasmittanza spettrale) che possono essere monitorate tramite osservazioni remote. Esistono poche applicazioni di spettroscopia in riflettanza per lo studio dello stress da ozono. In generale, questi studi sono stati affrontati per individuare i danni a partire da appropriati indici ottici legati a variabili biochimiche fogliari (Carter, 1993, 1994, Penuelas et al., 1995, Kraft et al., 1996). Il monitoraggio di variabili fisiologiche relazionate alle vie dissipative dell'energia (fluorescenza e dissipazione di calore) non è stato invece, fino ad ora, utilizzato in relazione allo stress da ozono.

Gli obiettivi della ricerca sono stati quelli di valutare la possibilità di individuazione degli effetti dell'ozono sulla vegetazione nella fase pre-sintomatica, tramite misure spettroradiometriche a distanza e ad elevata risoluzione spettrale. In particolare, i tradizionali indici ottici sono stati confrontati con nuovi indicatori remoti ottenuti analizzando le vie di dissipazione dell'energia assorbita. Le vie dissipative sono state analizzate misurando la risposta in fluorescenza indotta dal sole e il grado di depossidazione delle xantofille in risposta a diverse concentrazioni di ozono. In questo contesto è stato anche messo a punto un innovativo sistema spettroradiometrico per l'acquisizione a distanza delle proprietà ottiche e della fluorescenza della clorofilla naturalmente indotta dal sole. In questo contributo vengono presentati i risultati ottenuti a seguito di un esperimento controllato in camere di fumigazione, eseguendo sia misure di telerilevamento sia misure fisiologiche su campioni trattati e su campioni di controllo (non fumigati) al fine di valutare se le misure di telerilevamento riescono a differenziare in maniera statisticamente significativa il campione trattato, tanto precocemente quanto le misure fisiologiche.

Metodi

Piante utilizzate ed esposizione all'ozono

Per ottenere misure radiometriche di campo di una *canopy* reale ma allo stesso tempo permettere le operazioni pratiche di fumigazione si è scelto di utilizzare una specie vegetale di dimensioni ridotte che potesse, in vasi di dimensioni contenute, formare una *canopy* sufficientemente densa. Tali caratteristiche sono soddisfatte dal *Trifolium repens* L. cv. Regal, una specie nota per la sensibilità all'ozono e diffusamente utilizzata per il bio-monitoraggio. L'esposizione all'inquinante è stata effettuata in ambiente controllato (Nali et al., 2005). Le fumigazioni con O₃ sono state condotte per 3 settimane (5 ore al dì) a 100 ppb O₃ (per O₃, 1 ppb = 1.96 µg m⁻³, a 20 °C e 101.325 kPa). Le piante utilizzate come controllo sono state mantenute nelle stesse condizioni, ad esclusione del trattamento con l'inquinante.

Disegno sperimentale

Un totale di 6 vasi con *canopy* omogenee è stato preparato per l'esecuzione dell'esperimento. Tre coppie controllo/trattamento sono state formate in modo casuale.

Le misure spettrali sono state effettuate su una *canopy* (un vaso) per tesi (prima coppia) utilizzando la fibra ottica nuda come ottica (*field of view* = 25°) posizionata al centro del vaso (di diametro 35 cm), nadiralmente (angolo di vista zenitale = 0°), ad una altezza di 30 cm sul piano medio della *canopy*. Questa geometria di ripresa permette di osservare un'area circolare della *canopy* di 14 cm di diametro.

La valutazione visiva dei danni da ozono è stata effettuata giornalmente sugli stessi vasi. La seconda coppia controllo/trattamento è stata utilizzata per le misure di fluorescenza attiva utilizzando il PAM-2000. La terza coppia è stata infine destinata alla stima dell'assimilazione attraverso misure di scambi gassosi (CIRAS PP-System). In conseguenza, durante i cicli di misura diurni, le misure spettrali, di fluorescenza attiva e di scambi gassosi, venivano effettuate contemporaneamente su vasi diversi.

Sono stati effettuati sei giorni di misure intensive: giorno 0 (prima dell'inizio della fumigazione, che è iniziata il giorno 1), giorni 1, 2, 3, 4 e 21. Durante questi giorni, sono stati acquisiti cicli diurni di misure all'esterno in condizioni di illuminazione solare naturale: radiometria, scambi gassosi e

fluorescenza attiva. Prima dell'alba sono state inoltre acquisite misure di assimilazione massima e fluorescenza attiva. Le misure sono state effettuate in condizioni di cielo sereno. Sono stati inoltre registrati in continuo i cicli diurni delle variabili meteorologiche: temperatura dell'aria, umidità relativa, radiazione incidente totale e diffusa.

Dati fisiologici

Le misure di fluorescenza attiva sono state effettuate con un fluorimetro modulare PAM-2000. Sono stati misurati l'efficienza fotochimica massima (F_v/F_m) dei campioni adattati al buio, il *quenching* non fotochimico (NPQ) e l'efficienza della fluorescenza (F_t). Gli scambi gassosi fogliari (assimilazione in condizioni di illuminazione naturale, A) sono stati misurati con un analizzatore portatile di gas all'infrarosso CIRAS-1, munito di una cuvetta Parkinson.

Dati spettrali

L'utilizzo di uno spettrometro ad altissima risoluzione spettrale ha consentito di misurare la fluorescenza passiva (F_s) in corrispondenza delle due linee di Fraunhofer (760 e 687 nm) e di calcolare un indice di efficienza della fluorescenza, la fluorescenza normalizzata NFs (Meroni e Colombo, 2006). I dati acquisiti con ASD FS HH Pro sono stati invece utilizzati per calcolare indici ottici tradizionali relazionati al contenuto di pigmenti fotosintetici e indici più sofisticati, quali l'indice PRI (*Photochemical Reflectance Index*, Gamon et al., 1992), relazionato all'attività fotosintetica della foglia e indici tradizionali, quali NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*, Rouse, Haas, 1973) e NDI (*Normalized Difference Index*, Gitelson, Merzlyak, 1994, Gamon, Surfus, 1999).

Risultati

In Figura 1 sono riportati gli andamenti temporali relativi a tutta la durata dell'esperimento dei principali parametri misurati a massimo carico solare (a mezzogiorno): assimilazione netta fogliare, NFs@760, fluorescenza indotta dal sole normalizzata e misurata a 760 nm e NDVI, indice ottico tradizionale basato sulla transizione rosso- IR vicino.

I valori a mezzogiorno estratti dal ciclo di misure del giorno 0 (prima dell'inizio della fumigazione) non mostrano differenze significative nei parametri fisiologici e in quelli radiometrici. Questa informazione conferma che, come atteso, i campioni assegnati ai diversi trattamenti si presentavano in uno stato di vigore simile prima della fumigazione con ozono.

Dopo l'inizio della fumigazione (avvenuta prima del ciclo di misure del giorno 1) si è proceduto alla raccolta di cicli giornalieri per quattro giorni consecutivi al fine di investigare la possibilità di fornire un indicatore precoce (pre-sintomatico) attraverso le misure remote. I risultati ottenuti mostrano come alcuni parametri radiometrici siano in grado di identificare una differenza tra le tesi non solo in assenza di sintomi visivi ma anche prima delle misure ecofisiologiche classiche (assimilazione e fluorescenza attiva). Infatti le misure di scambi gassosi rilevano una diminuzione dell'assimilazione per i campioni trattati il giorno 2. Tale differenza rispetto ai controlli risulta più netta il giorno 3 ed aumenta poi nel corso dell'esperimento. Le misure radiometriche tradizionali mostrano sensibilità al trattamento solo l'ultimo giorno di misura (giorno 21).

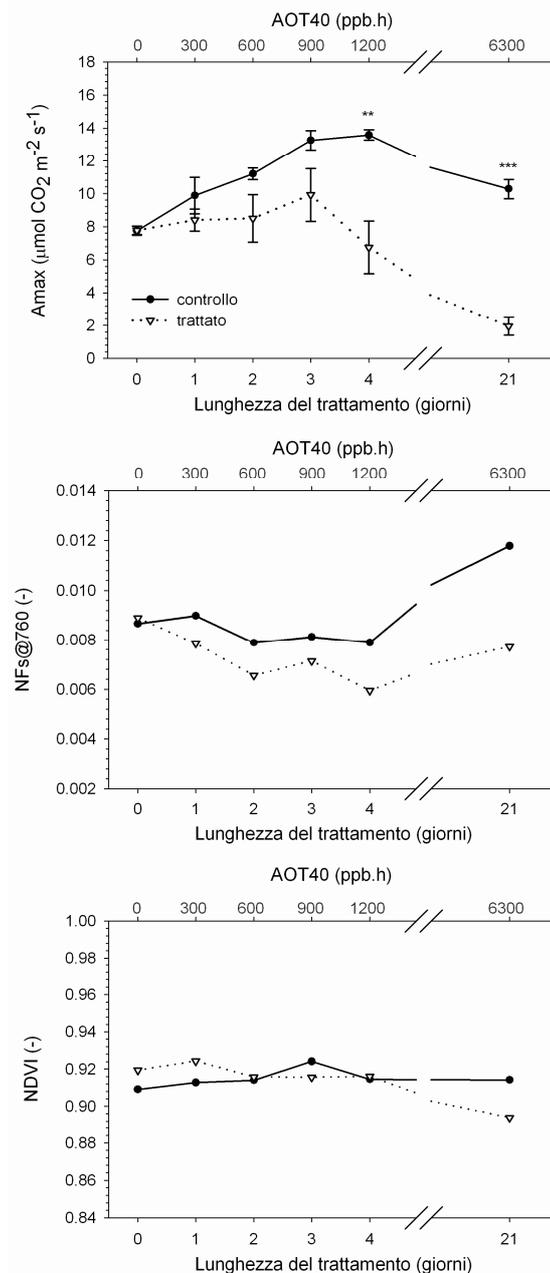


Figura 1 - Andamento dei principali parametri misurati nei 21 giorni di esperimento (i valori riportati sono le misure effettuate a mezzogiorno solare). Punti pieni e vuoti si riferiscono ai campioni controllo e trattato, rispettivamente

Nonostante la scarsa sensibilità è interessante notare come tali indici siano comunque in grado di indicare, anche se tardivamente, una differenza tra le tesi anche in assenza di una differenza di biomassa.

Gli indici ottici innovativi testati in questo studio forniscono invece un'indicazione precoce di differenziazione tra le tesi. In accordo ad un modello interpretativo del dato che prevede una risposta veloce della fluorescenza naturale e una risposta più lenta della reversione delle xantofille (Meroni et al., 2007), F_s dei trattati diminuisce già dal primo giorno mentre l'indice sensibile alla dissipazione in calore risponde il giorno 3. La fluorescenza passiva, mostrando una differenza già al primo giorno di fumigazione, risulta quindi essere l'indicatore più precoce del trattamento di fumigazione in atto.

Conclusioni

In questo studio è stata valutata la possibilità di detezione remota del danno da ozono sulla vegetazione nella fase pre-sintomatica, tramite misure spettroradiometriche a distanza e ad elevata risoluzione spettrale. Questa ricerca ha previsto pertanto l'analisi delle proprietà ottiche della vegetazione in presenza di diverse dosi di ozono allo scopo di individuare nuovi indicatori quantitativi per l'individuazione precoce dello stress da ozono sulla vegetazione agricola e forestale. Misure di variabili fisiologiche e biochimiche, quali scambi gassosi e fluorescenza della clorofilla, sono state confrontate con misure spettrali acquisite durante un esperimento condotto in camere di fumigazione. L'esperimento è stato condotto a livello di *canopy*, eseguendo misure su campioni trattati e su campioni di controllo.

I risultati ottenuti nell'esperimento di fumigazione mostrano che i parametri biochimici e gli indici ottici tradizionali del telerilevamento si prestano solo parzialmente ad essere impiegati come indicatori del danno da O₃ in quanto non riescono ad evidenziarlo in maniera precoce. Al contrario, la ricerca ha evidenziato che l'impiego di tecniche innovative legate a processi fisiologici quali attivazione di meccanismi di fotoprotezione e dissipazione dell'energia in eccesso attraverso la fluorescenza identificano il danno da ozono prima della comparsa dei sintomi. L'impiego di un indice ottico a banda stretta legato al ciclo delle xantofille e all'attivazione di meccanismi di fotoprotezione e la risposta in fluorescenza indotta dal sole (misurata in maniera passiva e remota) sono invece risultati utili indicatori precoci. I risultati mostrano quindi che questi parametri radiometrici sono in grado di identificare una differenza tra le tesi non solo in assenza di sintomi visivi ma anche prima delle misure ecofisiologiche classiche (assimilazione e fluorescenza attiva).

Ringraziamenti

Questo studio è stato condotto nell'ambito del Progetto INFOGESO (Influenza dell'ozono sulla gestione sostenibile del sistema agricolo e forestale lombardo) promosso da ERSAF e Regione Lombardia. Gli autori desiderano ringraziare C. Nali e G. Lorenzini del Dipartimento di Patologia Vegetale "G. Scaramuzzi" dell'Università di Pisa per il reperimento del materiale vegetale, l'organizzazione logistica e la fumigazione negli esperimenti.

Bibliografia

- Carter GA. (1993), "Responses of Leaf Spectral Reflectance to Plant Stress", *American Journal of Botany*, 80:239-243.
- Carter GA. (1994), "Ratios of Leaf Reflectances in Narrow Wavebands as Indicators of Plant Stress", *International Journal of Remote Sensing*, 15:697-703.
- Gamon JA, Penuelas J, Field CB. (1992), "A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency", *Remote Sensing of Environment*, 41:35-44.
- Gamon JA, Surfus JS. (1999), "Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer", *New Phytologist*, 143:105-117.
- Gitelson AA, Merzlyak MN. (1994), "Spectral reflectance changes associated with autumn senescence of *Aesculus-Hippocastanum* L and *Acer-Platanoides* L leaves - spectral features and relation to chlorophyll estimation", *Journal of Plant Physiology*, 143:286-292.
- Kraft M, Weigel HJ, Mejer GJ, Brandes F (1996), „Reflectance measurements of leaves for detecting visible and non-visible ozone damage to crops", *Journal of Plant Physiology*, 148:148-154.
- 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.
- Meroni M, Picchi V, Rossini M, Cogliati S, Panigada C, Nali C, Lorenzini G, Colombo R. (2007), "Leaf level early assessment of ozone injuries by passive fluorescence and PRI", *International Journal of Remote Sensing*, (in print).

Nali C, Pucciariello C, Mills G, Lorenzini G. (2005), “On the different sensitivity of white clover clones to ozone: Physiological and biochemical parameters in a multivariate approach”, *Water Air and Soil Pollution*, 164:137-153.

Penuelas J, Filella I, Elvira S, Inclan R. (1995), “Reflectance assessment of summer ozone fumigated Mediterranean white pine seedlings”, *Environmental and Experimental Botany*, 35:299-307.

Rouse JW, Haas RH. (1973), “Monitoring vegetation systems in the great plain with ERTS”, *Third ERTS Symposium*, vol. 1 (309-317). Washington, DC: NASA.