Metode određivanja koncentracije klorofila u listovima biljaka

Škarica, Tomislav

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Forestry / Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:617177

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

ŠUMARSKI FAKULTET

ZAVOD ZA ŠUMARSKU GENETIKU, DENDROLOGIJU I BOTANIKU

PREDDIPLOMSKI STUDIJ

URBANO ŠUMARSTVO, ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

TOMISLAV ŠKARICA

METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE KLOROFILA U LISTOVIMA BILJAKA

ZAVRŠNI RAD

ZAGREB, (RUJAN, 2017.)

Zavod:	Zavod za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku
Predmet:	Fiziologija bilja
Mentor:	Izv. prof. dr. sc. Željko Škvorc
Asistent – znanstveni novak:	Dr. sc. Krunoslav Sever
Studentica:	Tomislav Škarica
JMBAG:	0068222636
Akad. godina:	2016/2017
Mjesto, datum obrane:	
Sadržaj rada:	Slika: 9 Tablica: 0 Literatura: 9
Sažetak:	Koncentracija klorofila u lišću biljaka često puta ukazuje na njihovu vitalnost. Štoviše, prvi simptomi abiotskog stresa se očituju u opadanju koncentracije klorofila u listu. Postoji čitav niz metoda pomoću kojih je moguće odrediti koncentraciju i količinu klorofila u listu. U ovom radu bit će predstavljene metode za određivanje koncentracije klorofila u listu biljke.

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

2. OBRADA TEME

2.1. Uvod u mjerenje razine klorofila **5**

2.2. Direktna (laboratorijska) metoda **6**

2.3. Optičko mjerenje razine klorofila **6**

2.3.1. SPAD-502 klorofilmetar **6**

2.3.2. CCM-200 klorofilmetar **7**

2.4. Eksperimenti sa optičkim mjeračima i rezultati **8**

2.5. Regresijske (kalibracijske) jednadžbe **12**

3. ZAKLJUČAK **13**

4. LITERATURA **13**

5. PRILOZI **14**

1. UVOD

Obzirom na mogućnost stvaranja vlastitih organskih tvari, razlikujemo autotrofne i heterotrofne organizme. Autotrofni organizmi su oni koji pomoću energije izvana stvaraju vlastite organske spojeve. U tom smislu razlikujemo fotoautotrofne i kemoautotrofne organizme. Fotoautrotrofnima smatramo one organizme koji pomoću sunčeve energije u procesu fotosinteze stvaraju organske tvari, dok su kemoautotrofni oni organizmi koji pomoću energije dobivene iz oksidacije anorganskih tvari putem kemosinteze stvaraju vlastite organske spojeve (Dubravec i Regula 1995).

Organizmi koji nemaju sposobnost stvaranja vlastitih organskih spojeva nego moraju koristit tuđe, već gotove organske spojeve, nazivamo heterotrofnima. Egzistencija svih heterotrofnih organizama ovisi o tvarima autotrofnih organizama od kojih dobivaju energiju i ishodište spojeva za vlastite biosinteze. Kako se glavnina organskih tvari na Zemlji stvara fotosintezom, ona je proces od osnovne važnosti za život na ovom planetu, jer biljke posredno ili neposredno služe kao izvor hrane i energije za većinu ostalih organizama (Dubravec i Regula 1995).

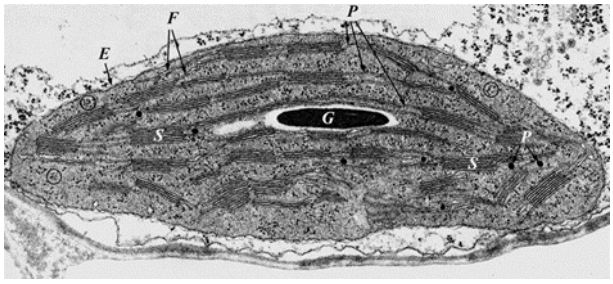
Fotosinteza je proces u kojem se pomoću sunčeve energije i vode ugljik (IV) oksid iz zraka ugrađuje u organske spojeve uz oslobađanje kisika. To je proces transformiranja absorbirane sunčeve energije u energiju kemijskih veza metastabilnih organskih spojeva. Osim u biljkama, fotosinteza se obavlja i u nekim bakterijama i algama, dakle organizmima koji u svojim stanicama imaju klorofil - zeleni pigment koji služi za apsorbiranje sunčeve svjetlosti, i obično su zelene boje (Dubravec i Regula 1995).

U ovom seminarskom radu bit će riječ o građi klorofila, njegovoj funkciji i važnosti razine klorofila u listu biljke, no prije toga treba posvetiti nekoliko redaka samoj građi biljne stanice.

Svim biljnim stanicama eukariota osnovni su dijelovi: jezgra, plastidi, mitohondriji, ribosomi, endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat (diktiosomi), sferosomi, translosomi, lizosomi, glioksisomi, peroksisomi, protoplazma, vakuola i stanična stijenka (Dubravec i Regula 1995).

Plastidi su tipični biljni organeli kojih nema u prokariota (bakterije, modrozelene alge, heterotrofne gljive i životinje). U stanici možemo, na osnovi njihove životne aktivnosti i

sadržaju pigmenata razlikovati tri vrste plastida: leukoplaste, kloroplaste i kromoplaste. Svi tipovi plastida imaju dvoslojnu membranu, tubularnu ili lamelarnu strukturu i uvijek se nalaze u citoplazmi.



Slika 1. Plastidi (izvor: http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=48619)

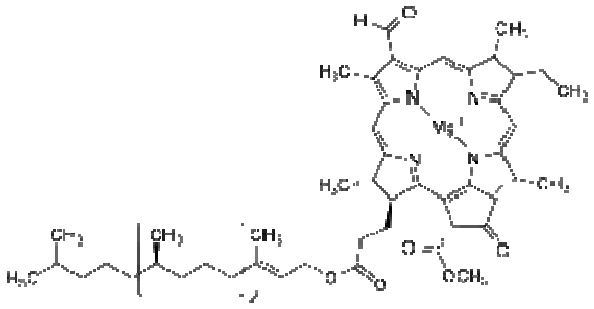
Od triju plastida u stanici, u procesu fotosinteze najvažniji je kloroplast. Kloroplasti imaju izvanredno složen i visoko organiziran lamelarni sustav koji ispunjava njihovu čitavu unutrašnjost.

Fotosintetski pigmenti smješteni su u grana i stroma tilakoidama kloroplasta (grč. *thylakos* = vrećica). Grana tilakoidi imaju oblik spljoštenih vrećica koje su u pojedinim djelovima kloroplasta skupljene u tzv. *grana*. Dulje tilakoide koje prolaze kroz stromu i povezuju susjedne grane nazivamo stroma tilakoidama. Unutar svake tilakoide nalazi se tilakoidni prostor koji je odvojen od strome. Kloroplast ima tri različite membrane ili opne: vanjsku, unutrašnju i tilakoidnu, i tri zasebna prostora: međumembranski, stromni i tilakoidni. U tilakoidnim membranama smješteni su klorofili a i b, karoten i ksantofil lutein, biljni pigmenti koji absorbiraju sunčevu svjetlost (Dubravec i Regula 1995).

Građa klorofila:

Molekula klorofila izgrađena je iz četiri pirolova prstena povezana u porfirinski prsten. Odsječci konjugiranih dvostrukih veza u prstenu odgovorni su za apsorpciju vidljive svjetlosti i boju molekule. U tvorbi dvorstrukih veza sudjeluju tzv.elektroni koji se apsorpcijom svjetlosne energije lako pobuđuju. U centru porfirinskog prstena nalazi se dvovalentni atom magnezija povezan s dušikovim atomima pirolovih prstena. Porfirinski prsten tvori različite funkcionalne skupine kao što je vinilna skupina na prvom pirolovu prstenu, metilna skupina na drugom kod klorofila a, dok se u slučaju klorofila b na tom mjestu nalazi aldehidna skupina. Na porfirinskom prstenu nalazimo još metilne i etilnu skupinu. Na propionsku kiselinu IV – pirolovog prstena esterski je vezan alkohol fitol. On

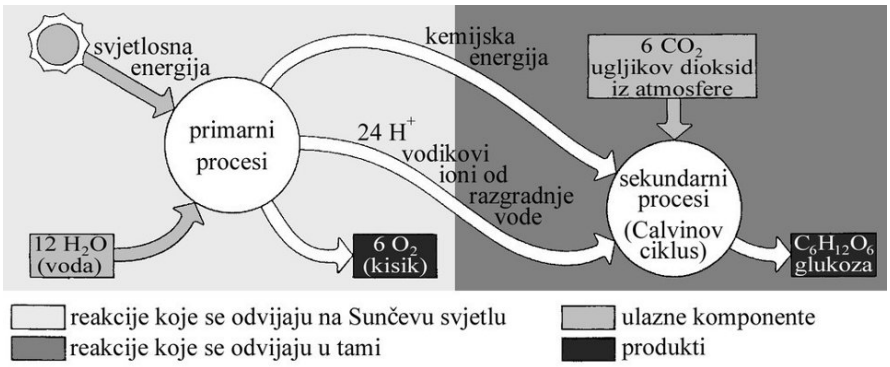
znantno doprinosi lipofilnim svojstvima molekule klorofila. Gotovo sva apsorpcija svjetlosti obavi se u pigmentima kloroplasta. Klorofili jako apsorbiraju ljubičastu i crvenu svjetlost dok zelenu i žuto-zelenu slabo. Posljedica toga je zelena boja klorofila, a s time povezano i zelena boja listova biljaka. Osobito je značajan klorofil a kojemu pripada središnja uloga pri fotosintetskom transportu elektrona (Dubravec i Regula 1995).



Slika 2. Molekula klorofila (izvor: https://eucbeniki.sio.si/kemija2/1665/index7.html)

Proces fotosinteze može se podijeliti na primarne procese, za koje je nužna Sunčeva svjetlost, a odvijaju se u tilakoidnim membranama kloroplasta (plastidima), te sekundarne procese, tzv. Calvinov ciklus, za koji svjetlost nije tako nužna, a odvija se u stromi kloroplasta. Primarni procesi obuhvaćaju dvije uzastopne, usklađene, serijski povezane fotokemijske reakcije. Svaka je vezana na svoj reakcijski sustav, tzv. fotosustav I (P700) i fotosustav II (P680). Svaki fotosustav ima svoj specifični klorofil a, s određenom valnom duljinom apsorpcije. Fotokemijske reakcije počinju apsorpcijom fotona ili kvanata svjetlosti na fotosustavu I, iz čijega se klorofila izbijaju dva elektrona koji se, tako obogaćeni energijom, prenose enzimima do oksidiranoga koenzima NADP+, a zajedno s protonima iz vode reduciraju ga u NADPH. Fotosustav I (P+700) otpuštanjem elektrona ostaje pozitivno nabijen. Radi toga mora nadoknaditi elektrone iz fotosustava II (P680), za što je potrebna apsorpcija dvaju novih fotona svjetlosti. Gubitkom elektrona fotosustav II (P+680) ostaje pozitivno nabijen, a nadoknađuje elektrone iz fotolize vode. Fotoliza vode je, uz oslobađanje kisika, središnji događaj druge svjetlosne reakcije. Treba naglasiti da biljke vrše fotolizu vode s energijom kvanta crvene svjetlosti, dok bi je čovjek morao izvoditi s mnogo većom energijom po kvantu (onom ultraljubičaste svjetlosti). Pod utjecajem svjetlosti na fotosustave energiziraju se i tjeraju elektroni, čime se omogućuje razdvajanje hidroksilnih (OH–) iona od protona (H+), što stvara električni napon među njima (slično sunčanoj bateriji). Taj napon vuče protone kroz dijelove tilakoidne

membrane, gdje se nalaze enzimi za stvaranje adenozintrifosfata (ATP), koji je, uz NADPH, produkt primarnih procesa. Dio kisika koji se u fotosintezi oslobađa može reagirati s elektronima i stvarati spojeve štetne kloroplastima (superokside i hidroksilne radikale te vodikov peroksid), koje kloroplast s pomoću enzima superoksid dizmutaze i peroksidaze askorbinske kiseline pretvara u vodu i kisik. U sekundarnim procesima koji se zbivaju u stromi kloroplasta veže se ugljični dioksid (CO2) s pomoću enzima ribuloza-1,5-difosfat-karboksilaze u novonastali spoj sa 6 ugljikovih atoma, a on se brzo raspada na dvije molekule 3-fosfoglicerinske kiseline. One se reduciraju s pomoću produkata primarnih procesa (NADPH i ATP) u gliceraldehid-fosfat. Nastali trioza-fosfat može u Calvinovu ciklusu stvarati šećere s 4 i više ugljikovih atoma, pri čemu se mora obnavljati ribuloza-1,5-difosfat kao primatelj nove molekule CO2. Iz viška glukoze stvara se škrob, koji oblikuje škrobna zrnca vidljiva mikroskopom. Melvin Calvin protumačio je tijek enzimskih reakcija s pomoću radioaktivnog izotopa ugljika (14C) i kromatografije (Ralić i dr. 2009).



Slika 3. Proces fotosinteze (izvor: http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=20282)

2. OBRADA TEME

2.1. Uvod u mjerenje razine klorofila u listu

Razina klorofila u listu jedan je od najznačajnijih parametara povezanih s fiziološkim stanjem biljke, a mjerenje razine klorofila u listu praktično je radi utvrđivanja nutritivnog indeksa stabla. Mjerenje klorofila u listu važno je za razumijevanje fotosintetskih učinaka u staništu s ograničenom zalihom svjetla i dušika (Niinemets 2010). Još od 90-ih godina prošlog stoljeća, istraživana su rješenja koja bi omogućila takvo mjerenje razine klorofila u listu koje ne bi iziskivalo previše vremena i novca, a ponajviše takva rješenja koja bi bila što manje štetna za biljku. Naime, konvencionalne metode za determiniranje klorofila i dušika su destruktivne za list, jer on biva uništen pri mjerenju (Porra i dr. 1989, Carnelissen i dr. 2003). Nadalje, taj tip analize zahtjeva dosta vremena i novca, a metode pak ne dopuštaju ponavljanje mjerenja individualnih listova. Zbog toga su istraživane i razvijane brze i beštetne metode s optičkim mjeračem za utvrđivanje razine klorofila, kao i dušika u listu. Jedno od tih istraživanja nalazimo u Japanu, gdje se klorofilmetar pod nazivom SPAD-502 primarno testirao na riži, kukuruzu, pšenici, pamuku i trstikastoj vlasulji, a drugi klorofilmetar pod nazivom CCM-200 razvijen je u SAD-u.

U zadnjim desetljećima klorofilmetri su sve više korišteni u hortikulturi kao učinkovit instrument za utvrđivanje nutritivnog statusa biljke, a objavljeno je više od 200 studija koje potvrđuju njihovu korisnost. Na mjerenje klorofila, kao i na učinkovitost klorofilmetra utječu brojni čimbenici, pa će tako rezultati ovisiti o vrsti biljke, starosti uzorkovanog lista, sezoni u kojoj se vrši mjerenje, kao i o okolišu, primjerice, urbani okoliš je pod utjecajem štetnih tvari. Vizualni pregledi mogu biti subjektivni jer ovise o znanju individualca, ali metode i alati u dijagnosticiranju stanja biljke mogu predvidjeti i spriječiti bolesti lista. Procjena fotosintetičkih pigmenata je važan indikator starenja jer opadanje klorofila može biti povezano i s utjecajem okoline (Van der Berg i dr. 1991).

U nastavku seminarskog rada govorit će se podrobnije o metodama, istraživanjima i rezultatima ovih dvaju optičkih uređaja (SPAD-502 i CCM-200) za mjerenje razine klorofila u listu, kao i o laboratorijskoj metodi mjerenja koncentracije klorofila u listu.

2.2. Direktna (laboratorijska) metoda

Direktne metode izračunavanja razine klorofila dobivaju se u laboratorijima. Na terenu uzorkujemo lišće. Koncentracija ukupnih klorofila i karotenoida utvrđena je u svakom uzorkovanom listu pojedinačno (svaki list predstavljao je zasebni uzorak). Usitnjeno lišće je homogenizirano tekućim dušikom u tarioniku. Sa 0,1 g tako pripremljenoga praha ispunjene su prethodno pripremljene Eppendorf kivete zapremnine 0,2 ml uz dodatak hladnog acetona (80%). Tkivo je nakon toga ekstrahirano 15 minuta u hladnjaku, nakon čega je centrifugirano na 1000 okretaja u 10 minuta. Supernatant je dekantiran u plastične epruvete, a kruti ostatak zelene boje reekstrahiran je s acetonom sve dok tkivo nije izgubilo zelenu boju. Nakon toga, pomoću menzure izmjeren je volumen svakog uzorka. Tako pripremljeni uzorci korišteni su za spektrofotometrijsko mjerenje na UV/VIS spektrofotometru (Specord 40, Analytic Jena) pomoću kojega je izmjerena apsorbanicja uzoraka na valnim duljinama od 661,6 nm; 664,8 nm i 470 nm. Na temelju poznate mase (m), volumena (V) i apsorbancije (A) pri određenoj valnoj duljini izračunate su koncentracije fotosintetskih pigmenata u svakom uzorku pomoću skljedećih formula (Lichtenthaler 1987):

- Koncentracija ukupnih klorofila (a + b) = (7.05 · A661.6nm + 18.09 · A644.8nm) · V/(m · 1000), iskazano u mg g-1 svježe tvari uzorka.

- Koncentracija ukupnih karotenoida = (1000 · A470nm - 1.90 · (11.24 · A661.6nm) - 2.04 · A644.8nm) - 63.14 · (20.13 · A644.8nm) - 419 · A661.6nm) · V/(214 · m · 1000), iskazano u mg g-1 svježe tvari uzorka.

U brojnim istraživanjima koja su za cilj imala utvrditi preciznost optičkih mjerača klorofila, laboratorijska metoda koristila se zbog usporedbe stvarne količine klorofila izračunate putem te metode i one količine koju predviđa optički mjerač, u ovom slučaju, SPAD-502 ili CCM-200 klorofilmetar.

2.3. Optičko mjerenje razine klorofila

2.3.1. SPAD-502 klorofilmetar

SPAD-502 klorofilmetar mjeri razinu klorofila i dušika. Prvo je razvijen u Japanu za mjerenje količine klorofila za rižu, pšenicu, kukuruz, pamuk i trstikastu vlasulju. Dva eksperimenta (Chang i Robinson 2003) provedena su na vrstama američke platane (*Platanus occidentalis* L.), likvidambra (*Liquidambar styraciflua* L.), pensilvanijskog jasena (*Fraxinus pennsylvanica* March.), topole (*Populus heterophylla* L.) u prvom eksperimentu, a u drugom na likvidambru (*Liquidambar styraciflua* L.). SPAD-502 pokazao se kao koristan alat za procjenu nutricionarnih programa za bjelogorične vrste.



Slika 4. SPAD-502 klorofilmetar (izvor: http://www.nutechintl.com/nisite/products/chlorophyll-content/spad-502-chlorophyll-meter/)

Mjerenje pomoću kolorofilmetra SPAD-502 odvija se na sljedeći način: Prijenosni uređaj se vrlo lako ručno koristi tako da se prinese listu kojeg potom stavimo između dviju pločica koje formiraju malu komoru za detektiranje lista. Putem male komore (2mm x 3mm) u kojoj je uzorak lista, mjerač emitira svjetlost dviju dioda, od kojih jedna emitira 650 nm (crvena svjetlost) a druga 940nm (infracrvena svjetlost). Te valne duljine se naizmjenično imitiraju. Klorofil apsorbira crvenu svjetlost, ali gotovo ništa infracrvene. SPAD vrijednost odmah je izračunata u razlici između crvenih i infracrvenih valjnih duljina koje detektira fotodioda. Vrijednost je prikaza na klorofilmetru u SPAD vrijednosti.

2.3.2. CCM-200 klorofilmetar

Klorofilmetar CCM-200 razvijen je u SAD-u i također mjeri emitaciju svjetlosti na dvije razine valnih duljina: crvenoj (660 nm) i infracrvenoj (930 nm). Potencijal klorofilmetra CCM-200 procjenjen je u različitim stadijima razvoja lista, za vrste *Quercus pyrenaica* Wild, *Q. faginea* Lamb. *Q. suber* L. i *Q. ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. CCM-200 klorofilmetar rezultate iskazuje u CCM-200 jedinicama. Njegova ručna uporaba uvelike je slična onoj klorofilmetra SPAD-502.



Slika 5. CCM-200 klorofilmetar (izvor: https://envcoglobal.com/catalog/agriculture/plant/leaf/ccm-200-plus-chlorophyll-content-meter)

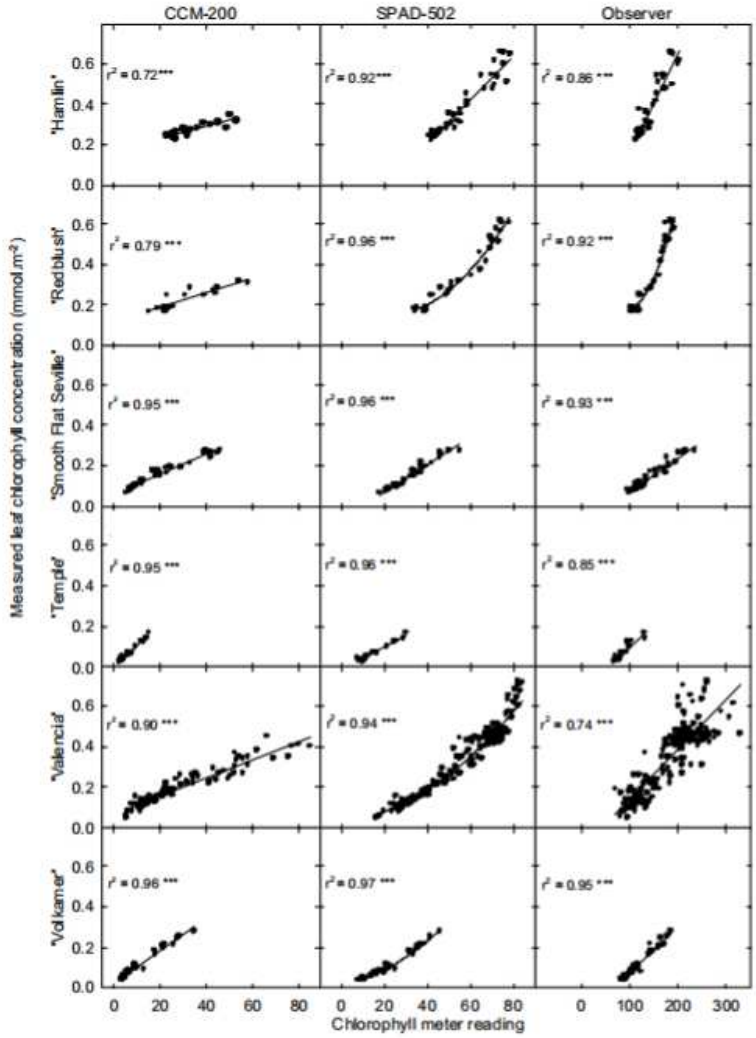
2.4 Eksperimenti s optičkim mjeračima i rezultati

SPAD-502 i CCM-200 vrijednosti nisu vjerodostojan prikaz prave vrijednosti klorofila dobivenog direktnom (laboratorijskom) metodom ekstrahiranja klorofila. Također, već je spomenuto da brojni čimbenici utječu na rezultate dobivene optičkim mjerenjem klorofila (vrsta biljke, starost lista, ekološki čimbenici itd.). Kako bi se izračunala stvarna vrijednost koncentracije klorofila, vrijednosti dobivene putem klorofilmetra moraju se preračunavati putem jednadžbi u realnu vrijednost klorofila – CCI (*clorophyll content index*). Zbog toga se u eksperimentima s klorofilmetrima koristila i laboratorijska metoda, da bi se njeni

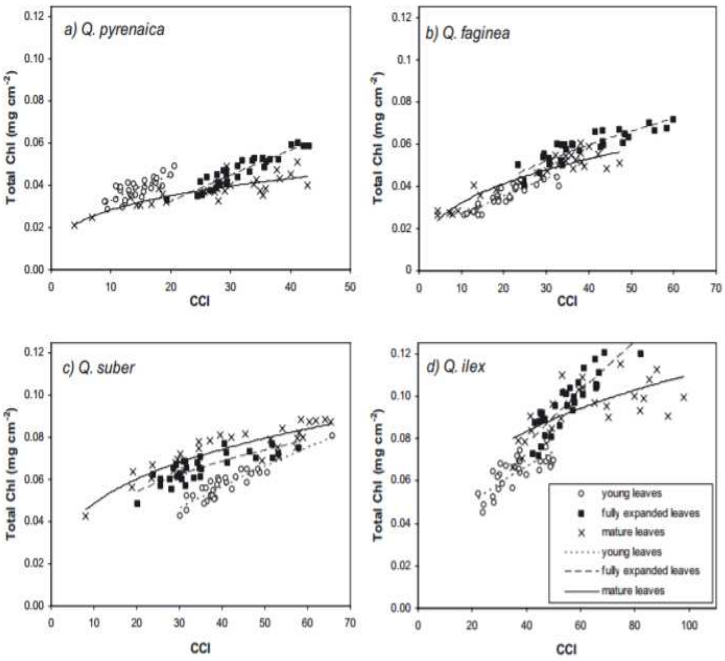
rezultati mjerenja usporedili s rezultatima optičkih klorofilmetara, tj. kako bi se utvrdila njihova preciznost.

U dosadašnjim istraživanja, SPAD-502 klorofilmetar i CCM-200 klorofilmetar korišteni su na različitim vrstama. Zbog toga su ishodi mjerenja razine klorofila pokazivali drugačije rezultate. No, još jedan čimbenik utječe na rezultate mjerenja klorofila i odnos tog iznosa prema koncentraciji klorofila u listu (CCI), a to je starost lista.

Primjerice, jedno takvo istraživanje provedeno je u u savani blizu Vadelosa, u Španjolskoj, gdje koegzistiraju četiri ispitana hrasta – *Quercus faginea*, *Quercus pyrenaica*, *Quercus ilex* i *Quercus suber*. Uzorci su uzeti za tri stadija razvitka lista: mlada dob, široko razvijeni listovi te zreli i gotovo stari listovi. Nasumično je uzorkovano 30 listova od 8-12 stabala po vrsti i po različitoj starosti lista. Listovi su potom mjereni pomoću CCM-200 klorofilmetra, koji se primjenjivao uglavnom na mezofilu lista, izbjegavajući glavnu žilu. Eskperiment je proveden i putem direktne metode kako bi se utvdio sadržaj klorofila. U svim slučajevima, uočena je snažna veza između CCI očitanja i totalne razine klorofila po jedinici površine. Obzirom na vrstu, najbolje rezultate pokazani su na primjerku vrste *Quercus faginea*, dok je za druge vrste rezultat više ovisio o starosti lista.

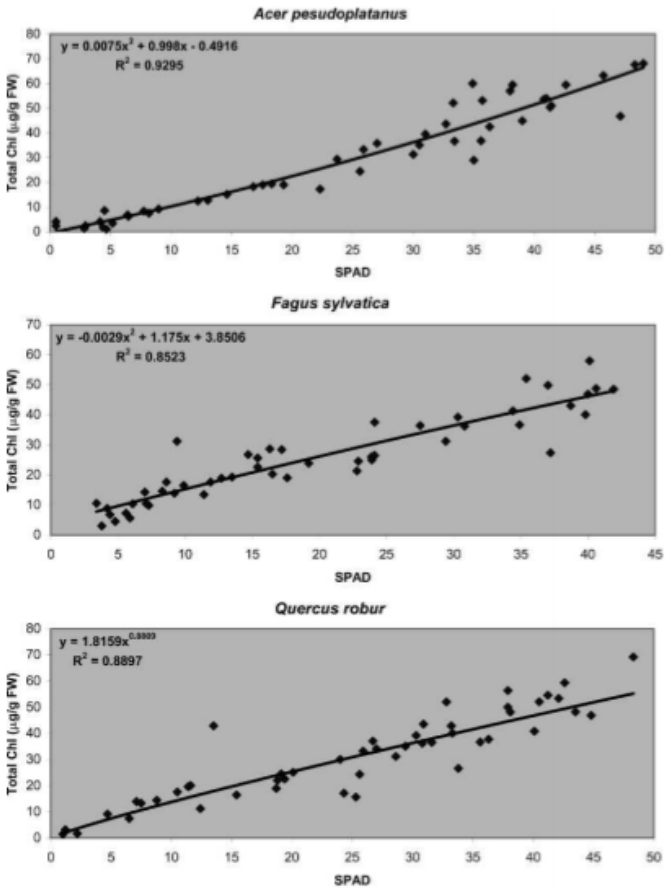


Slika 6. Usporedba rezultata mjerenja pomoću CCM-200 i SPAD-502 klorofilmetra i odnosi izmjerene razine klorofila s koncentracijom klorofila (CCI) (izvor: Jifon i dr. 2005)



Slika 7. Odnos izmjerene razine klorofila putem optičkog uređaja CCM-200 i koncentracije klorofila (CCI) za vrste *Quercus pyrenaica*, *Quercus faginea*, *Quercus suber* i *Quercus ilex* (izvor: Silla i dr. 2009)

Istraživanje (Percival i dr. 2008) na vrstama *Acer pseudoplatanus*, *Fagus sylvatica* i *Quercus robur* provedeno je pomoću optičkog mjerača SPAD-502. Rezultati mjerenja pomoću optičkog mjerača i rezultati dobiveni laboratorijskom metodom prikazani su u sljedećim grafovima:



Slika 8. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem pomoću SPAD-502 klorofilmetra i rezultata dobivenih laboratorijskom metodom. (SPAD vrijednost i CCI vrijednost) (izvor: Percival i dr. 2008)

2.5. Regresijske (kalibracijske) jednadžbe

Da bi se klorofilmetar mogao uspješno koristiti, nužno je konstruirati kalibracijske jednadžbe (regresijske jednadžbe). Zbog toga su istraživači u svojim eksprimentima tražili veze između vrijednosti klorofilmetra i vrijednosti koncentracije klorofila (CCI) u obliku parametara, čemu svjedoče i grafovi. Ishodi istraživanja pokazuju da je potrebno preračunati dobivenu SPAD/CCM vrijednost putem određene jednadžbe, koja se mijenja ovisno o vrsti ili starosti lista. Prošle studije sa klorofilmetrom CCM-200 pokazale su da je potrebno adekvatno kalibriranje brojčanog rezultata klorofilmetra i stvarnog sadržaja klorofila (CCI). U nekim slučajevima, nelinearne jednadžbe objašnjavale su vezu između

dvaju parametara zbog nejednolike distribucije klorofila i različitog rasipanja svjetla a neka istraživanja potvrdila su da kalibriranje može biti i pod utjecajem rasta lista. U nedavnim studijama na CCM-200 klorofilmetru, cilj je bio kalibrirati klorofilmetar kako bi on izračunao totalnu razinu klorofila u hrastu, te utvrditi ostaje li veza između indeksa CCM-200 i klorofila ista kroz sezonu razvijanja lista svake vrste.

Species	Leaf stage	*n*	Equation	*P*	r^2
Q. pyrenaica	Young leaves	30	Log(Chl) = −4.439 + 0.442 Log(CCI)	< 0.0001	0.58
	Fully expanded leaves	30	Log(Chl) = −1.286 + 0.818 Log(CCI)	< 0.0001	0.85
	Mature leaves	30	Log(Chl) = −4.265 + 0.305 Log(CCI)	< 0.0001	0.77
	All combined	90	Log(Chl) = −4.106 + 0.289 Log(CCI)	< 0.0001	0.56
Q. faginea	Young leaves	30	Log(Chl) = −4.852 + 0.503 Log(CCI)	< 0.0001	0.83
	Fully expanded leaves	30	Log(Chl) = −4.578 + 0.475 Log(CCI)	< 0.0001	0.77
	Mature leaves	30	Log(Chl) = −4.269 + 0.360 Log(CCI)	< 0.0001	0.88
	All combined	90	Log(Chl) = −4.679 + 0.482 Log(CCI)	< 0.0001	0.82
Q. suber	Young leaves	30	Log(Chl) = −5.453 + 0.699 Log(CCI)	< 0.0001	0.79
	Fully expanded leaves	30	Log(Chl) = −3.923 + 0.338 Log(CCI)	< 0.0001	0.66
	Mature leaves	30	Log(Chl) = −3.720 + 0.304 Log(CCI)	< 0.0001	0.83
	All combined	90	Log(Chl) = −3.880 + 0.315 Log(CCI)	< 0.0001	0.37
Q. ilex	Young leaves	30	Log(Chl) = −4.335 + 0.441 Log(CCI)	< 0.0001	0.60
	Fully expanded leaves	30	Log(Chl) = −0.581 + 0.709 Log(CCI)	< 0.0001	0.75
	Mature leaves	30	Log(Chl) = −3.600 + 0.302 Log(CCI)	< 0.0001	0.48
	All combined	90	Log(Chl) = −4.885 + 0.617 Log(CCI)	< 0.0001	0.73

Slika 9. Primjer jednadžbi za različite vrste i starost lista (izvor: Silla 2009)

3. Zaključak

Mjerenje razine klorofila u listu može se gotovo jednako precizno izvesti pomoću optičkog mjerača jednako kao preko direktne, laboratorijske metode. Optički klorofilmetar (CCM-200 ili SPAD-502) daju brojčane vrijednosti koje se u potpunosti ne preklapaju s onom vrijednosti koncenctracije klorofila dobivene u laboratoriju. Zbog toga su brojna istraživanja bila posvećena traženju regresijskih jednadžbi za određene vrste i starosti lišća koje, jednom unesene u vrijednost optičkog uređaja, daju pouzdanu brojku razine klorofila u listu. Direktna metoda često je preskupa i zahtjeva određeno laboratorijsko znanje, kao i dosta vremena, pa tako nije ni svima lako dostupna. S druge strane, optički klorofilmetri su prijenosni uređaji koji se lako koriste. Njihova mana bila bi to što zahtjevaju i preračunavanje dobivene vrijednosti pomoću regresijskih jednadžbi.

No, u posljednjim godinama, istraživači tvrtke „Apogee instruments“ nastojali su poboljšati uređaj CCM-200 i unaprijediti osobine uređaja koje su smatrane manama. Tako su izumili uređaj MC-100, koji istovremeno optički mjeri razinu klorofila u listu (SPAD ili CCM vrijednost) i uračunava regresijsku jednadžbu, pa se time ovim optičkim uređajem u trenutku mjerenja dobije potpuna razina klorofila u listu (CCI vrijednost). Taj novi klorofilmetar, prema najnovijim istraživanjima je najprecizniji u preračunavanju stvarne vrijednosti koncentracije klorofila u optičku vrijednost razine klorofila i obrnuto, što u jednakoj mjeri olakšava rad kako znanstvenicima koji koriste CCI vrijednosti, tako i poljoprivrednicima koji koriste optičke vrijednosti dobivene klorofilmetrom.

4. Literatura:

1. Changa, S.; Robison, D. J. 2002: Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. Forest Ecology and Management 181, 331–338.
2. Dubravec, K. D.; Regula, I. 1995: Fiziologija bilja. Školska knjiga, Zagreb.
3. Jifon, J. L.; Syversten, J. P.; Whaley, E. 2004: Growth environment and leaf anatomy affect nondestructive estimates of chlorophyll and nitrogen in citrus sp. Leaves. Forest Ecology and Management 200 (2004) 119–124.
4. Lichtenthaler, H.K. 1987: Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. Methods in Enzymology, 148, 350-382.
5. Mizusaki, K.; Umeki, K.; Honjo, T. 2013: Development of models for estimating leaf chlorophyll and nitrogen contents in tree species with respect to seasonal changes. Photosynthetica 51 (4): 531-540.
6. Percival, G.; Keary, I.; Noviss, K. 2008: Quantifying Nutrient Stress in Foliar Tissue. Arboriculture & Urban Forestry 34(2):89–100.
7. Ravlić, S. 2017: Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje.
8. Silla, F.; Gonzalez-Gil, A.; Gonzalez-Molina, E.; Mediavilla, S.; Escudero, A. 2010: Estimation of chlorophyll in Quercus leaves using a portable chlorophyll meter: efects of species and leaf age. Springer Verlag/EDP Sciences, 67 (1):50-54
9. Sever, K.; Hrustić, M.; Škvorc, Ž.; Bogdanić, S.; Seletković, N.; Potočić, N.; Franjić, J. 2016: Pouzdanost procjene stanja ishrane hrasta lužnjaka (Quercus robur L.) s dušikom pomoću prijenosnog klorofilmetra CCM-200. Šumarski list, 9–10 (2016): 465–475.
10. Van den Berg, A.K.; Perkins T.D. 2004: Evaluation of a portable chlorophyll meter to estimate chlorophyll and nitrogen contents in sugar maple (Acer saccharum Marsh.) leaves. Forest Ecology and Management 200 (2004) 113–117.

Internetske stranice:

Web-stranica Opti science:

https://www.optisci.com/ccm-200.html

Web-stranica ResarchGate:

https://www.researchgate.net/publication/237625249_A_Comparison_of_Opti-Sciences_CCM-200_Chlorophyll_Meter_and_the_Minolta_SPAD_502_Chlorophyll_Meter

Youtube:

https://www.youtube.com/watch?v=pTlKbwVE_5k&t=297s

https://www.youtube.com/watch?v=d6dswwH1fks