

Um novo clorofilômetro para estimar os teores de clorofila em folhas do capim Tifton 85

A new chlorophyll meter to estimate chlorophyll contents in leaves of Tifton 85 bermudagrass

Élio Barbieri Junior^{I*} Roberto Oscar Pereyra Rossiello^I Rosani Valéria Marcelina Matoso Silva^I
Roberta Cristiane Ribeiro^{II} Mirton José Frota Morenz^{III}

- NOTA -

RESUMO

O propósito deste trabalho foi verificar o desempenho de um novo clorofilômetro portátil, em parcelas experimentais vegetadas com o capim-Tifton 85 (*Cynodon spp.*). Para tal, foi utilizado um experimento de curta duração, em que três doses de N (0,75 e 150kg de N ha⁻¹) foram combinadas com quatro datas de amostragem (8, 16, 24 e 28 dias após um corte de uniformização). As análises foram feitas em lâminas da folha mais nova totalmente expandida. Os teores das clorofilas a, b e a+b foram quantificados espectrofotometricamente após a extração com acetona 80%, enquanto que o clorofilômetro forneceu os correspondentes valores de Índice de Clorofila Falker (ICF). As leituras do aparelho foram sensíveis tanto às doses de N quanto às datas de amostragem. Foram obtidas correlações positivas entre ambos os métodos de quantificação (clorofila a: r=0,646; b: r=0,797; e total: r=0,721), que evidenciaram a utilidade desse novo clorofilômetro na determinação indireta dos teores de clorofila foliar no capim-Tifton 85.

Palavras-chave: *Cynodon spp.*, clorofila total, adubação nitrogenada.

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the performance of a new portable chlorophyll meter in the indirect determination of chlorophyll contents in Tifton 85 bermudagrass leaves. In a field trial of short duration, three N doses (0, 75 and 150kg ha⁻¹) were combined with four sampling dates (8, 16, 24 e 28 days after a cut for sward uniformity) in completely randomized blocks, with treatments arranged in a split-plot design. Analyses were performed in the youngest fully expanded leaf blade. Contents of chlorophylls a, b and total were quantified spectrophotometrically, after extraction with acetone

80%, while chlorophyll meter readings, expressed as Falker Chlorophyll Index (FCI) units, provided the same information. Chlorophyll meter readings were sensitive to both N rates and sampling dates. It were obtained significant positive correlations between both methods (chlorophyll a: r=0.646, chlorophyll b: r=0.797 and for total chlorophyll: r=0.721). It was concluded that this new chlorophyll meter constitutes an appropriate tool for the indirect determination of foliar chlorophyll contents in Tifton 85 pastures.

Key words: *Cynodon spp.*, nitrogen fertilization, total chlorophyll.

Os clorofilômetros são instrumentos que aferem, de forma indireta e não destrutiva, os teores de clorofila com base nas propriedades óticas das folhas (ARGENTA et al., 2001a). O primeiro e mais difundido é o SPAD (*Soil Plant Analysis Development*, Konica Minolta, Japão), o qual possui diodos que emitem luz em comprimentos de onda (λ) de 650nm (vermelho) e a 940nm (infravermelho). A emissão em $\lambda=650$ nm situa-se próxima dos comprimentos de ondas associados à atividade da clorofila, enquanto que a emissão em $\lambda=940$ nm serve como referência interna para compensar diferenças na espessura ou no conteúdo hídrico da folha (MARKWELL et al., 1995). Outro equipamento similar, chamado *N-Tester* (Yara International, Noruega), tem sido aplicado à identificação de desordens nutricionais

^IPrograma de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio Janeiro (UFRRJ), 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: elio.barbieri@cfs.ifmt.edu.br. *Autor para correspondência.

^{II}Instituto Federal do Mato Grosso (IFMT), Campus Confresa, Confresa, MT, Brasil.

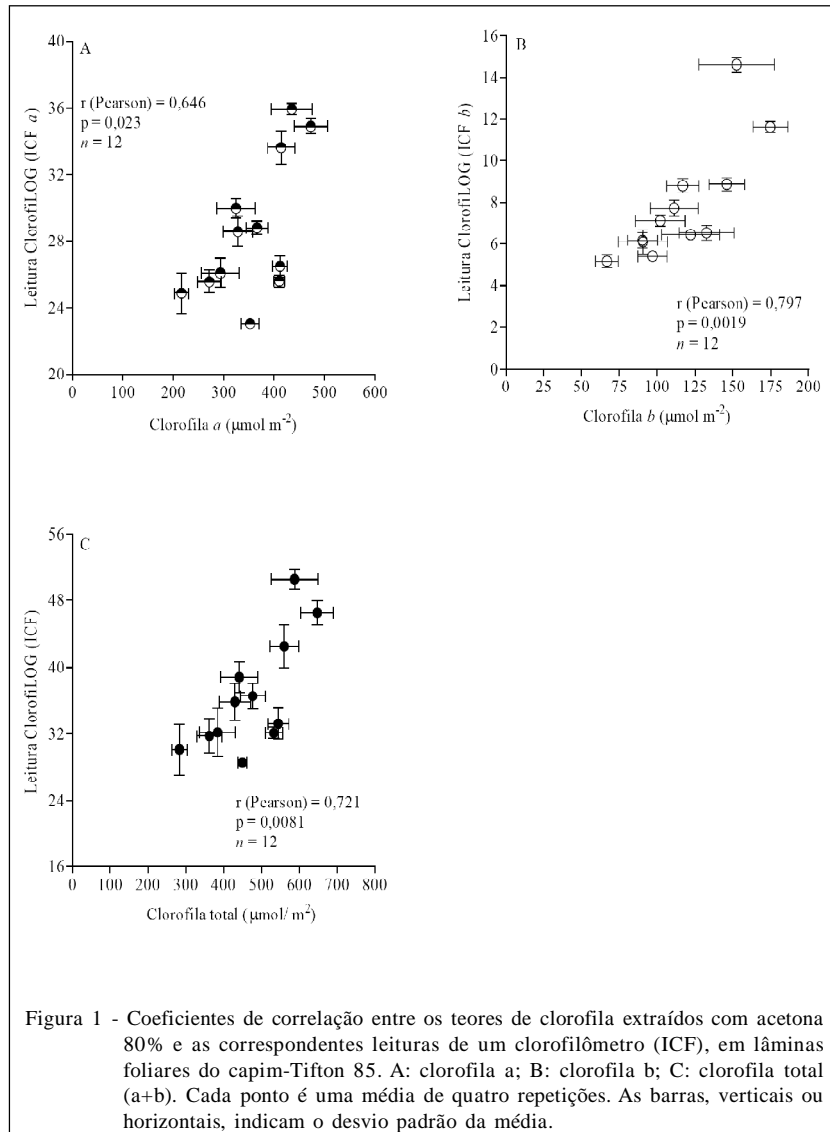
^{III}Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

e à determinação de níveis críticos de N-foliar (ORTUZAR-IRAGORRI et al., 2005). De mais recente lançamento, o clorofilômetro chamado ClorofiLOG (Falker Automação Agrícola, Brasil), utiliza fotodiodos emissores em três comprimentos de onda (FALKER, 2008): dois emitem dentro da banda do vermelho, próximos aos picos de cada tipo de clorofila ($\lambda = 635$ e 660nm) e um outro no infravermelho próximo ($\lambda = 880\text{nm}$). Da mesma forma que o SPAD, um sensor inferior recebe a radiação transmitida através da estrutura foliar. A partir desses dados, o aparelho fornece valores chamados Índice de Clorofila Falker (ICF) proporcionais à absorvância das clorofilas. O propósito do presente trabalho é verificar o desempenho desse novo clorofilômetro, através da relação das suas leituras com teores de clorofila extraídos diretamente, visando a sua utilização no manejo da adubação nitrogenada em pastagens de *Cynodon* spp. cv. 'Tifton 85'.

O experimento foi realizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, em área preparada especificamente para este experimento. O plantio foi realizado utilizando-se estolões enraizados provenientes de área contígua, em sulcos separados de 0,5m, em parcelas de 4x4m. Previamente, foi feita uma aplicação basal de P (150kg ha^{-1}), no fundo do sulco, e, no pós-plantio, foi aplicada adubação potássica (80kg de K ha^{-1} , como KCl, em cobertura). O experimento foi disposto segundo um desenho em blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições e três doses de N, de forma a induzir níveis diferenciados do nutriente no solo: 0; 75 e 150kg N ha^{-1} , na forma de ureia. As determinações experimentais foram realizadas entre 30 de novembro e 28 de dezembro de 2008, período no qual foram feitas quatro amostragens, expressas como dias após um corte de uniformização (DAC). As primeiras três datas foram prefixadas (8, 16 e 24 DAC), enquanto a última foi realizada quando os dosséis de maior crescimento atingiram valores de interceptação da radiação fotossinteticamente ativa dentro da faixa 93-95%, conforme avaliado com sensor de quantum. Usou-se a primeira folha totalmente expandida (do topo para a base do perfilho), exposta à radiação solar. No terço médio da lâmina, foram feitas três leituras com o clorofilômetro ClorofiLOG, modelo CFL 1030, operado de acordo com as especificações do fabricante (FALKER, 2008). Esse procedimento foi repetido em 10 folhas por parcela. Imediatamente após as leituras, retirou-se, com auxílio de um furador de papel, um disco foliar ($28,3\text{mm}^2$ folha $^{-1}$), totalizando uma amostra composta de 283mm^2 de tecido verde/10 discos. Esse material foi imediatamente transferido a frascos de vidro

contendo 20ml de acetona 80% (ARNON, 1949), procedendo-se à determinação espectrofotométrica das clorofilas a; b e total (a+b), conforme descrito por BARBIERI JUNIOR et al. (2010). Os dados foram submetidos a análises de variância e de correlação paramétrica, utilizando-se para tal o *software* GraphPad Prism v. 5.0 (MOTULSKY & CHRISTOPOULOS, 2004).

Os teores de clorofila total (CFT) extraídos com acetona 80% variaram entre 264 e $699\ \mu\text{mol m}^{-2}$, em decorrência de efeitos significativos da dose de N ($P < 0,0001$), DAC ($P < 0,0001$) e dose x DAC ($P = 0,0002$). Em média, a adubação nitrogenada aumentou os teores de CFT em 58%, considerando-se a maior dose aplicada em relação ao controle (585 ± 45 vs. $370 \pm 69\ \mu\text{mol m}^{-2}$). Todavia, o maior contraste entre doses aconteceu aos 24DAC, quando a diferença a favor da maior dose foi de 69% (648 ± 44 vs. $384 \pm 47\ \mu\text{mol m}^{-2}$). A variação das leituras do clorofilômetro seguiu um padrão inteiramente similar, sendo afetado ($P < 0,0001$) pelos fatores dose de N, DAC e pela sua interação. Excetuando-se as leituras correspondentes às doses de 75 e 150kg N ha^{-1} , aos 8DAC, as quais não diferiram entre si ($P > 0,05$, Teste de Bonferroni), os valores de ICF aumentaram significativamente com as doses de N até os 16-24DAC, decaindo, não significativamente, na amostragem final. O máximo ICF (52,1) foi registrado aos 16DAC, numa parcela que recebeu a maior dose de N. Independentemente de data de amostragem, valores de ICF aumentaram, em média, 43%, considerando-se a dose de 150kg N ha^{-1} em relação ao controle (43 ± 7 vs. 30 ± 2 ICF, respectivamente), ou seja, a adubação teve um efeito comparativamente menor sobre o ICF do que sobre o teor de CFT. Para o conhecimento dos autores, não existe registro prévio do uso do ClorofiLOG em cultivares do gênero *Cynodon* spp., portanto não se dispõe de um termo de comparação direta para aferir a validade dos presentes resultados. Entretanto, como o ClorofiLOG e o SPAD utilizam a mesma escala de medição, é possível realizar algumas inferências. PREMAZZI & MONTEIRO (2002), avaliando as respostas do Tifton-85 à aplicação de N no solo, em vasos mantidos em casa de vegetação, obtiveram valores máximos de leituras SPAD entre 39,4 e 44,2, dependendo do ciclo de rebrota, ou seja, de ordem similar aos aqui observados. Por outro lado, como mostra a figura 1C, o grau de associação entre os valores médios obtidos com ambos os métodos de quantificação de clorofila correspondeu a um coeficiente $r = 0,721$ ($P = 0,0081$). Esse valor de correlação é de magnitude similar aos obtidos com outras espécies, em estudos que utilizaram o SPAD, sob condições de campo (SIBLEY et al., 1996; ARGENTA et al., 2001b). A

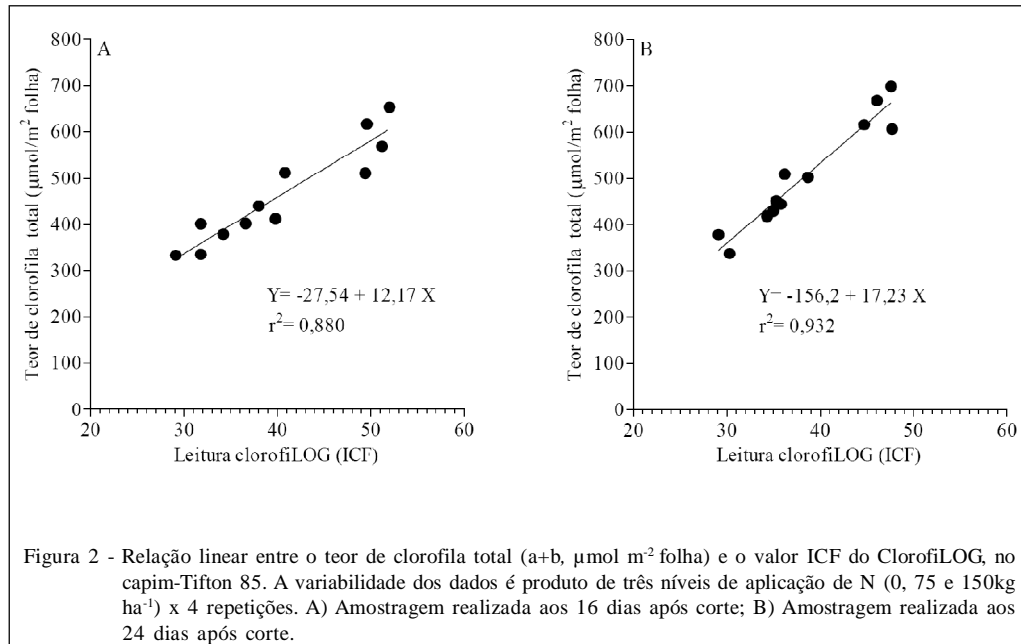


correlação entre os teores de CFT e os seus correspondentes ICF exprime a contribuição aditiva das clorofilas a e b. Com relação à clorofila a, os seus teores variaram entre 200 e 510 $\mu\text{mol m}^{-2}$, e os seus correspondentes valores de ICF entre 22,8 e 36,9 ($r=0,646$, Figura 1A), enquanto que a clorofila b variou entre 58 e 190 $\mu\text{mol m}^{-2}$ correspondente a valores de ICF entre 4,9 e 15,2 ($r=0,797$, Figura 1B).

Como mencionado previamente, houve diferenças associadas às datas de amostragem. Para a CFT, excluindo-se as médias correspondentes aos 8 e 28DAC, o valor do coeficiente de correlação melhorou expressivamente, passando para $r=0,926$ ($P=0,0086$), indicando ser o período compreendido entre 16 e 24DAC, o mais apropriado para a quantificação das

clorofilas. A figura 2 mostra a natureza linear da relação entre ambos os métodos de determinação das clorofilas, tanto aos 16 quanto aos 24 dias (Figuras 2A e B, respectivamente).

Tomados em conjunto, os dados obtidos permitem afirmar que o ClorofiLOG constitui um instrumento adequado para a determinação indireta dos teores relativos das clorofilas a, b e total na gramínea forrageira Tifton 85. Por outro lado, à medida que seu desempenho foi sensível a variações espaciais e temporais, induzidas por disponibilidades diferenciadas de N no solo, este clorofilômetro pôde constituir uma excelente ferramenta no manejo da adubação nitrogenada dessa forrageira, assim como de outras representantes do gênero *Cynodon* spp.



REFERÊNCIAS

ARGENTA, G. et. al. Clorofila na folha como indicador do nível de nitrogênio em cereais. **Ciência Rural**, v.31, n.4, p.715-722, 2001a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000400027&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 28 ago. 2012. doi: 10.1590/S0103-84782001000400027.

ARGENTA, G. et. al. Relação da leitura do clorofilometro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.158-167, 2001b. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-31312001000200005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 28 ago. 2012. doi: 10.1590/S0103-31312001000200005.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, n.1, p.1-15, 1949. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC437905/>>. Acesso em: 28 ago. 2012.

BARBIERI JUNIOR, É. et al. Comparação de métodos diretos de extração e quantificação dos teores de clorofilas em folhas do capim-Tifton 85. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p.633-636, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000300022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 28 ago. 2012. doi: 10.1590/S0103-84782010000300022.

FALKER, Automação agrícola. **Manual do medidor eletrônico de teor clorofila (ClorofiLOG/CFL 1030)**. Porto

Alegre, 2008. 33p. Disponível em: <http://www.falker.com.br/produto_download.php?id=4>. Acesso em: 28 ago. 2012.

MARKWELL, J. et. al. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**, v.46, n.3, p.467-472, 1995. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/b3q41327j2387225/>>. Acesso em: 28 ago. 2012. doi: 10.1007/BF00032301.

MOTULSKY, H.; CHRISTOPOULOS, A. **Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting**. Oxford: Oxford University, 2004. 352p.

ORTUZAR-IRAGORRI, M.A. et al. N-Tester use in soft winter wheat: evaluation of nitrogen status and grain yield prediction. **Agronomy Journal**, v.97, n.5, p.1380-1389, 2005. Disponível em: <<https://www.soils.org/publications/aj/pdfs/97/5/1380>>. Acesso em: 28 ago. 2012. doi: 10.2134/agronj2004.0268.

PREMAZZI, L.M.; MONTEIRO, F.A. Produção do capim-Tifton 85 submetido a doses e épocas de aplicação de nitrogênio após o corte. **Boletim da Indústria Animal**, v.59, n.1, p.1-16, 2002. Disponível em: <http://www.iz.sp.gov.br/pesq_bia.php?id=240>. Acesso em: 28 ago. 2012.

SIBLEY, J.L. et al. Foliar SPAD-502 meter values, nitrogen levels, and extractable chlorophyll for red maple selections. **Hortscience**, v.31, n.3, p.468-470, 1996. Disponível em: <<http://hortsci.ashspubs.org/content/31/3/468.full.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2012.