



DETERMINAÇÃO NÃO DESTRUTIVA DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS E DE NITROGÊNIO EM FOLHAS DE ALGODOEIRO POR MEIO DO CLOROFILÔMETRO PORTÁTIL SPAD-502¹

Giovani Greigh de Brito (giovani@cnpa.embrapa.br), Valdinei Sofiatti (Embrapa Algodão), Franklin Magnum de Oliveira Silva (Estagiário Embrapa Algodão), Ziany Neiva Brandão (Embrapa Algodão), Dalva Maria Almeida Silva (Estagiária Embrapa Algodão), Vivianny Nayse Belo Silva (Estagiária Embrapa Algodão).

RESUMO – As técnicas analíticas empregadas na extração de clorofila e na determinação de nitrogênio em plantas são destrutivas e fundamentam-se no uso de solventes orgânicos. Este estudo propõe a quantificação não destrutiva da concentração de pigmentos fotossintéticos e de nitrogênio em algodoeiro utilizando o medidor portátil de clorofila SPAD-502. Para a leitura do índice SPAD, determinação de pigmentos fotossintéticos e de nitrogênio, folhas de algodoeiro com diferentes idades e tonalidades de cor foram coletadas de plantas de algodoeiro no florescimento. Subseqüentemente, 200 discos foliares com área conhecida foram extraídos a partir das folhas coletadas. A determinação do índice SPAD em cada disco foi realizada por meio da média de cinco leituras com o clorofilômetro portátil SPAD-502 e imediatamente após a determinação, adicionaram-se 5 mL de Dimetil sulfóxido (DMSO) e os discos foram mantidos em banho-maria a temperatura de 70 °C por um período de 150 minutos. Após o resfriamento do extrato líquido, uma alíquota de 3,0 mL foi utilizada para leitura utilizando espectrofotometria a 470, 646 e 663 nm. Para a determinação de nitrogênio, discos foliares foram submetidos a 70° C até peso constante, moídos e analisados pelo método de Kjeldahl. A partir dos resultados analíticos obtidos foram ajustados modelos matemáticos utilizando-se o índice SPAD na predição dos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, carotenóides e nitrogênio. Considerando os resultados obtidos concluiu-se que o medidor portátil de clorofila SPAD-502 poderá ser utilizado para estimar a concentração dos pigmentos fotossintéticos e de nitrogênio em folhas de algodoeiro, economizando tempo, espaço e recursos comumente demandados nestas análises.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*, clorofila, nitrogênio, método não destrutivo.

INTRODUÇÃO

¹Financiado Pelo FINEP.

Entre os fatores relacionados à eficiência fotossintética em plantas e, conseqüentemente, seu crescimento e adaptação à ambientes com diferentes luminosidades, a concentração e composição de pigmentos presentes nos cloroplastos são importantes fatores (MARINI, 1986; THIELE et al., 1998). Adicionalmente, a síntese do aparato fotossintético requer significativas quantidades de nitrogênio (N), bem como a proporção de N foliar alocado para o cloroplasto corresponde a cerca de 75% do total absorvido pela planta (HÁK et al., 1993). Tem sido evidenciado que em plantas crescendo sob alta irradiância, suas folhas geralmente apresentam taxa de aproximadamente 1,0 mol de N o qual está presente na enzima ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase - RuBPCO para 1,4 mol nas membranas do tilacóides, enquanto sob baixa irradiância, maior quantidade de N é realocado para o interior dos componentes do tilacóides (EVANS, 1989).

A determinação do conteúdo de clorofila é um procedimento comumente utilizado na pesquisa com plantas. Técnicas destrutivas são tradicionalmente utilizadas para a determinação do teor de clorofila em folhas de plantas. Em geral, os métodos destrutivos utilizam vários protocolos laboriosos, com elevado consumo de reagentes químicos, de espaço físico e de mão-de-obra (TUCKER, 1977). Esses métodos utilizam solventes orgânicos que incluem acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) (HISCOX; ISRAELSTAM, 1979), metanol, N, N-dimetil formamida e éter de petróleo (INSKEEP; BLOOM, 1985; LICHTENTHALER; WELLBURN, 1983; MORAN PORATH, 1980; MORAN, 1982). Durante a extração e diluição, podem ocorrer significativas perdas de pigmentos, ocasionando elevada variabilidade nos dados. Shoaf e Lium (1976) utilizaram DMSO para modificar a metodologia de extração e eliminar o estágio de centrifugação. O método permitiu aumentar o período de armazenamento dos pigmentos extraídos, de modo a permitir que as análises espectrofotométricas não necessitem ser efetuadas imediatamente após a extração.

Clorofilômetros, também denominados de medidores de clorofila portáteis, têm sido bastante empregados na agricultura para estimar rapidamente o conteúdo de clorofila nas folhas. Esses equipamentos possuem diodos que emitem luz em dois comprimentos de onda, que situam-se na região do vermelho, em 650 nm, e na região do infravermelho próximo, em 940 nm. A escolha do comprimento de onda em 650 nm deve-se ao fato que os comprimentos de ondas primários, associados à atividade da clorofila são 645 e 663 nm. Já o comprimento de onda de 940 nm é utilizado para compensar fatores externos como o conteúdo de água ou diferenças na espessura da folha que venham a interferir na transmitância da luz (WASKOM, 1996). A luz que passa através da amostra foliar atinge um fotodiodo que a converte em sinais elétricos e são posteriormente amplificados e convertidos para sinais digitais (MINOLTA CAMERA COMPANY, 1989). Assim, os valores obtidos são proporcionais aos teores de clorofila foliar e são chamados de índice do clorofilômetro (ARGENTA et al., 2001).

Com o índice obtido nesse equipamento pode-se estimar a concentração de clorofila em uma amostra, utilizando modelos matemáticos que expressem a relação entre o conteúdo de pigmentos extraídos pelo método tradicional e a leitura feita no clorofilômetro portátil. Entretanto, para estimar adequadamente os teores de pigmentos fotossintéticos nas folhas, os modelos matemáticos devem ser gerados para cada espécie e modelo de clorofilômetro portátil. Nesse sentido, é importante para a cultura do algodoeiro que seja feita a calibração do clorofilômetro portátil SPAD-502 (MINOLTA CAMERA COMPANY, 1989) visando à determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos e nitrogênio.

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer a relação entre os pigmentos fotossintéticos extraídos em DMSO, o conteúdo de nitrogênio e as leituras obtidas no clorofilômetro portátil SPAD-502 gerando modelos matemáticos capazes de prever os teores de clorofila e carotenóides em folhas de algodoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no município de Apodi, Rio Grande do Norte, na estação de pesquisas da EMPARN, utilizando o cultivar BRS 187 8H. As coordenadas geográficas da área do experimento são 5°37'19" S - 37°49'06" W e a altitude média de 129m. O clima da região é caracterizado como tropical quente e semi-árido com predominância do tipo BSw'h', da classificação climática de Köppen, e solo classificado como cambissolo eutrófico.

A semeadura ocorreu em setembro de 2008, utilizando-se 10-12 sementes por metro linear, com espaçamento entre linhas de 0,9 metros. Os demais tratamentos culturais, adubação, controle de plantas daninhas e pragas foram realizados conforme as recomendações da cultura.

Para a extração da clorofila e obtenção do índice SPAD, no estágio de florescimento pleno, foram colhidas folhas completamente expandidas com diferentes idades e tonalidades de cor, sendo as mesmas acondicionadas em sacolas plásticas, as quais foram transportadas em caixas de isopor com gelo até o laboratório de fisiologia vegetal da Embrapa Algodão.

Das folhas colhidas, foram extraídos discos foliares com área conhecida para a determinação das leituras do índice SPAD. Os discos utilizados para a extração de pigmentos possuíam área de 113 mm², e os utilizados para determinação de nitrogênio área de 225mm² cada disco. A determinação do índice SPAD em cada disco foi realizada por meio da média de cinco leituras com o clorofilômetro portátil SPAD-502 (MINOLTA CAMERA COMPANY, 1989). Aproximadamente 200 discos foliares foram utilizados, onde as leituras variaram entre 4 e 60.

Após as leituras com o clorofilômetro as amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio numerados, onde foram adicionados 5 mL de Dimetil sulfóxido (DMSO). Os tubos de ensaio foram então incubados em banho-maria a temperatura de 70 °C (HISCOX; ISRAESTAM, 1978) por um período de 150 minutos. Após o resfriamento do extrato líquido, uma alíquota de 3 mL foi utilizada para leituras em espectrofotômetro a 470, 646 e 663 nm. A partir das leituras obtidas no espectrofotômetro determinou-se o conteúdo das clorofilas *a*, *b* e total além do conteúdo de carotenóides utilizando-se as equações propostas por Wellburn (1994).

Para relacionar a concentração de nitrogênio foliar ao índice SPAD foram feitas cinco determinações desse índice em cada disco. Os discos foram agrupados em doze grupos contendo 15 discos, de acordo com a faixa de leitura obtida no clorofilômetro (0-5; 5-10; 10-15; 15-20; 20-25; 25-30; 30-35; 35-40; 40-45; 45-50; 50-55; 55-60). Os discos foram então secos em estufa com circulação forçada de ar a 60°C e determinou-se o nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl (MALAVOLTA, 1989).

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, ajustando-se modelos matemáticos que apresentassem elevados coeficientes de determinação. Para gerar os modelos matemáticos utilizaram-se as leituras do índice SPAD como variável dependente e a concentração dos pigmentos extraídos pelo método clássico e N foliar como variáveis independentes. Os gráficos e as análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software SigmaPlot 10.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 são apresentadas as relações entre as leituras nos clorofilômetros SPAD-502 e as concentrações de clorofila *a* (Figura 1a) e *b* (Figura 1b) nas folhas de algodão. O modelo matemático quadrático foi o que melhor expressou estas relações. Os coeficientes de determinação para os modelos ajustados foram de 0,90 para clorofila *a* e 0,80 para clorofila *b*.

As relações entre as leituras no clorofilômetro portátil SPAD-502 e as concentrações de carotenóides e clorofila total são apresentadas na Figura 2. O modelo matemático quadrático foi o que melhor expressou estas relações. Os coeficientes de determinação para os modelos ajustados foram de 0,90 e 0,80 para carotenóides e clorofila total, respectivamente.

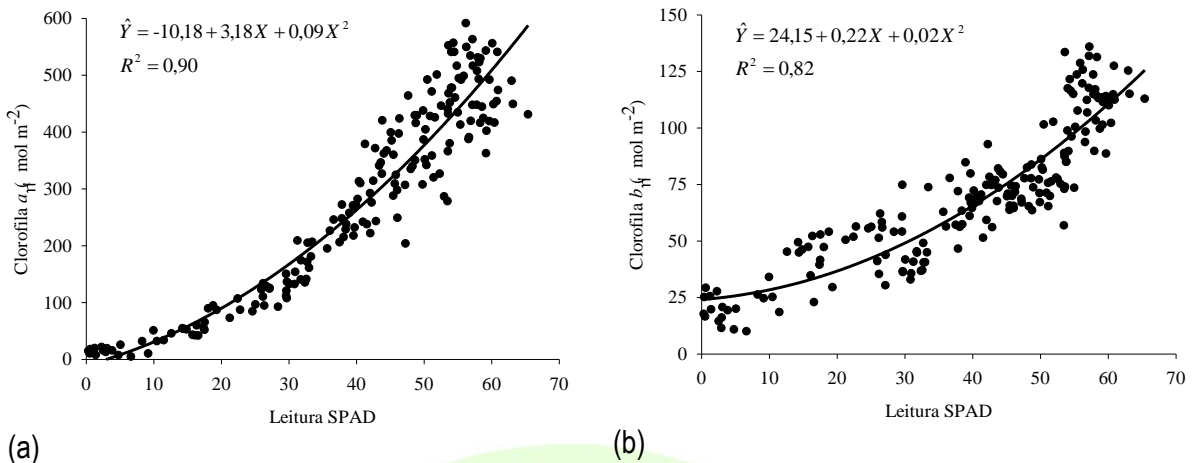


Figura 1 – Relação entre as leituras no clorofilômetro portátil SPAD-502 e a concentração de clorofila a (a) e clorofila b (b) em folhas do algodoeiro.

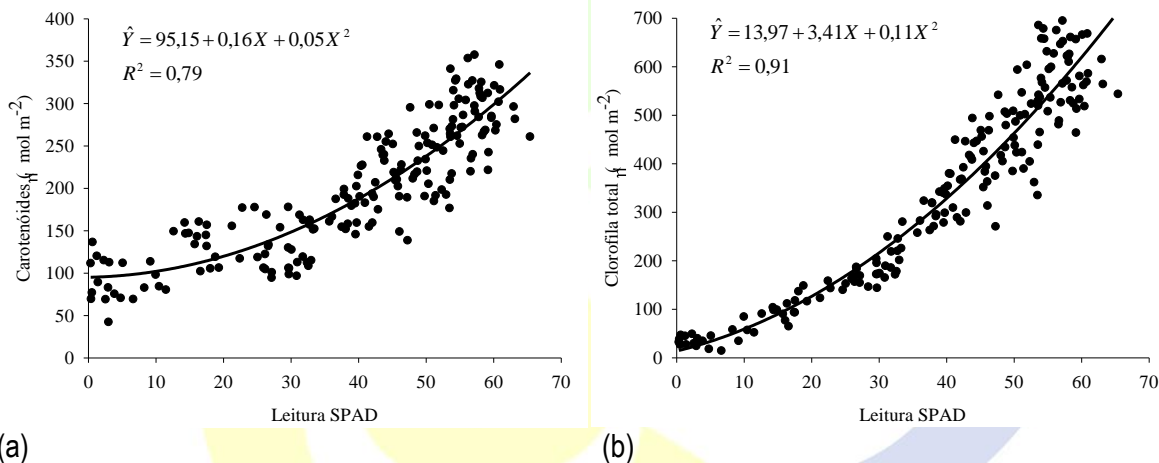


Figura 2 – Relação entre as leituras no clorofilômetro portátil SPAD-502 e a concentração de carotenóides (a) e clorofila total (b) em folhas do algodoeiro.

No presente trabalho foi obtida relação não linear entre as leituras no clorofilômetro portátil SPAD 502 e as concentrações foliares de clorofila e carotenóides. A relação entre a concentração de pigmentos da fotossíntese e as leituras obtidas em clorofilômetro portátil tem sido estabelecida em diversas espécies de plantas como a clorofila total em *Glycine max* e *Zea mays* (MARKWELL et al., 1995), clorofilas a, b, total e carotenóides em *Carica papaya* L. (TORRES NETO et al., 2002) e *Coffea canephora* Pierre (TORRES NETO et al., 2005), entre outras. Em algodão, a relação entre as leituras no clorofilômetro portátil SPAD-502 e os pigmentos da fotossíntese foi representada adequadamente pelo modelo polinomial quadrático, sugerindo que esta espécie apresenta relação semelhante às folhas de trigo, arroz, soja (MONJE; BUGBEE, 1992) e café (TORRES NETO et al., 2005). Em algumas

espécies, tanto o modelo linear como o exponencial tem sido ajustado para expressar essas relações (TORRES NETO et al., 2002).

A Figura 3a apresenta a relação entre clorofila total/carotenóides e as leituras no clorofilômetro portátil SPAD-502. As leituras obtidas no clorofilômetro permitiram estimar de maneira indireta e com elevada precisão essa relação, onde o modelo polinomial quadrático foi o de melhor representatividade com coeficiente de determinação de 0,91. Quando as leituras do índice SPAD apresentaram valores inferiores a 40 houve redução drástica da relação clorofila total/carotenóides, o que também foi verificado em folhas de *Carica papaya* L. (TORRES NETO et al., 2002) e *Coffea canephora* Pierre (TORRES NETO et al., 2005). Essa drástica redução na relação entre clorofila e carotenóides pode ser decorrente do início do processo de senescência das folhas (BUCKLAND et al., 1991).

A relação entre clorofila a/b e o índice SPAD é apresentada na Figura 3b. Semelhantemente às demais características avaliadas, o modelo quadrático foi o que melhor se ajustou aos dados com coeficiente de determinação de 0,73. De maneira semelhante ao que ocorreu com a relação entre clorofila total/carotenóides, a relação entre clorofila a/b apresentou drástica redução nas leituras do SPAD-502 com valores abaixo de 40. Provavelmente, essa redução ocorreu devido à clorofila a ser degradada mais intensamente do que a clorofila b (WOLF, 1956).

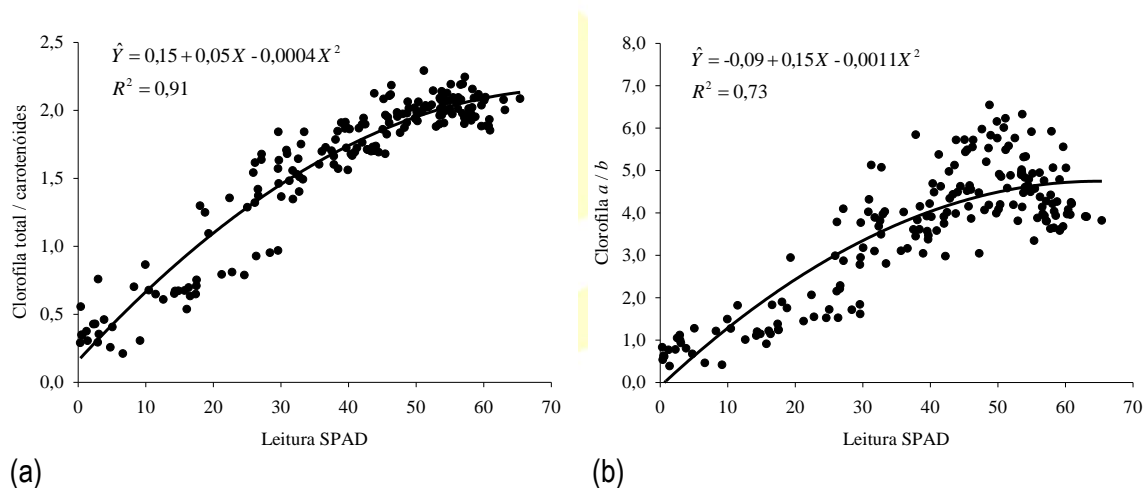


Figura 3 – Leituras obtidas no clorofilômetro portátil SPAD-502 e as relações entre clorofila total/carotenóides (a) e clorofila a/b (b) em folhas do algodoeiro.

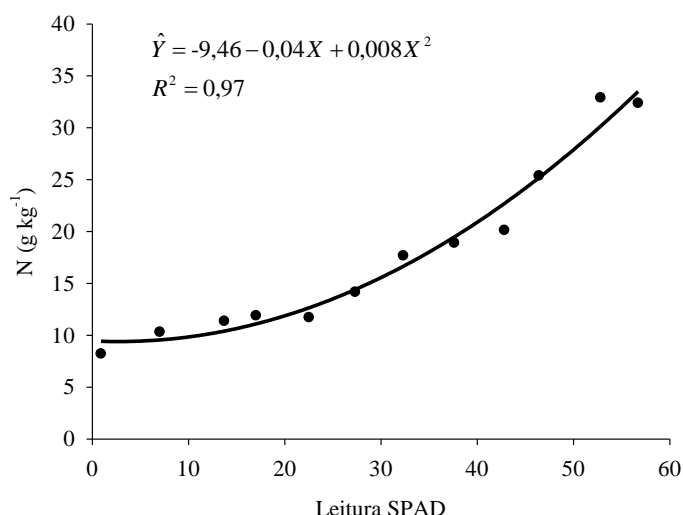


Figura 4 – Relação entre as leituras no clorofilômetro portátil SPAD-502 e a concentração de N nas folhas do algodoeiro.

Na Figura 4 é apresentada a relação entre índice SPAD e o conteúdo de nitrogênio. Da mesma forma que para as outras variáveis analisadas, observou-se decréscimo no conteúdo de nitrogênio total quando os valores do índice SPAD foram inferiores a 40.

Com os resultados deste trabalho, foi possível a obtenção de modelos matemáticos que associados às leituras obtidas com o clorofilômetro portátil SPAD-502 possibilitam a predição da concentração dos pigmentos da fotossíntese e de nitrogênio em folhas de algodão herbáceo de maneira simples e com elevado grau de precisão, economia de recursos, espaço físico e tempo no processamento de amostras, comumente demandados nestas análises.

CONCLUSÃO

O determinador portátil de clorofila pode ser utilizado para estimar a concentração dos pigmentos fotossintéticos e de nitrogênio em folhas de algodoeiro, economizando tempo, espaço e recursos comumente demandados nestas análises.

CONTRIBUIÇÃO PRÁTICA E CIENTÍFICA DO TRABALHO

A obtenção de modelos matemáticos que estimam a concentração de pigmentos da fotossíntese e de nitrogênio a partir de leituras feitas nas folhas por meio de clorofilômetro portátil, permite a realização das determinações sem destruir a amostra, além de simplificar os procedimentos laboratoriais, bem como reduzir o consumo de reagentes químicos normalmente utilizados nos procedimentos convencionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F. da; BORTOLINI, C. G. Clorofila na folha como indicador do nível de nitrogênio em cereais. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 715-722. 2001.
- BUCKLAND, S. M.; PRICE, A. H.; HENDRY, G. A. F. The role of ascorbate in drought-treated *Cochlearia atlantica* Poved. and *Armeria maritime* (Mill.) Willd. **New Phytologist**, v. 119, p. 155-160, 1991.
- EVANS, J. R. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. **Oecologia**, v. 78, p. 9-19, 1989.
- HÁK, R.; RINDERLE-ZIMMER, U.; LICHTENTHALER, H. K.; NÁTR, L. Chlorophyll a fluorescence signatures of nitrogen deficient barley leaves. **Photosynthetica**, v. 28, p.151-159, 1993.
- HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1332-1334, 1979.
- INSKEEP, W. P.; BLOOM, P. R. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. **Plant Physiology**, v. 77, p. 483-485, 1985.
- LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, p. 591-592, 1983.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, J. G. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, 1989. p. 201 p.
- MARINI, R. P. Do net gas exchange rates of green and red peach leaves differ? **Hortscience**, v. 21, p. 118-120, 1986.
- MARKWELL, J.; OSTERMAN, J. C.; MITCHELL, J. L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**, v. 46, p. 467-472, 1995.
- MINOLTA CAMERA COMPANY. Radiometric Instruments Divisions. **Chlorophyll meter SPAD-502. Instruction Manual**. Osaka, 1989. 22 p.
- MONJE, O. A.; BUGBEE, B. Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: A comparison of two types of meters. **Hortscience**, v. 27, p. 69-71, 1992.
- MORAN, R. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-dimethylformamide. **Plant Physiology**, v. 69, p. 1376-1381, 1982.
- MORAN, R.; PORATH, D. Chlorophyll determinations in intact tissue using N,N-dimethylformamide. **Plant Physiology**, v. 65, p. 478-479, 1980.
- SHOAF, T. W.; LIUM, B. W. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulphoxide. **Limnology and Oceanography**, v. 21, p. 926-928, 1976.

THIELE, A.; KRAUSE, G. H.; WINTER, K. *In situ* study of photoinhibition of photosynthesis and xanthophylls cycle activity in plants growing in natural gaps of the tropical forest. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 25, p. 189-195, 1998.

TORRES NETO, A.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J. G.; SMITH, R. E. B. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 104 p. 199-209, 2005.

TORRES NETO, A.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J. G.; YAMANISHI, O. K. Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya*. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14, n. 3, p. 203–210, 2002.

TUCKER, C. J. Asymptotic nature of grass canopy spectral reflectance. **Applied Optics**, v. 16, p.1151–1156, 1977.

WASKOM, R. M.; WESTFALL, D. G.; SPELLMAN, D. E.; SOLTANPOUR, P. N. Monitoring nitrogen status of corn with a portable chlorophyll meter. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 27, p. 545- 560, 1996.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total Carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal Plant Physiology**, v. 144, p. 307-313, 1994.

WOLF, F.T. Changes in chlorophylls a and b in autumn leaves. **American Journal of Botany**, v. 43, p. 714–718, 1956.