

Quantificação não destrutiva do conteúdo de clorofilas em folhas de milho através de método colorimétrico

Cassandro Vidal Talamini do Amarante¹; Cristiano André Steffens¹; Mayara Cristina Stanger¹; Leonora Mansur Mattos²

¹UDESC-CAV, Av. Luiz de Camões, 2090, 88502-970 Lages-SC, amarante@cav.udesc.br, steffens@cav.udesc.br, mayara.stanger@hotmail.com; ²Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70359-970, Brasília-DF, leonora@cnph.embrapa.br

RESUMO

Este trabalho foi conduzido visando avaliar a viabilidade da utilização de um colorímetro, como alternativa ao medidor de clorofila, para a quantificação não destrutiva de clorofilas em folhas de milho. Folhas do híbrido de milho P30F53, com tonalidades variando do verde amarelado a verde-escuro, foram avaliadas nas faces adaxial e abaxial, com um medidor de clorofila (Minolta SPAD-502) e um colorímetro (Minolta CR-400, no espaço de cores L , C e h°), seguido de quantificações destrutivas de clorofilas totais. Os valores de leitura do medidor de clorofila e da relação $h^\circ/(LxC)$ do colorímetro aumentaram com o incremento no conteúdo total de clorofilas. Os resultados obtidos demonstram que o colorímetro é uma alternativa viável na avaliação não destrutiva do conteúdo de clorofilas totais ($\mu\text{g cm}^{-2}$), e as leituras são pouco influenciadas por diferenças nas faces das folhas de milho. Para tanto, os valores da relação $h^\circ/(LxC)$ do colorímetro devem ser previamente calibrados com a extração de clorofilas das folhas do híbrido de interesse, assim como ocorre com o SPAD-502.

PALAVRAS-CHAVE: *Zea mays*, coloração da folha, propriedades ópticas, absorvância, refletância.

ABSTRACT

Non-destructive quantification of total chlorophylls in maize leaves with colorimetric method

This work was carried out to evaluate the viability of using a chroma meter as an alternative to the leaf chlorophyll meter for non-destructive quantification of chlorophylls in maize leaves. Maize leaves of hybrid P30F53, with colors ranging from yellow-green to dark green, were assessed on the adaxial and abaxial faces with the chlorophyll meter (SPAD-502) and the chroma meter (Minolta CR-400, at the L , C , and h° color space), and, thereafter, destructively assessed for total chlorophylls. The chlorophyll meter reading and the $h^\circ/(LxC)$ ratio for the chroma meter increased with the increment of chlorophylls in all maize hybrids. The results showed that the chroma meter is a viable alternative for non-destructive assessment of total chlorophylls ($\mu\text{g.cm}^{-2}$), with readings being little affected by differences on faces of maize leaves. Nevertheless, this requires the calibration between the $h^\circ/(LxC)$ ratio of the chroma meter and the chlorophylls extracted from leaves of concerned hybrid, as required for the SPAD-502.

Keywords: *Zea mays*, leaf color, optical properties, absorbance, reflectance.

O milho é uma das culturas mais importantes para a humanidade, devido a seu alto potencial produtivo e às diversas formas de utilização na alimentação humana e animal,

AMARANTE CVT; STEFFENS CA; STANGER MC; MATTOS LM. 2012. Quantificação não destrutiva do conteúdo de clorofilas em folhas de milho através de método colorimétrico. Horticultura Brasileira 30: S1693-S1697.

in natura e na indústria de alta tecnologia (Rocha *et al.*, 2011). O seu cultivo visando a produção de milho-verde é promissor em todo o País (Cruz & Pereira Filho, 2003).

A quantificação do conteúdo de clorofilas em folhas de milho é importante no estudo de resposta das plantas às técnicas de nutrição e manejo que visam aumentar o potencial fotossintético e a produtividade (Driscoll *et al.*, 2006). O equipamento Minolta SPAD-502 tem sido utilizado na quantificação de clorofilas em milho (Magalhães *et al.*, 2009), caracterizando-se pela rapidez, simplicidade e, principalmente, por possibilitar uma avaliação não destrutiva do tecido foliar. Todavia, como o equipamento fornece uma leitura em unidades arbitrárias (leitura SPAD), recomenda-se que o mesmo seja calibrado com as extrações de clorofilas da cultura de interesse (Uddling *et al.*, 2007). O colorímetro Minolta CR também pode ser utilizado para a avaliação não destrutiva da coloração de tecidos vegetais, no espaço de cores L , C e h° , que indicam valores de brilho ('lightness'), cromaticidade e ângulo 'hue', respectivamente (Amarante *et al.*, 2007). Os valores de h° do equipamento permitem quantificar o conteúdo de clorofilas em folhas (folha verde intensa, com elevado conteúdo de clorofila, apresentando h° próximo de 180° , e folha clorótica, com baixo conteúdo de clorofila, apresentando h° próximo de 90°). Em adição ao h° , os valores de L permitem detectar tonalidades de verde (valores baixos correspondem à coloração verde-escura e valores altos à coloração verde-clara), enquanto os valores de C identificam a pureza da cor (caracterizada por altos valores de C).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de utilização do colorímetro, como alternativa ao emprego do medidor de clorofila SPAD-502, para a quantificação não destrutiva dos conteúdos de clorofilas em folhas de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 20 folhas do híbrido de milho P30F53, em lavoura localizada no município de Lages, SC. As plantas estavam em pleno desenvolvimento vegetativo (janeiro/2012), sendo coletadas folhas que apresentavam coloração variando de verde-amarelado (clorótica) a verde-escuro. Em cinco pontos de cada folha, nas faces adaxial (superior) e abaxial (inferior), foram feitas leituras utilizando o medidor portátil de clorofila SPAD-502 e o colorímetro CR-400 (ambos da Konica Minolta®, Japão), procedendo-se ao cálculo da média das leituras por folha. Com o colorímetro CR-400

AMARANTE CVT; STEFFENS CA; STANGER MC; MATTOS LM. 2012. Quantificação não destrutiva do conteúdo de clorofilas em folhas de milho através de método colorimétrico. Horticultura Brasileira 30: S1693-S1697.

foi quantificada a cor no espaço de cores L , C e h^o , sendo as folhas colocadas sobre superfície branca (folha de papel branco), para evitar qualquer interferência da cor dessa superfície nas leituras de refletância.

Em cada folha, nos mesmos pontos onde foram feitas as leituras de cor com o SPAD-502 e o colorímetro CR-400, com o auxílio de um furador de rolha, foram removidos discos ($\varnothing=1,8\text{cm}$), nos quais foi determinada a área total (com um integrador de área foliar LI-COR modelo LI-3050A). Os cinco discos de cada folha foram imediatamente macerados em acetona (80%), para a extração e quantificação do conteúdo de clorofila total ($\mu\text{g cm}^{-2}$), segundo metodologia descrita por Arnon (1949).

Foram feitas análises de regressão linear e não-linear entre as leituras obtidas, com o auxílio dos dois equipamentos, nas faces adaxial e abaxial, e o conteúdo total de clorofilas quantificado nas folhas, utilizando o programa SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve aumento nos valores de leitura do medidor de clorofila SPAD-502, e nos valores da relação $h^o/(L \times C)$, dos atributos de cor quantificados com o colorímetro CR-400, nas faces adaxial e abaxial, com o aumento nos conteúdos totais de clorofilas nas folhas de milho (Figura 1). De forma geral, os modelos ajustados entre conteúdos de clorofilas e os valores da relação $h^o/(L \times C)$ do colorímetro apresentaram valores similares de R^2 , comparativamente aos modelos ajustados para leituras do medidor de clorofila SPAD-502, nas faces adaxial e abaxial. No entanto, enquanto o modelo ajustado entre leitura do medidor de clorofila SPAD-502 e conteúdo de clorofila foi linear, o modelo ajustado entre valores da relação $h^o/(L \times C)$ e conteúdo de clorofilas seguiu modelo assintótico (Figura 1).

Os modelos ajustados entre a relação $h^o/(L \times C)$ do colorímetro CR-400 e os conteúdos totais de clorofilas apresentaram valores semelhantes de R^2 , ao compararmos medições feitas com o equipamento nas faces adaxial e abaxial (Figuras 1). O mesmo ocorreu para medições feitas com o SPAD-502 (Figura 1). Portanto, tanto o medidor de clorofila SPAD-502 como o colorímetro CR-400, proporcionam boa estimativa dos conteúdos de clorofilas, e não sofrem influência substancial de diferenças na superfície das folhas, como verificado nos modelos ajustados para a quantificação nas faces adaxial e abaxial.

AMARANTE CVT; STEFFENS CA; STANGER MC; MATTOS LM. 2012. Quantificação não destrutiva do conteúdo de clorofilas em folhas de milho através de método colorimétrico. *Horticultura Brasileira* 30: S1693-S1697.

Os resultados obtidos demonstram a viabilidade técnica de utilização do colorímetro CR-400 na avaliação quantitativa não destrutiva dos conteúdos totais de clorofilas em folhas de milho, através do cálculo da relação $h^o/(L \times C)$. Todavia, deve-se ressaltar que, à semelhança do que ocorre com o SPAD-502, devem ser tomados cuidados quanto à idade/posição da folha, estágio fenológico e condições ambientais de desenvolvimento da planta, procedendo-se à calibração do colorímetro com as extrações de clorofilas do genótipo de interesse.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE CVT; STEFFENS CA; MOTA CS; SANTOS HP. 2007. Radiação, fotossíntese, rendimento e qualidade de frutos em macieiras 'Royal Gala' cobertas com telas antigranizo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 925-931.
- ARNON DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
- CRUZ JC; PEREIRA FILHO IA. 2003. Manejo e tratos culturais. *In*: p.31- 44. *O cultivo do milho-verde*. PEREIRA FILHO IA (ed). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília - DF.
- DRISCOLL SP; PRINS A; OLMOS E; KUNERT KJ; FOYER CH. 2006. Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO₂ enrichment in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* 57: 381-390.
- MAGALHÃES PC; SOUZA TC; ALBUQUERQUE PEP; KARAM D; MAGALHÃES MM; CANTAO FRO. 2009. Caracterização ecofisiológica de linhagens de milho submetidas à baixa disponibilidade hídrica durante o florescimento. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 8: 223-232.
- ROCHA DR; FORNASIER FILHO D; BARBOSA JC. 2011. Efeitos da densidade de plantas no rendimento comercial de espigas verdes de cultivares de milho. *Horticultura Brasileira* 29: 392-397.
- UDDLING J; GELANG-ALFREDSSON J; PIIKKI K; PLEIJEL H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Journal Photosynthesis Research* 91: 37-46.

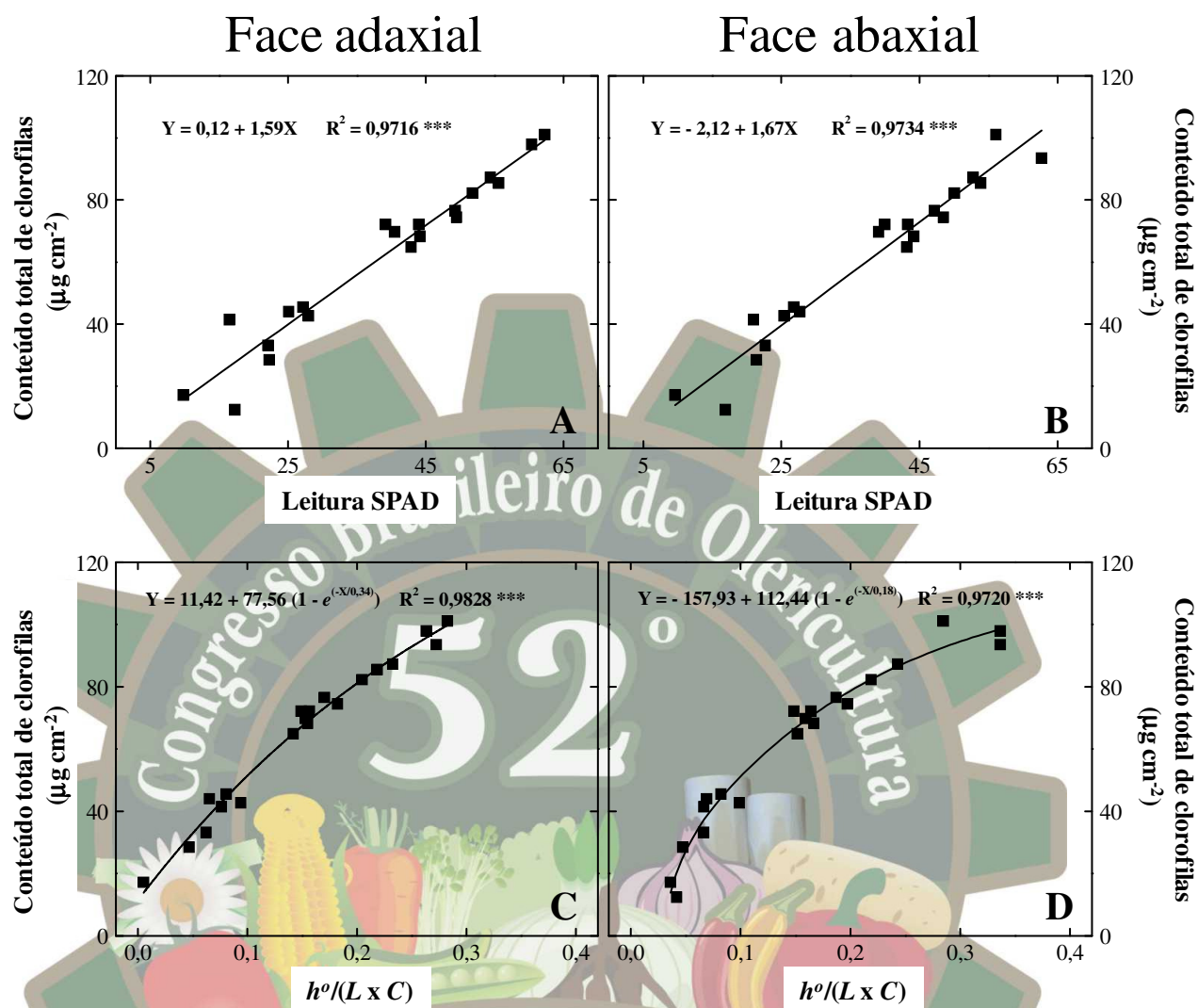


Figura 1: Valores de leitura do SPAD-502 (A e B) e do atributo de cor $h^o/(L \times C)$ do colorímetro CR-400 (C e D), nas faces adaxial e abaxial, em relação ao conteúdo total de clorofilas ($\mu\text{g cm}^{-2}$), em folhas de milho híbrido P30F53. ***: modelo altamente significativo ($p < 0,001$). Lages, CAV/UEDESC, 2012.