

O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas

Simone Verdes de JESUS¹, Ricardo Antonio MARENCO²

RESUMO

A relação entre o teor absoluto de clorofila e o teor relativo de clorofila obtido pelo SPAD-502 foi determinada em quatro espécies frutíferas (cupuaçu, araçá-boi, limão e urucum). O teor absoluto de clorofila foi determinado usando um espectrofotômetro após a extração dos pigmentos em acetona 80%. O teor de clorofila total (y) foi relacionado com os valores do SPAD (x), como segue: $y = 93,95e^{0,0356x}$, $r^2 = 0,80$ para o urucum; $y = 125,41e^{0,0205x}$, $r^2 = 0,67$ para o cupuaçu; $y = 67,58e^{0,0374x}$, $r^2 = 0,80$ para o limão e $y = 66,96e^{0,0365x}$, $r^2 = 0,92$ para o araçá-boi.

PALAVRAS-CHAVE: Clorofilômetro, *Bixa orellana*, *Citrus limon*, *Eugenia stipitata*, *Theobroma grandiflorum*.

The SPAD-502 as alternative for determining chlorophyll content in fruit tree species

ABSTRACT

The relationship between the absolute chlorophyll content and the relative chlorophyll content (SPAD-502 values) was determined in four fruit trees species (cupuassu, araza, lemon, and annato). The absolute chlorophyll content was determined using a spectrophotometer after pigment extraction in 80% acetone. Chlorophyll content (y) was related to SPAD values (x) as follows: $y = 93.95e^{0.0356x}$, $r^2 = 0.80$ for annato; $y = 125.41e^{0.0205x}$, $r^2 = 0.67$ for cupuassu; $y = 67.58e^{0.0374x}$, $r^2 = 0.80$ for lemon and $y = 66.96e^{0.0365x}$, $r^2 = 0.92$ for araza.

KEY WORDS: Chlorophyll meter, *Bixa orellana*, *Citrus limon*, *Eugenia stipitata*, *Theobroma grandiflorum*.

¹ Estudante de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM. Bolsista PIBIC-CNPq-INPA simone.verdes@hotmail.com

² Pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA-CPST), Av. Efigênio Sales 2239, Manaus, AM - Bolsista do CNPq, rmarenco@inpa.gov.br

As clorofilas são pigmentos responsáveis pela captura de luz usada na fotossíntese, sendo elas essenciais na conversão da radiação luminosa em energia química, na forma de ATP e NADPH. Assim, as clorofilas estão relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente com seu crescimento e adaptabilidade aos diferentes ambientes. Tradicionalmente os métodos utilizados para determinação do teor de clorofila requerem destruição das folhas, o que é uma desvantagem em estudos que visem determinar o efeito da ontogenia da folha no grau de esverdeamento. Além disso, esses métodos são muito demorados e onerosos. Na década de 90 foi disponibilizado um equipamento capaz de gerar grandezas relacionadas com os teores de clorofila, o clorofilômetro Soil Plant Analysis Development (SPAD-502, Minolta, Japão). Esse instrumento é portátil e fornece leituras que podem se relacionar com o teor de clorofila presente na folha. Permite medições de forma rápida (poucos segundos) e prática, ainda em campo a um custo baixo. Entre outras utilidades, o SPAD-502 pode ser usado para a determinação do estresse hídrico, por exemplo em *Vitis vinifera* L. (Fanizza *et al.*, 1991), para avaliar o efeito da severidade de doenças, como da mancha foliar no trigo (Rosyara *et al.*, 2007) ou para determinar o grau de severidade do ataque por micoplasmas em *Fraxinus pennsylvanica* Marsh (Sinclair *et al.*, 1997). Devido à alta correlação que existe entre os teores de nitrogênio e clorofila (Evans, 1983; Marengo e Lopes, 2007), um dos usos principais do SPAD-502 tem sido para estimar o teor de nitrogênio da folha, em culturas, tais como: milho (Argenta *et al.*, 2001), batata (Gil *et al.*, 2002), tomate (Guimarães *et al.*, 1999) e arroz (Turner e Jund, 1991).

O clorofilômetro possui diodos que emitem radiação em 650 nm (luz vermelha) e 940 nm (radiação infravermelha). Durante a mensuração a luz passa pela folha e é recebida por um fotodiodo de silicônio onde é convertida primeiramente em sinais elétricos analógicos e depois em sinais digitais. Esses sinais passam por um microprocessador que calcula valores proporcionais aos de teor de clorofila presente na folha (Minolta, 1989). A absorvância das clorofilas é muito eficiente em 650 nm, mas é desprezível em 940 nm (Minolta, 1989; Marengo e Lopes, 2007). Desse modo, o sinal derivado da emissão em 650 nm serve de base para o cálculo do teor relativo de clorofila, conquanto que o sinal originado da emissão em 940 nm serve como um fator de correção para compensar pela absorção de fótons em 650 nm por moléculas do tecido foliar desprovidas de clorofila. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação que existe entre os valores obtidos pelo clorofilômetro e os teores absolutos de clorofila em folhas de quatro espécies frutíferas.

O estudo foi realizado no Campus V8 do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM (03° 05'30"S; 59° 59' 35" O; 93 m de altitude). O clima é equatorial úmido

com precipitação média anual de 2285 mm (1961 a 1990), temperatura média de 26,6 °C e umidade média do ar de 83% (Inmet, 2008). Os dados foram coletados tanto na época seca (agosto e setembro de 2006) como na chuvosa (outubro de 2006 a janeiro de 2007) com a finalidade de favorecer gradientes nos teores de clorofila das folhas.

As espécies estudadas, selecionadas pelo potencial comercial de seus frutos, foram: cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum., Sterculiaceae), limão (*Citrus limon* L., Rutaceae), urucum (*Bixa orellana* L., Bixaceae) e araçá-boi (*Eugenia stipitata* Mac Vaugh, Myrtaceae). O teor relativo de clorofila foi obtido usando um clorofilômetro (SPAD-502, Minolta, Osaka, Japão), conquanto que os teores absolutos de clorofila foram determinados em laboratório. Em cada espécie foram selecionadas folhas com diferentes graus de esverdeamento, no intuito de se obter um gradiente nos teores de clorofila. Com essa finalidade selecionaram-se folhas de diferentes idades desde muito novas (com baixos teores de clorofila) até maduras e completamente expandidas, com altos teores de clorofila.

As leituras com o SPAD-502 foram feitas em três pontos a cada lado da nervura central da folha, na face adaxial da folha. Após as leituras, as folhas foram destacadas mantendo-se o pecíolo submerso em um recipiente com água para evitarem a desidratação e atingirem alto grau de hidratação antes da análise laboratorial. Seguidamente as folhas foram levadas ao laboratório para determinação do teor de clorofila. De cada uma das folhas foram retirados seis discos de 5 mm de diâmetro, dos mesmos pontos onde tinham sido feitas as leituras com o clorofilômetro. A extração do teor absoluto de clorofila foi feita pelo método de Arnon (Arnon, 1949), utilizando acetona 80% (10 mL/amostra), quartzo (20 mg/ amostra para facilitar a maceração) e carbonato de magnésio (10 mg/amostra, para evitar alteração no pH). O quartzo e o carbonato de magnésio foram adicionados por ocasião da maceração do tecido. As amostras foram maceradas e depois filtradas, usando papel filtro tipo 10. A absorvância da clorofila foi medida em 645 nm (A_{645}) e 663 nm (A_{663}) utilizando um espectrofotômetro (Spectrum SP-2000, China). As concentrações absolutas de clorofila *a* e *b* foram obtidas de acordo com as equações:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg m}^{-2}\text{)} = 12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645} \times \text{FD}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg m}^{-2}\text{)} = 22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663} \times \text{FD}$$

Onde FD é fator de diluição que leva em conta o volume de solução cloroplastídica e a área da amostra foliar, FD (L m²). O teor de clorofila total foi obtido como o somatório das concentrações de clorofilas *a* e *b*. Os valores obtidos com o clorofilômetro (SPAD-502) foram relacionados com os teores absolutos de clorofila extraídos em laboratório, mediante análise de regressão, tendo-se os teores de clorofila como variável dependente (*y*) e os valores de SPAD como

variável independente (x). Foi utilizado o programa Excel®, para gerar as equações.

Os teores de clorofila *a* oscilaram entre 50 e 500 mg m⁻² nas espécies estudadas e os coeficientes de determinação (r²) variaram entre 0,75 e 0,91 (Figura 1). A relação entre os teores de clorofila *b* e os valores de SPAD mostrou coeficientes de determinação (r²) entre 0,39 e 0,87. Os teores de clorofila *b* oscilaram entre 25 e 400 mg m⁻² (Figura 2). Nossos resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Argenta *et al.*

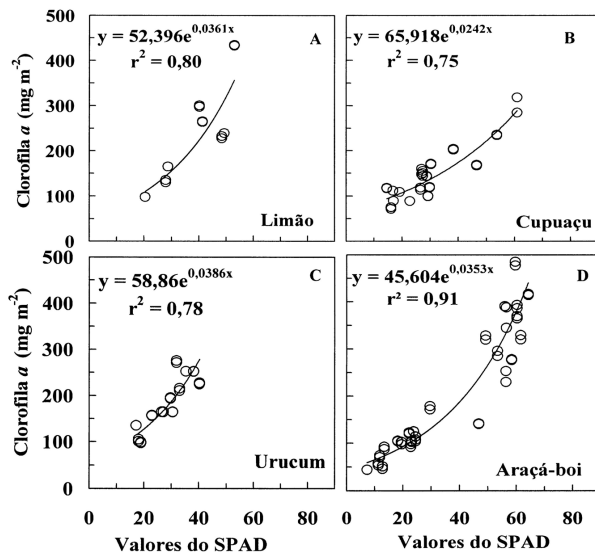


Figura 1- Relação entre os valores de SPAD e os teores de clorofila *a* por unidade de área em limão (A), cupuaçu (B), urucum (C) e araçá-boi (D). Cada ponto representa a média de uma folha.

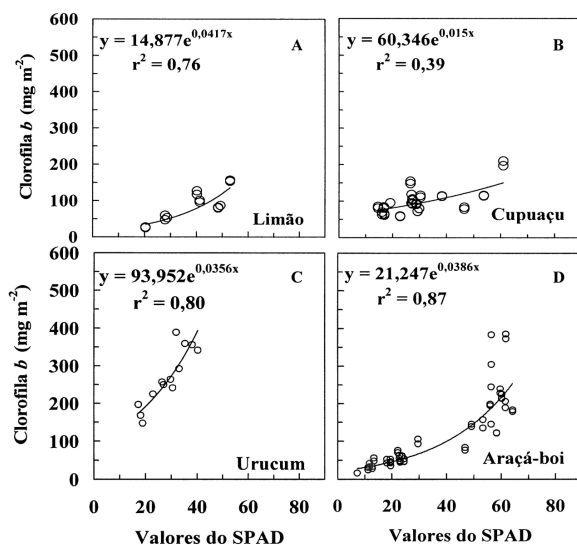


Figura 2- Relação entre os valores de SPAD e os teores de clorofila *b* expressos por unidade de área em limão (A), cupuaçu (B), urucum (C) e araçá-boi (D). Cada ponto representa a média de uma folha.

(2001) que obtiveram coeficientes de determinação entre 0,72 e 0,98 para clorofila *a* e *b* em folhas de milho.

O teor de clorofila total oscilou entre 50 e 700 mg m⁻², sendo os teores maiores encontrados no araçá-boi (750 mg m⁻²) (Figura 3). Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (Björkman e Demmig, 1987). O coeficiente de determinação (r²) mais alto (0,92) foi obtido no araçá-boi. O fato do cupuaçu apresentar uma lâmina foliar mais espessa provavelmente contribuiu para a menor eficiência do clorofilômetro (medida pelo valor de r², que se igualou a 0,67). O teor máximo de clorofila total no cupuaçu foi de 450 mg m⁻².

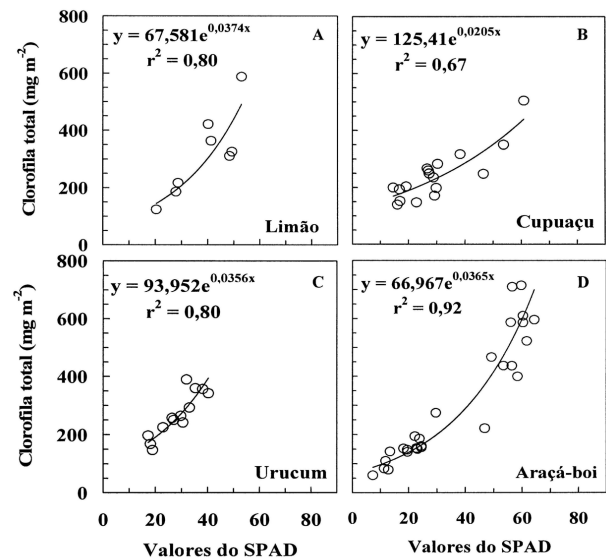


Figura 3 - Relação entre os valores de SPAD e os teores de clorofila total expressos por unidade de área em limão (A), cupuaçu (B), urucum (C) e araçá-boi (D). Cada ponto representa a média de uma folha.

O estudo mostrou que para se obter a máxima precisão do instrumento é recomendado que o SPAD-502 seja calibrado sempre que uma nova espécie esteja sendo estudada. A falta de linearidade entre os teores relativos (obtidos pelo clorofilômetro) e os teores absolutos de clorofila, observada neste estudo, sugere que a distribuição da clorofila na superfície da folha apresenta certa desuniformidade, sobretudo em folhas bem esverdeadas o que pode levar a uma subestimação dos valores do SPAD em folhas com altos teores de clorofila (Uddling *et al.*, 2007).

AGRADECIMENTOS

Ao MCT/INPA, à FAPEAM (projeto PIPT-1746-2008), ao CNPq pela concessão de bolsas. A Dra. Rosalee A. Coelho Netto, pela assistência na condução desta pesquisa.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Argenta, G.; Silva, P.R.F.; Bortolini, C.G.; Forsthofer, E.L.; Strieder, M.L. 2001. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 13: 158-167.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1-15.
- Björkman, O.; Demming, B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 489-504.
- Evans, J.R. 1983. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.*, 72: 297-302.
- Fanizza, G.; Ricciard, L; Bagnulo, C. 1991. Leaf greenness measurements to evaluate water stressed genotypes in *Vitis vinifera*. *Euphytica*, 55: 27-31.
- Gil, P.T.; Fontes, P.C.R.; Cecon, P.R.; Ferreira, F.A. 2002. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio e para o prognóstico da produtividade da batata. *Hortic. Bras.*, 20: 611- 615.
- Guimarães, T.G.; Fontes, P.C.R.; Pereira, P.R.G.; Alvarez, V.H.; Monnerat, P.H. 1999. Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivados em dois tipos de solo. *Bragantia*, 58: 209-216.
- INMET. 2008. (<http://www.inmet.gov.br/html/clima.php>). Acesso: 06/06/08).
- Marenco, R.A.; Lopes, N.F. 2007. *Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*. 2 ed. Editora UFV, Viçosa, MG. 469 pp.
- Minolta. 1989. Chlorophyll meter SPAD-502. *Instruction manual*. Minolta Co., Osaka, Japan. 22 pp.
- Sinclair, W.A.; Whitlow, T.H.; Griffiths, H.M. 1997. Heritable tolerance of ash yellows phytoplasmas in green ash. *Can. J. For. Res.*, 27: 1928-1935.
- Rosyara, U.R.; Duveiller, E.; Pant, K.; Sharma, R.C. 2007. Variation in chlorophyll content, anatomical traits and agronomic performance of wheat genotypes differing in spot blotch resistance under natural epiphytotic conditions. *Aust. Plant Pathol.*, 36: 245-251.
- Tuner, F.T.; Jund, M.F. 1991. Chlorophyll meter to predict nitrogen topdress requirement for semidwarf rice. *Agron. J.*, 83: 926-928.
- Uddling, J.; Gelang-Alfredsson, J.; Piikki, K.; Pleijel, H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynth. Res.*, 91: 37-46

Recebido em 23/11/2007

Aceito em 29/06/2008