

## NOTAS CIENTÍFICAS

### Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho<sup>(1)</sup>

Lincoln Zotarelli<sup>(2)</sup>, Eduardo Garcia Cardoso<sup>(2)</sup>, Jorge Luiz Piccinin<sup>(2)</sup>, Segundo Urquiaga<sup>(3)</sup>, Robert Michael Boddey<sup>(3)</sup>, Eleno Torres<sup>(2)</sup> e Bruno José Rodrigues Alves<sup>(3)</sup>

Resumo – O objetivo deste trabalho foi calibrar o medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação da nutrição nitrogenada das plantas de milho, baseando-se na prévia comparação das leituras de clorofila com os teores obtidos pelos extratores N,N-dimetilformamida (DMF) e acetona 80%. No campo, foram avaliados os teores de clorofila em folhas de milho cultivado sob plantio direto após a cultura de aveia-preta e após a de tremoço-branco, por duas safras consecutivas. A extração da clorofila com a solução DMF, por 72 horas, foi a mais indicada para a calibração do medidor de clorofila SPAD-502 na cultura do milho. O ajuste do modelo linear expressou melhor a relação entre o conteúdo de clorofila e as leituras do SPAD na cultura do milho, e seu uso produziu resultados coerentes com o estado nutricional da cultura.

Termos para indexação: *Avena strigosa*, *Lupinus albus*, adubo verde, estado nutricional.

#### Calibration of a Minolta SPAD-502 chlorophyll meter for evaluation of the nitrogen nutrition of maize

Abstract – The subject of this study was the calibration of a Minolta SPAD-502 chlorophyll meter for evaluation of the N nutrition of maize, firstly comparing the chlorophyll readings to the contents obtained from either 80% acetone or N,N-dimethylformamide (DMF) chlorophyll extractors. The chlorophyll of the maize leaves cultivated under zero-tillage after oat and lupin for two consecutive harvests was evaluated in a field experiment. The chlorophyll extraction after 72 hours in DMF solution, was the most suitable for the calibration of the SPAD-502 chlorophyll meter for maize and its use was coherent with the nutritional status of the crop.

Index terms: *Avena strigosa*, *Lupinus albus*, green manures, nutritional status.

---

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 24 de julho de 2003.

<sup>(2)</sup> Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. E-mail: lincoln@cnpso.embrapa.br, egarcia@cnpso.embrapa.br, piccinin@cnpso.embrapa.br, eleno@cnpso.embrapa.br

<sup>(3)</sup> Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, BR 465, Km 47 CEP 23890-000 Seropédica, RJ. Bolsista do CNPq. E-mail: urquiaga@cnpab.embrapa.br, bob@cnpab.embrapa.br, bruno@cnpab.embrapa.br

A determinação da clorofila é tradicionalmente realizada pela extração dos solutos foliares e posterior determinação espectrofotométrica, utilizando comprimentos de onda na região do vermelho do espectro de luz visível. A atividade fotossintética, o conteúdo de proteínas solúveis, de N, macronutrientes e micronutrientes existentes nas folhas são variáveis e podem ser correlacionadas com o conteúdo de clorofila no tecido foliar (Rajcan et al., 1999). Por isso, o medidor de clorofila Minolta SPAD-502 tem sido investigado como instrumento para rápido diagnóstico do estado nutricional de diversas culturas em relação ao conteúdo de N, agregando vantagens como a simplicidade no uso, além de possibilitar uma avaliação não-destrutiva do tecido foliar (Argenta et al., 2001).

Em plantas de milho, a concentração de N, de clorofila e as leituras fornecidas pelo SPAD-502 estão positivamente correlacionadas (Castelli et al., 1996; Argenta et al., 2001), exceto nos estádios iniciais de desenvolvimento em que a leitura realizada com o SPAD tem sua precisão reduzida (Argenta et al., 2001). Em situações em que a disponibilidade de N é grande, as leituras do SPAD-502 e o conteúdo de clorofila são pouco correlacionados, porque o potencial do sistema fotossintético já se encontra estabelecido e atuante na conversão de energia luminosa em energia química, e o excedente de N se encontra na forma de outros compostos de reserva (Argenta et al., 2001).

Apesar da relação entre o teor de N e o conteúdo de clorofila ter sido demonstrada, os modelos que descrevem esta relação variam entre as culturas e para uma mesma cultura, pois os métodos empregados na calibração do medidor, e as características do próprio medidor, exigem calibrações independentes (Markwell et al., 1995). No processo de extração da clorofila, por exemplo, diferentes solventes têm sido utilizados, porém, a maioria deles necessita da moagem e centrifugação do material vegetal com ou sem aquecimento. Os extratores de clorofila N,N-dimetilformamida (DMF) e acetona na concentração de 80% (v/v), têm sido utilizados para dispensar os processos de moagem, centrifugação ou aquecimento do material (Porra et al., 1989), porém não se sabe qual deles é mais eficiente.

O objetivo deste estudo foi calibrar o medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação da nutrição nitrogenada das plantas de milho, considerando-se a prévia comparação do teor de clorofila obtido por dois extratores diferentes com as leituras do medidor.

No campo experimental da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, PR, durante a safra de verão 2000/2001, foi cultivado no campo, sob sistema de plantio direto, o híbrido de milho Cargill 3023, sucedendo a cultura de aveia-preta (*Avena strigosa*) e de tremoço-branco (*Lupinus albus*). Todas as parcelas de milho receberam 44 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O na época de semeadura, pela fórmula NPK 0-20-20. Somente na seqüência aveia-preta/milho foi aplicada a dose de 80 kg ha<sup>-1</sup> de N, na forma de uréia, em que metade da dose foi aplicada na semeadura e a outra metade em cobertura aos 25 dias após a emergência das plantas. O ensaio foi repetido na safra 2001/2002, nas mesmas condições do anterior, porém, a aplicação de N foi excluída dos tratamentos e o híbrido de milho utilizado foi o Pioneer 3041. A partir do estádio de florescimento, selecionaram-se cinco plantas de milho representativas de cada

parcela. O conteúdo de clorofila foi avaliado pelo SPAD-502, quinzenalmente, nas folhas da espiga. Ao final do ciclo da cultura, a produção de grãos e de palha foi avaliada.

Durante o período de enchimento de grãos, além das medições do conteúdo de clorofila pelo SPAD, foi avaliado o conteúdo de N total no tecido foliar através do método semi-micro Kjeldhal.

Para a calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 com o conteúdo de clorofila total das plantas, foram coletadas 80 folhas de plantas de milho crescidas na safra 2000/2001, cujas tonalidades de verde variavam de verde-amarelado a verde-escuro intenso. Com o auxílio de um vazador circular de área equivalente a 346 mm<sup>2</sup> foram retirados círculos de tecido vegetal do terço médio das folhas. Imediatamente, foram realizadas as leituras em cada círculo com o SPAD-502. O valor da leitura de cada círculo foi composto pela média aritmética de seis repetições. Em seguida, em todos os círculos foram determinados os teores de clorofila das folhas, utilizando-se os solventes acetona 80% e N,N-dimetilformamida sem diluição. Para isso, os discos foram acondicionados em frascos protegidos da luz e imersos individualmente em 25 mL de cada extrator. As amostras em acetona foram mantidas sob refrigeração (8°C), enquanto as amostras em DMF foram mantidas em temperatura ambiente. As absorvâncias dos extratos foram analisadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 647 (A<sub>647</sub>) e 663 nm (A<sub>663</sub>), após 72 e 104 horas do início da extração. No cálculo das quantidades de clorofila a, b e total (C<sub>a</sub>, C<sub>b</sub> e C<sub>t</sub>, respectivamente), foram utilizadas as equações descritas por Porra et al. (1989) para as amostras extraídas com acetona 80%: C<sub>a</sub> = 12,7A<sub>663</sub> - 2,7A<sub>647</sub>; C<sub>b</sub> = -4,7A<sub>663</sub> + 22,9A<sub>647</sub>; C<sub>t</sub> = 8,02A<sub>663</sub> + 20,2A<sub>647</sub>. As equações de Moran (1982) foram utilizadas para as amostras extraídas com DMF: C<sub>a</sub> = 12,64A<sub>663</sub> - 2,99A<sub>647</sub>; C<sub>b</sub> = -5,6A<sub>663</sub> + 23,26A<sub>647</sub>; C<sub>t</sub> = 7,04A<sub>663</sub> + 20,27A<sub>647</sub>.

Nos procedimentos estatísticos de regressão e análise de variância foi utilizado o Software Sigma Plot 2.0, e os ajustes das curvas foram realizados pela função linear e quadrática.

Não foram observadas diferenças significativas nos conteúdos de clorofila extraídas após o período de 72 e 104 horas, em ambos extractores. Observou-se que os discos do limbo foliar tratados com DMF, após 72 horas, apresentavam-se totalmente despigmentados, enquanto os discos tratados com acetona, mesmo após 104 horas, ainda apresentavam pontos com pigmentação verde, visíveis a olho nu, indicando uma menor eficiência de extração com acetona. A relação entre o total de clorofila a e clorofila b variou significativamente nos dois extractores utilizados. Em acetona, a relação entre clorofila a e clorofila b foi de 2,23±0,26, ao passo que em DMF, a relação foi de 3,78±0,36, sugerindo maior eficiência do último na extração das clorofilas, cuja relação obtida foi característica das plantas C<sub>4</sub>, o que não foi evidenciado na extração com acetona, cuja relação ficou próxima da encontrada em plantas C<sub>3</sub>.

Os valores de clorofila total foram melhor ajustados aos modelos lineares de primeira e de segunda ordem quando utilizou-se o extrator DMF, do que com acetona (Tabela 1). Os valores dos coeficientes de determinação foram muito próximos nos dois modelos utilizados, discordando dos relatos encontrados na literatura que indicam que a correlação entre a clorofila foliar e as

leituras do SPAD-502 no milho não é linear (Castelli et al., 1996). Apesar da semelhança dos coeficientes de determinação entre os modelos testados, os parâmetros da equação ajustada não foram significativos em ambos os extratores (Tabela 1).

O conteúdo de clorofila foliar nas plantas de milho foi similar entre os tratamentos até o período de formação das espigas (60 e 70 dias após plantio). Com o avanço do período reprodutivo, fase que se caracteriza pela redistribuição de nutrientes e enchimento de grãos, ocorreu um progressivo amarelecimento das folhas inferiores das plantas. Esta situação apresentou-se mais expressiva na rotação envolvendo aveia-preta/milho, ao passo que o milho cultivado após tremoço-branco manteve-se com as folhas mais esverdeadas por maior tempo, como ficou demonstrado pelos maiores conteúdos de N na folha no momento da colheita (Tabela 2). No sistema tremoço-branco/milho, a concentração máxima de clorofila nas folhas, determinada pela derivada primeira das equações quadráticas ajustadas aos teores de clorofila durante o desenvolvimento das plantas de milho, foi detectada aos 79 e 84 dias após o plantio, respectivamente nas safras 2000/2001 e 2001/2002, enquanto na rotação aveia-preta/milho, a máxima concentração de clorofila nas folhas somente foi observada aos 68 e 69 dias após o plantio, nas respectivas safras.

**Tabela 1.** Parâmetros das equações lineares ( $y = ax + b$ ) e quadráticas ( $y = ax^2 + bx + c$ ) dos conteúdos de clorofila total, extraído em acetona 80% e N,N-dimetilformamida (DMF).

Modelo	Parâmetros da equação			R <sup>2</sup>
	a	b	c	
	Acetona 80%			
Linear	-1,1909**	0,1080**	-	0,658***
Quadrático	-2,0098 <sup>ns</sup>	0,1423 <sup>ns</sup>	-0,0003 <sup>ns</sup>	0,659***
	DMF			
Linear	-3,9329***	0,1887***	-	0,881***
Quadrático	-0,2477 <sup>ns</sup>	0,1277 <sup>ns</sup>	0,0006 <sup>ns</sup>	0,876***

<sup>ns</sup>Não-significativo, \*\* e \*\*\*Significativo a 1% e a 0,1%, respectivamente.

**Tabela 2.** Produção de grãos e palha, e acumulação de nitrogênio, pelo milho cultivado sob plantio direto em duas rotações de culturas em Londrina, PR, safra 2000/2001 e 2001/2002, e avaliação das leituras do SPAD, nitrogênio foliar associado com a quantidade de clorofila do milho cultivado sob plantio direto e duas rotações de culturas na safra 2000/2001<sup>(1)</sup>.

Rotação	Matéria seca		Nitrogênio				Leitura SPAD	N foliar -- (%)--	Clorofila	
	Grãos	Palha	Grãos	Palha	Grãos	Palha			DMF <sup>(2)</sup>	Acet. <sup>(3)</sup>
	--- (Mg ha <sup>-1</sup> ) ---	----- (%) -----	--- (kg ha <sup>-1</sup> ) ---	----- (%) -----	--- (kg ha <sup>-1</sup> ) ---	----- (%) -----	-- (mg dm <sup>-2</sup> ) --	---		
	Safrá 2000/2001									
Tremoço-branco/milho	8,0a	14,6a	1,51a	0,65a	105a	82a	56,0a	2,54a	6,64a	4,95a
Aveia-preta/milho (+80 kg N ha <sup>-1</sup> )	6,6b	10,0b	1,45a	0,62a	83b	54b	48,0b	2,08b	5,13b	4,08b
	Safrá 2001/2002									
Tremoço-branco/milho	7,6a	10,2a	1,13a	0,69a	74a	61a	-	-	-	-
Aveia-preta/milho	4,2b	8,0b	0,96b	0,37b	35b	26b	-	-	-	-

<sup>(1)</sup>Em cada safra, médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste t. <sup>(2)</sup>Clorofila extraída com N,N-dimetilformamida. <sup>(3)</sup>Clorofila extraída com acetona 80%.

Este comportamento está associado à disponibilidade de N do solo para o milho, uma vez que foi plantado sobre a palhada de tremoço-branco, de baixa relação C:N, que acumulava mais de 200 kg ha<sup>-1</sup> de N na ocasião do manejo (Zotarelli, 2000). O tremoço-branco é uma leguminosa que pode acumular significativa quantidade de matéria seca (4 a 6 Mg ha<sup>-1</sup>) e introduzir N no solo proveniente da fixação biológica do N<sub>2</sub> atmosférico (Zotarelli, 2000). Por outro lado, a cultura da aveia-preta, amplamente difundida no manejo de sistemas de plantio direto por sua excelente capacidade de cobertura do solo, que pode chegar a 8 Mg ha<sup>-1</sup>, possui alta relação C:N, o que pode ocasionar, em determinadas situações, a imobilização de N mineral do solo em sistema de plantio direto (Sá, 1993). Comparando-se as produtividades e a acumulação de N nos sistemas de rotação (Tabela 2), verifica-se que a contribuição do tremoço-branco foi superior a 80 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio.

No ano seguinte, a suspensão da adubação nitrogenada na seqüência aveia-preta/milho reduziu o rendimento de grãos em 2,4 Mg ha<sup>-1</sup>; a acumulação final de N nos tecidos também foi comprometida em torno de 50%; nesta situação os teores de N nos grãos e palha foram significativamente inferiores na rotação com presença da aveia-preta (Tabela 2), ficando evidente a situação de deficiência de N no sistema.

Paralelamente à redução do conteúdo de clorofila, foram observados decréscimos significativos do conteúdo de N no tecido foliar nos dois sistemas de produção, confirmando a relação entre as leituras do SPAD e a concentração de N e clorofila (Argenta et al., 2001).

Um segundo fator na comparação entre os dois anos agrícolas foi a adubação nitrogenada realizada no milho na rotação com aveia-preta apenas no primeiro ano de cultivo. Esse fator contribuiu para que o conteúdo de N nas folhas de milho, na safra 2000/2001, no sistema aveia-preta/milho, fosse relativamente maior do que no mesmo sistema na safra 2001/2002, o que refletiu no conteúdo de clorofila foliar, na produtividade e na acumulação de N nos grãos e na palha (Tabela 2). Na safra 2001/2002, foram observados, apenas na rotação aveia-preta/milho, sintomas da deficiência de N e K na fase de enchimento de grãos da espiga. Em 90% das espigas colhidas, foi possível observar má formação caracterizada pelo não preenchimento dos lócus que compunham a ponta da espiga, além do entortamento da ponta da espiga, caracterizado pelo desbalanço na relação N:K.

A extração da clorofila com a solução DMF, por 72 horas, é a mais indicada para a calibração do medidor de clorofila SPAD-502 na cultura do milho. O modelo linear expressa a relação entre o conteúdo de clorofila e as leituras do SPAD para a cultura do milho, e permite avaliar o estado nutricional da cultura pela estreita relação com o conteúdo de N foliar após a floração.

### Agradecimentos

À equipe de laboratório, Donizete Loni, Mariluci da Silva Pires, Nelson Delattre e Iara Cintra Arruda; à equipe de apoio, João Ribeiro Macedo, Jorge Julio Azevedo e Paulo Volpato, pelo suporte técnico; à Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), Capes-Faperj e Cnpq, pelo suporte financeiro.

### Referências

- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F. da; BARTOLINI, C. G.; FORSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 13, n. 2, p. 158-167, 2001.
- CASTELLI, F.; CONTILLO, R.; MICELI, F. Non-destructive determination of leaf chlorophyll content in four crop species. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 177, p. 275-283, 1996.
- MARKWELL, J.; OSTERMAN, J. C.; MITCHELL, J. L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 46, p. 467-472, 1995.
- MORAN, R. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-dimetilformamide. **Plant Physiology**, Rockville, v. 69, p. 1376-1381, 1982.
- PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDERMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equation for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophylls standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, New York, v. 975, p. 384-394, 1989.
- RAJCAN, I.; DWYER, L.; TOLLENAAR, M. Note on relationship between leaf soluble carbohydrate and chlorophyll concentrations in maize during leaf senescence. **Field Crops Research**, Madison, v. 63, p. 13-17, 1999.
- SÁ, J. C. M. **Manejo da fertilidade do solo no plantio direto**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1993. 96 p.
- ZOTARELLI, L. **Balanco de nitrogênio numa rotação em sistema de plantio direto e convencional na Região de Londrina-PR**. 2000. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.