

QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS EM FOLHAS DE MILHO ATRAVÉS DE MÉTODOS ÓPTICOS NÃO DESTRUTIVOS

CASSANDRO VIDAL TALAMINI DO AMARANTE¹, CRISTIANO ANDRÉ STEFFENS¹,
LUÍS SANGOI¹, ODIMAR ZANUZO ZANARDI², AQUIDAUANA MIQUELOTO³ e
CLEBER SCHWEITZER³

¹Professor Associado do Departamento de Agronomia da UDESC, Av. Luiz de Camões, 2090, 88.520-000, Lages, SC. a2cvta@cav.udesc.br, steffens@cav.udesc.br, a2ls@cav.udesc.br

²Aluno do Curso de Graduação em Agronomia da UDESC. odimarzanardi@yahoo.com.br

³Alunos do curso de Mestrado em Produção Vegetal da UDESC.
aquidauanamiqueloto@yahoo.com.br, cleber_s@yahoo.com.br

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.9, n.1, p. 39-50, 2010

RESUMO - Com o advento de medidores portáteis, a quantificação de clorofilas tornou-se fácil e rápida, podendo ser realizada de forma não destrutiva, no campo. Este trabalho foi conduzido visando avaliar a viabilidade da utilização de um colorímetro, como alternativa à utilização de medidor de clorofila, para a quantificação não destrutiva de clorofilas em folhas de milho. Folhas de três híbridos, 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 a , b e $totais$. Os valores de leitura do medidor de clorofila e da relação $h^\circ/(L \times C)$ do colorímetro aumentaram com o incremento nos teores de clorofilas, nos três híbridos. Melhores estimativas dos teores de clorofilas foram obtidas em unidades de área do que em unidades de massa fresca, especialmente para a clorofila a , tanto para a leitura do SPAD-502 quanto para a relação $h^\circ/(L \times C)$ do colorímetro CR-400. Os resultados obtidos demonstram que o colorímetro é uma alternativa viável na avaliação não destrutiva dos conteúdos de clorofilas a , b e $totais$ ($\mu\text{g cm}^{-2}$), sendo as leituras pouco influenciadas por diferenças nas faces das folhas de milho. Para tanto, os valores da relação $h^\circ/(L \times C)$ 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.

QUANTIFICATION OF CHLOROPHYLLS IN MAIZE LEAVES BY NON-DESTRUCTIVE OPTICAL METHODS

ABSTRACT - With the development of portable equipments, chlorophylls quantification became easy, quick, and affordable for non-destructive assessment in the field. 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. Leaves of three hybrids, 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^o color space), and, thereafter, destructively assessed for total chlorophyll and chlorophylls a and b . The chlorophyll meter reading and the $h^o/(LxC)$ ratio for the chroma meter increased with the increment of chlorophylls in all maize hybrids. The best estimates of chlorophylls content were achieved when expressed in leaf area rather than in leaf fresh matter basis, specially for chlorophyll a , for both, chlorophyll meter reading and $h^o/(LxC)$ ratio for the chroma meter. The results showed that the chroma meter is a viable alternative for non-destructive assessment of chlorophylls a and b and total chlorophyll ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), with readings being little affected by differences on faces of maize leaves. Nevertheless, this requires the calibration between the $h^o/(LxC)$ ratio of the chroma meter and the chlorophylls extracted from leaves of concerned hybrid, as required for the SPAD-502.

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

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 método tradicional para a determinação do conteúdo de clorofilas em folhas é realizado via maceração com acetona, ou outro solvente orgânico e posterior leitura em espectrofotômetro (Arnon, 1949). Porém, esse método resulta

na coleta destrutiva do material vegetal e é demorado. Com o advento dos medidores portáteis, que utilizam princípios ópticos não destrutivos, baseados na absorbância e/ou refletância da luz pelas folhas, a determinação de clorofilas tornou-se fácil e rápida, podendo ser realizada no campo (Richardson et al., 2002).

O equipamento Minolta SPAD-502 tem sido utilizado na quantificação de clorofilas, caracterizando-se pela rapidez, simplicidade e, principalmente, por possibilitar uma

avaliação não destrutiva do tecido foliar. Para a quantificação de clorofilas, o equipamento emite luz, que atravessa o tecido foliar e atinge um receptor (fotodiodo de silicone). A luz transmitida é convertida em sinais digitais, sendo usados por um microprocessador para calcular a leitura SPAD (“Soil Plant Analytical Division Value”, na faixa de 0-100). A intensidade de cor verde é detectada no aparelho através da quantidade de luz absorvida pela folha, nos comprimentos de onda (λ) de 650 nm (vermelho) e 940 nm (vermelho distante próximo). A luz absorvida no λ de 650 nm (pelas clorofilas, sem a interferência ocasionada pelos carotenóides) indica a quantidade de clorofilas, enquanto a quantidade absorvida próximo do λ de 940 nm serve como referência interna na compensação da espessura e conteúdo de água da folha (Swiader & Moore, 2002). Esse equipamento tem sido utilizado com sucesso para diagnosticar o estado nutricional, crescimento e desenvolvimento de diversas espécies vegetais, tais como milho (Bullock & Anderson, 1998; Zotarelli et al., 2003; Magalhães et al., 2009), cevada (Spaner et al., 2005), trigo (Spaner, et al., 2005; Fotovat et al., 2007), arroz (Iwaya et al., 2004), soja (Saitoh et al., 2004; Rodriguez-Lucena et al., 2010) e feijão (Teixeira et al., 2003; Silveira et al., 2003), entre outras. 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 (Azia & Stewart, 2001; Zotarelli et al., 2003; Uddling et al., 2007).

O colorímetro Minolta CR também pode ser utilizado para a avaliação não destrutiva da coloração de tecidos vegetais, como ocorre em frutos (Amarante et al., 2007). Esse equipamento utiliza uma fonte interna de luz e um sistema de compensação de leitura, constituído de dois sensores internos, um que mede a luz refletida da superfície do tecido vegetal e outro sensor que mede a luz da fonte de iluminação. A fonte de luz do equipamento gera radiação difusa (com diferentes ângulos de incidência) e o sensor interno recebe a luz refletida verticalmente pela superfície do tecido no espaço de cores L , C e h° , que indicam valores de brilho (‘lightness’), cromaticidade e ângulo ‘hue’, respectivamente (Mcguire, 1992). Os valores de h° do equipamento permitem quantificar o teor de clorofilas em folhas (folha verde intensa, com elevado teor de clorofila, apresentando h° próximo de 180° , e folha clorótica, com baixo teor 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).

Este trabalho foi conduzido visando avaliar a viabilidade de utilização do colorímetro, como alternativa ao emprego do medidor de clorofila SPAD-502, para a quantificação não destrutiva dos teores de clorofilas em folhas de híbridos de milho.

Material e Métodos

Foram coletadas 20 folhas dos híbridos AG9020, AS1570 e P30F53, em lavoura localizada no município de Lages, SC. As plantas estavam em pleno desenvolvimento vegetativo (janeiro/2008), 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. O colorímetro CR-400 foi utilizado com ponteira de vidro côncava CR-A33f (abertura de 8 mm), para a quantificação da cor no espaço de cores L , C e h° (Mcquire, 1992), 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 foram determinadas a massa fresca (com uma balança analítica, com precisão de 0,0001 g) e 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%), sendo os extratos filtrados através de papel-filtro (densidade de 80g m⁻²) e coletados em

balões volumétricos de 25 mL, completando-se o volume ao final da filtragem. A densidade ótica dos filtrados foi lida em espectrofotômetro (Carl Zeiss® UV-Vis Spekol, Alemanha) nos λ de 645 e 663 nm, utilizando cubetas de quartzo. A partir dessas leituras, determinou-se a concentração (mg cm⁻³) de clorofilas a , b e *totais* nas soluções de leitura, por meio de fórmulas propostas por Arnon (1949). Esses valores foram transformados para teores de clorofilas a , b e *totais* nas folhas, expressos em unidades de área ($\mu\text{g cm}^{-2}$) e de massa fresca ($\mu\text{g g}^{-1}$), segundo sugestão de Richardson *et al.* (2002).

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 os teores de clorofilas a , b e *totais* quantificados nas folhas, utilizando o programa SAS.

Resultados e Discussão

Os valores de leitura do medidor de clorofila SPAD-502 apresentaram aumento linear com o incremento nos teores de clorofilas a , b e *totais* nas folhas dos três híbridos, nas faces adaxial (Figuras 1, 2 e 3) e abaxial (Tabela 1). Todavia, melhores ajustes dos modelos (maiores valores de R²) foram observados para a quantificação feita com o SPAD-502 na face adaxial, possivelmente refletindo a maior regularidade da superfície das folhas nessa face.

Para os atributos de cor quantificados com o colorímetro CR-400, nas faces adaxial e

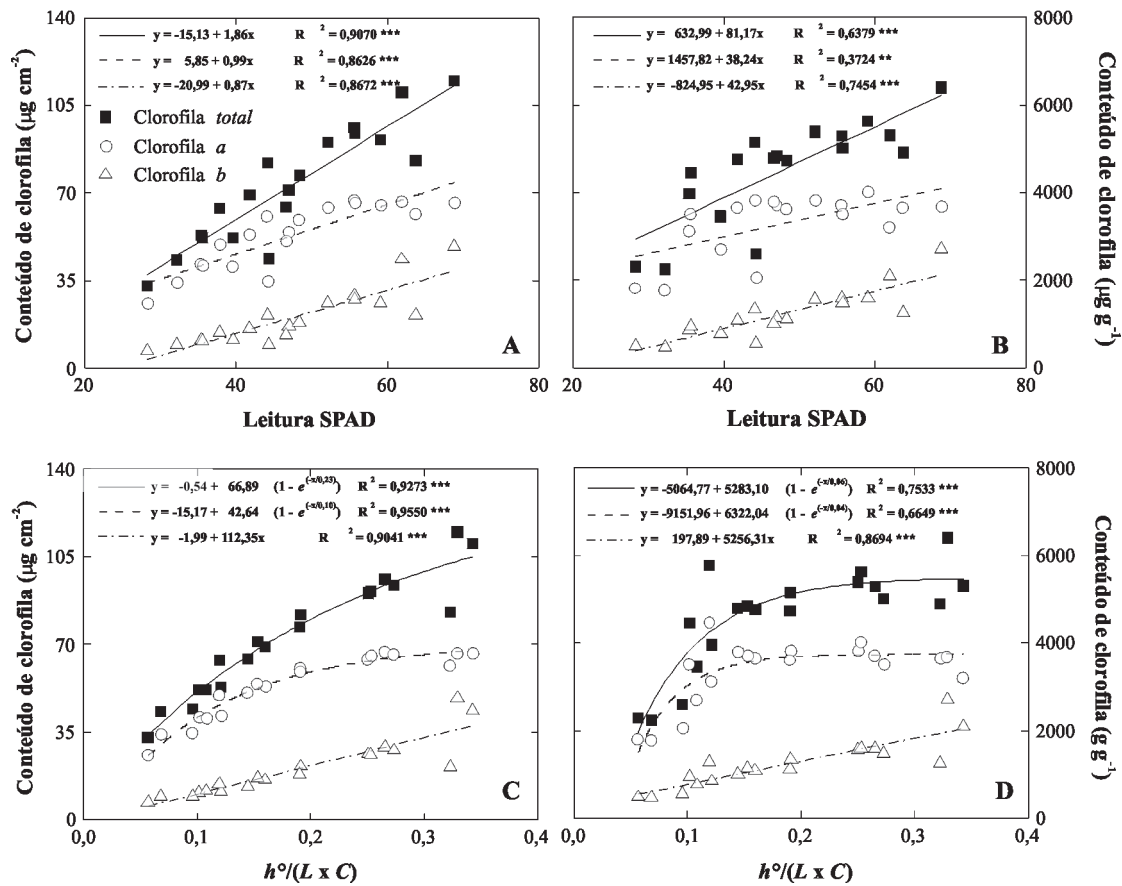


FIGURA 1. Relação entre valores de leitura do SPAD-502 (A e B) e o atributo de cor $h^{\circ}/(L \times C)$ do colorímetro CR-400 (C e D), na face adaxial, versus teores de clorofilas *a*, *b* e *totais*, em unidades de área (µg cm⁻²; gráficos à esquerda) e de massa fresca (µg g⁻¹; gráficos à direita), em folhas de milho híbrido AG9020.

abaxial, houve aumento no valor de h° (indicando uma mudança de coloração de amarelada, em folha clorótica, para verde-intenso) e redução nos valores de *L* e *C* (indicando uma redução no brilho e na cromaticidade) com o incremento nos conteúdos (expressos em µg cm⁻² e µg g⁻¹) de clorofilas *a*, *b* e *totais* (dados não apresentados).

A utilização da relação $h^{\circ}/(L \times C)$ resultou em melhor ajuste de modelos com os teores de

clorofilas *a*, *b* e *totais* nas folhas de milho dos três híbridos do que a utilização individual de h° , *L* e *C*. Na face adaxial, houve um aumento da relação $h^{\circ}/(L \times C)$ com o incremento nos teores de clorofilas nas folhas dos três híbridos de milho, segundo modelo assintótico para as clorofilas *totais* e clorofila *a*, e modelo linear para a clorofila *b* (Figuras 1, 2 e 3). Na face abaxial, o aumento da relação $h^{\circ}/(L \times C)$ com

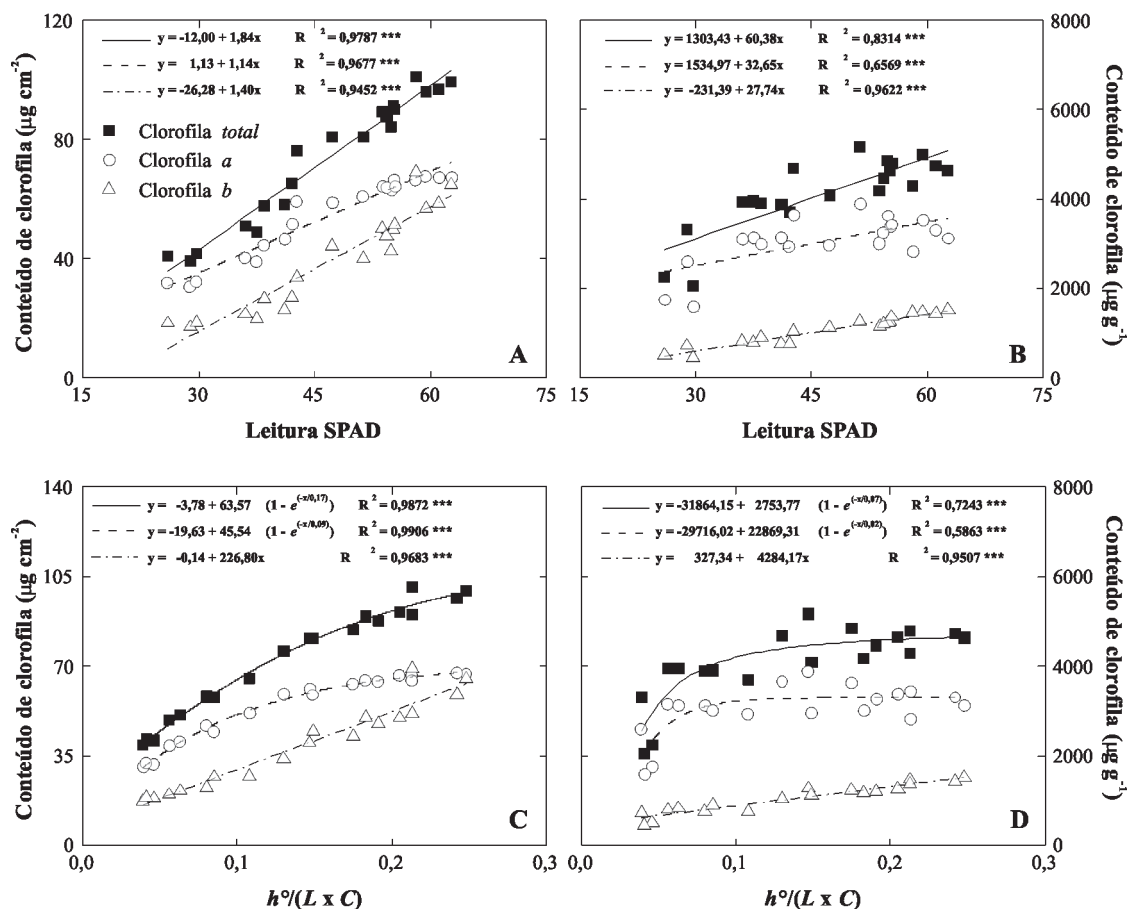


FIGURA 2. Relação entre valores de leitura do SPAD-502 (A e B) e o atributo de cor $h^\circ/(L \times C)$ do colorímetro CR-400 (C e D), na face adaxial, versus teores de clorofilas *a*, *b* e *totais*, em unidades de área ($\mu\text{g cm}^{-2}$; gráficos à esquerda) e de massa fresca ($\mu\text{g g}^{-1}$; gráficos à direita), em folhas de milho híbrido AS1570.

o incremento nos teores de clorofilas nas folhas seguiu modelo assintótico para as clorofilas *totais* e clorofila *a*, e linear para a clorofila *b*, nos híbridos AS1570 e P30F53 (Tabela 1). No híbrido AG9020, o aumento da relação $h^\circ/(L \times C)$ na face abaxial com o incremento nos teores de clorofilas *a*, *b* e *totais* foi linear (Tabela 1).

De forma geral, os modelos ajustados entre teores de clorofilas (em unidades de área

e de massa fresca foliar) e os valores da relação $h^\circ/(L \times C)$ do colorímetro apresentaram maiores valores de R^2 , comparativamente aos modelos ajustados para leituras do medidor de clorofila, nas faces adaxial (Figuras 1, 2 e 3) e abaxial (Tabela 1) dos três híbridos de milho. Apenas no híbrido AS1570, o R^2 foi maior nos modelos ajustados entre leituras do medidor de clorofila e os teores de clorofilas, em unidades de massa

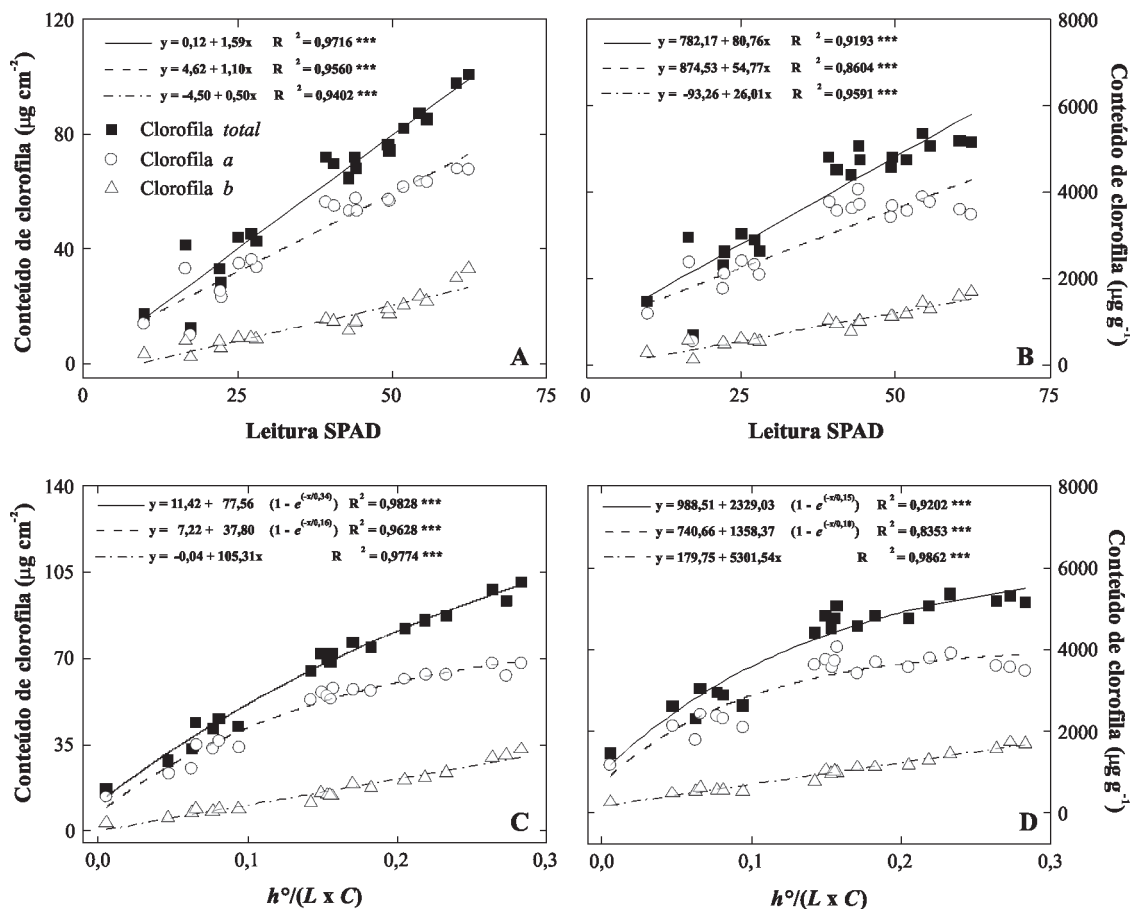


FIGURA 3. Relação entre valores de leitura do SPAD-502 (A e B) e o atributo de cor $h^0/(L \times C)$ do colorímetro CR-400 (C e D), na face adaxial, versus teores de clorofilas *a*, *b* e *totais*, em unidades de área ($\mu\text{g cm}^{-2}$; gráficos à esquerda) e de massa fresca ($\mu\text{g g}^{-1}$; gráficos à direita), em folhas de milho híbrido P30F53.

fresca, na face adaxial, comparativamente à relação $h^0/(L \times C)$ do colorímetro (Figuras 2B e 2D).

Houve, ainda, diferença entre híbridos, no ajuste de modelos para a estimativa dos teores de clorofilas, a partir de medições feitas com ambos os equipamentos. No híbrido AG9020, os modelos ajustados para a estimativa de clorofilas, em unidades de massa fresca,

com medições feitas em ambas as faces, mas principalmente na face abaxial, apresentaram baixos valores de R^2 , especialmente para a clorofila *a* (Figuras 1, 2 e 3; Tabela 1). Portanto, diferenças na estrutura foliar entre genótipos de milho interferem na estimativa do teor de clorofilas.

Os modelos ajustados para teores de clorofilas em unidades de área apresentaram

TABELA 1. Modelos lineares e não lineares ajustados para valores de leitura do SPAD-502 e o atributo de cor $h^o/(L \times C)$ do colorímetro CR-400, na face abaxial, versus teores de clorofilas *a*, *b* e *totais*, em unidades de área ($\mu\text{g cm}^{-2}$) e de massa fresca ($\mu\text{g g}^{-1}$), em folhas de três híbridos simples de milho (AG9020, AS1570 e P30F53).

Pigmentos fotossintéticos	Teores em unidades de área ($\mu\text{g cm}^{-2}$ de folha)	
	Leitura SPAD	$h^o/L \times C$
AG9020		
Clorofilas <i>totais</i>	$y = -12,56 + 1,82x; R^2 = 0,8361^{***}$	$y = 30,71 + 207,68x; R^2 = 0,8767^{***}$
Clorofila <i>a</i>	$y = 6,46 + 0,99x; R^2 = 0,7818^{***}$	$y = 31,85 + 102,12x; R^2 = 0,6879^{***}$
Clorofila <i>b</i>	$y = -19,03 + 0,83x; R^2 = 0,7353^{***}$	$y = -1,13 + 105,62x; R^2 = 0,9369^{***}$
AS1570		
Clorofilas <i>totais</i>	$y = -12,00 + 1,83x; R^2 = 0,9579^{***}$	$y = -13,62 + 63,02 (1 - e^{-(x/0,13)}); R^2 = 0,9902^{***}$
Clorofila <i>a</i>	$y = 1,13 + 1,14x; R^2 = 0,9364^{***}$	$y = -14,72 + 43,53 (1 - e^{-(x/0,10)}); R^2 = 0,9876^{***}$
Clorofila <i>b</i>	$y = -26,28 + 1,40x; R^2 = 0,8935^{***}$	$y = 0,47 + 104,79x; R^2 = 0,9706^{***}$
P30F53		
Clorofilas <i>totais</i>	$y = 0,12 + 1,59x; R^2 = 0,9440^{***}$	$y = -157,93 + 112,44 (1 - e^{-(x/0,18)}); R^2 = 0,9720^{***}$
Clorofila <i>a</i>	$y = 4,62 + 1,10x; R^2 = 0,9139^{***}$	$y = -78,18 + 79,03 (1 - e^{-(x/0,09)}); R^2 = 0,9650^{***}$
Clorofila <i>b</i>	$y = -4,50 + 0,50x; R^2 = 0,8840^{***}$	$y = 0,32 + 93,67x; R^2 = 0,9768^{***}$
Teores em unidades de massa fresca ($\mu\text{g g}^{-1}$ de folha)		
	Leitura SPAD	$h^o/L \times C$
AG9020		
Clorofilas <i>totais</i>	$y = 1141,63 + 73,31x; R^2 = 0,5396^{***}$	$y = 2847,43 + 8372,16x; R^2 = 0,5446^{**}$
Clorofila <i>a</i>	$y = 1765,00 + 33,77x; R^2 = 0,2780^*$	$y = 2637,86 + 3331,32x; R^2 = 0,2109^*$
Clorofila <i>b</i>	$y = -623,36 + 39,56x; R^2 = 0,6980^{***}$	$y = 210,11 + 5043,70x; R^2 = 0,8869^{***}$
AS1570		
Clorofilas <i>totais</i>	$y = 1303,40 + 60,38x; R^2 = 0,6913^{***}$	$y = -1707,57 + 3265,85 (1 - e^{-(x/0,06)}); R^2 = 0,8878^{***}$
Clorofila <i>a</i>	$y = 1535,00 + 32,65x; R^2 = 0,4315^{**}$	$y = -1631,30 + 2528,28 (1 - e^{-(x/0,05)}); R^2 = 0,8242^{***}$
Clorofila <i>b</i>	$y = -231,39 + 27,74x; R^2 = 0,9258^{***}$	$y = 266,34 + 4357,16x; R^2 = 0,8905^{***}$
P30F53		
Clorofilas <i>totais</i>	$y = 781,17 + 80,76x; R^2 = 0,8452^{***}$	$y = -1127,61 + 3266,02 (1 - e^{-(x/0,08)}); R^2 = 0,9118^{***}$
Clorofila <i>a</i>	$y = 874,53 + 54,77x; R^2 = 0,7402^{***}$	$y = -1739,33 + 2762,46 (1 - e^{-(x/0,05)}); R^2 = 0,8626^{***}$
Clorofila <i>b</i>	$y = -93,26 + 26,01x; R^2 = 0,9198^{***}$	$y = 176,95 + 4791,30x; R^2 = 0,9443^{***}$

*, **, e *** para modelos significativos aos níveis de 5, 1 e 0,1%, respectivamente.

maiores valores de R^2 do que aqueles ajustados em unidades de massa fresca, especialmente para a clorofila *a*, tanto para a leitura do SPAD-502 quanto para a relação $h^o/(L \times C)$ do colorímetro CR-400, nos três híbridos, nas faces adaxial (Figuras 1, 2 e 3) e abaxial (Tabela 1). Portanto, a variação que ocorre na área foliar específica ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ de massa fresca), influenciada por diferenças na espessura do mesófilo e/ou no conteúdo de água das folhas, resulta em maior variabilidade nos valores expressos em unidades de massa fresca foliar ($\mu\text{g g}^{-1}$). Assim, a expressão dos teores de clorofilas em unidades de área ($\mu\text{g cm}^{-2}$) deve ser preferida, quando estimada através da utilização do medidor de clorofila SPAD-502 e do colorímetro CR-400, já que resulta em menor erro.

Os modelos ajustados entre a relação $h^o/(L \times C)$ do colorímetro CR-400 e os teores de clorofilas *a*, *b* e *totais*, apresentaram valores semelhantes de R^2 , ao se compararem medições feitas com o equipamento nas faces adaxial (Figuras 1, 2 e 3) e abaxial (Tabela 1), nos três híbridos de milho. O mesmo não ocorreu para medições feitas com o SPAD-502, nas quais melhores ajustes foram verificados para medições feitas na face adaxial, em todos os híbridos (Figuras 1, 2 e 3; Tabela 1). Portanto, o valor da relação $h^o/(L \times C)$ do colorímetro CR-400 não só proporciona melhor estimativa dos teores de clorofilas nos híbridos de milho, como também não sofre influência de diferenças

na superfície das folhas, comparativamente ao SPAD-502, como verificado nos modelos ajustados para a quantificação nas faces adaxial e abaxial.

Como a função das clorofilas é absorver quantas de luz incidente, poder-se-ia supor que a medição da quantidade de radiação absorvida pela folha com o SPAD-502 resultaria numa melhor estimativa de clorofilas do que a medição da luz refletida pela superfície da folha, obtida com o colorímetro CR-400. Todavia, os resultados obtidos mostram que o colorímetro CR-400 é tão ou mais eficiente do que o medidor de clorofila SPAD-502, para a quantificação de clorofilas em folhas de milho.

O SPAD-502, mesmo com sistema de compensação (luz absorvida no λ de 940 nm) para alterações na espessura e conteúdo de água da folha, apresenta grandes variações de leitura entre espécies de plantas (Richardson et al., 2002) e entre genótipos de uma mesma espécie (Bullock & Anderson, 1998) cultivados em uma mesma condição de ambiente, devido a diferenças na estrutura e anatomia foliar. O mesmo genótipo pode apresentar grandes variações no índice SPAD, ocasionadas por diferenças nas condições edafoclimáticas (Paliwal & Karunaichamy, 1995), no conteúdo de água (Martinez & Guiamet, 2004), estágio fenológico (Paliwal & Karunaichamy, 1995) e posição/idade da folha na planta (Hoel & Solhaug, 1998; Gil et al., 2002).

Folhas que estão submetidas a ambiente sombreado possuem maior teor de clorofilas e menor relação clorofila *a/b*, visando aumentar a eficiência de absorção de luz pelos cloroplastos (Martinez & Guiamet, 2004; Taiz & Zeiger, 2006). Como o comprimento de onda emitido pelo SPAD-502 (650 nm) está muito próximo do pico de absorção da clorofila *a* na faixa vermelha do espectro (663 nm), a maior parte da luz vermelha emitida pelo aparelho é absorvida pela clorofila *a*. Portanto, em estudos que visam à calibração desse aparelho, para se obter medidas indiretas de clorofila, deve-se evitar leituras em folhas excessivamente sombreadas, pois seu teor de clorofila *b* é proporcionalmente maior do que o de clorofila *a*, quando comparadas com as folhas em pleno sol (Taiz & Zeiger, 2006), podendo assim, interferir nos valores de leitura do SPAD-502, bem como do colorímetro Minolta.

Até mesmo o nível de radiação no momento da medição interfere na leitura do SPAD-502. Os cloroplastos mudam sua orientação nas células em resposta ao nível de radiação incidente. Em baixa radiação, os cloroplastos orientam-se ao longo das paredes celulares superiores e inferiores, perpendicularmente ao sentido de incidência da luz, enquanto em alta radiação eles estão orientados, principalmente, ao longo das paredes verticais das células, paralelamente ao sentido de incidência da luz (Taiz & Zeiger, 2006). Como consequência disso, as leituras do SPAD-502 são maiores quando medidas em condições de baixa luminosidade, como, por

exemplo, no início da manhã ou no final da tarde, ou em folhas sombreadas da planta (Hoel & Solhaug, 1998, Martinez & Guiamet, 2004).

Os resultados obtidos demonstram a viabilidade técnica de utilização do colorímetro CR-400 na avaliação quantitativa não destrutiva dos teores de clorofilas *a*, *b* e *totais* 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 a idade/posição da folha, estágio fenológico e condições no ambiente de desenvolvimento da planta a ser utilizada, procedendo-se à calibração do colorímetro com as extrações de clorofilas do genótipo de interesse. Destaca-se, ainda, que o colorímetro apresenta maior confiabilidade quando utilizado para a quantificação do teor de clorofilas em unidades de área ($\mu\text{g cm}^{-2}$), em vez de massa fresca ($\mu\text{g g}^{-1}$), sendo as leituras pouco influenciadas por diferenças na superfície das folhas, podendo ser feitas medições dos atributos de cor nas faces adaxial ou abaxial.

Conclusões

O colorímetro (Minolta CR-400) mostrou-se viável para a estimativa não destrutiva dos teores de clorofilas *a*, *b* e *totais* (em $\mu\text{g.cm}^{-2}$ de folha) em folhas de milho, através do cálculo da relação $h^o/(L \times C)$. Todavia, medidas da relação $h^o/(L \times C)$ do equipamento devem ser calibradas com extrações de clorofilas do genótipo de interesse, em condições bem definidas de cultivo.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) a bolsa de produtividade em pesquisa ao primeiro e terceiro autores. À CAPES a bolsa de mestrado ao quinto e sexto autores. À UDESC a bolsa de Iniciação Científica ao quarto autor. Ao CNPq e à FINEP o apoio financeiro à realização do projeto.

Literatura Citada

- AMARANTE, C. V. T. do; STEFFENS, C. A.; MOTA, C. S.; SANTOS, H. P. dos. Radiação, fotossíntese, rendimento e qualidade de frutos em macieiras 'Royal Gala' cobertas com telas antigranizo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 7, p. 925-931, 2007.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Maryland, v. 24, p. 1-15, 1949.
- AZIA, F.; STEWART, K. A. Relationship between extractable chlorophyll and SPAD values in muskmelon leaves. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.24, n.6, p.961-966, 2001.
- BULLOCK, D. G.; ANDERSON, D. S. Evaluation of the Minolta SPAD-502 chlorophyll meter for nitrogen management in corn. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.21, n.4, p.741-755, 1998.
- DRISCOLL, S. P.; PRINS, A.; OLMOS, E.; KUNERT, K. J.; FOYER, C. H. Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO₂ enrichment in maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 381-390, 2006.
- FOTOVAT, R.; VALIZADEH M.; TOORCHI, M. Association between water-use efficiency components and total chlorophyll content (SPAD) in wheat (*Triticum aestivum* L.) under well-watered and drought stress conditions. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 5, n. 3/4, p. 225-227, 2007.
- GIL, P. T.; FONTES, P. C. R.; CECON, P. R.; FERREIRA, F. A. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio e para o prognóstico da produtividade da batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 4, p. 611-615, 2002.
- HOEL, B. O.; SOLHAUG, K. A. Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 3, p. 389-392, 1998.
- IWAYA, K.; YAMAMOTO, H.; HAYAKAWA, S.; KAMICHIKA, M. Estimation of top nitrogen content in rice canopy using optical and nondestructive methods. **Journal of Agricultural Meteorology**, Tokyo, v. 60, n. 2, p. 87-94, 2004.
- MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, T. C. de; ALBUQUERQUE, P. E. P.; KARAM, D.; MAGALHÃES, M. M.; CANTAO, F. R. de O. Caracterização ecofisiológica de linhagens de milho submetidas à baixa disponibilidade hídrica durante o florescimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 8, n. 3, p. 223-232, 2009.

- MARTÍNEZ, D. E.; GUIAMET, J. J. Distortion of the SPAD 502 chlorophyll meter readings by changes in irradiance and leaf water status. **Agronomie**, Paris, v. 24, n. 1, p. 41-46, 2004.
- McGUIRE, R.G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 12, p. 1254-1255, 1992.
- PALIWAL, K.; KARUNAICHAMY, K. S. T.K. In-situ estimation of leaf chlorophyll by light transmittance in vegetable crops. **Indian Journal Agricultural Science**, New Delhi v. 65, n. 5, p. 361-362, 1995.
- RICHARDSON, A. D.; DUIGAN, S. P.; BERLYN, G. P. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. **New Phytologist**, Lancaster, v. 153, n. 1, p. 185-194, 2002.
- RODRIGUEZ-LUCENA, P.; HERNANDEZ-APAOLAZA, L.; LUCENA, J. J. Comparison of iron chelates and complexes supplied as foliar sprays and in nutrient solution to correct iron chlorosis of soybean. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 173, n. 1, p. 120-126, 2010.
- SAITOH, K.; NISHIMURA, K.; KURODA, T. Comparison of leaf photosynthesis between wild and cultivated types of soybean. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 7, n. 3, p. 277-279, 2004.
- SILVEIRA P. M.; BRAZ, A. J. B. P.; DIDONET, A.D. Uso do clorofilômetro como indicador da necessidade de adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1083-1087, 2003.
- SPANER, D.; TODD, A. G.; NAVABI, A.; McKENZIE, D. B.; GOONEWARDENE, L. A. Can leaf chlorophyll measures at differing growth stages be used as an indicator of winter wheat and spring barley nitrogen requirements in eastern Canada? **Journal of Agronomy and Crop Science**. Berlin, v. 191, n. 5, p. 393-399, 2005.
- SWIADER, J. M.; MOORE, A. SPAD-chlorophyll response to nitrogen fertilization and evaluation of nitrogen status in dryland and irrigated pumpkins. **Journal of Plant Nutrition**, Abingdon, v. 25, n. 5, p. 1089-1100, 2002.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 705 p.
- TEIXEIRA, I. R.; BORÉM, A.; ARAÚJO, G. A. A. A.; FONTES, R. L. F.; MOTA, J. H.; SILVA, A. G. Nutrição mineral do feijoeiro em função de doses de manganês e zinco. **Semina**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 235-242, 2003.
- UDDLING, J.; GELANG-ALFREDSSON, J.; PIIKKI, K.; PLEIJEL, H. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. **Journal Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 91, n. 1, p. 37-46, 2007.
- ZOTARELLI, L.; CARDOSO, E. G.; PICCININ, J. L.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; TORRES, E.; ALVES, B. J. R. Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 9, p. 1117-1122, 2003.