

Diagnose do *status* de nitrogênio em Cana-de-Açúcar⁽¹⁾

Michele Xavier Vieira Megda⁽²⁾; Paulo Cesar Ocheuze Trivelin⁽³⁾; Eduardo Mariano⁽⁴⁾; José Marcos Leite⁽⁴⁾; Marcio Mahmoud Megda⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Yara ASA Internacional e CNPq

⁽²⁾ Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Solos e Nutrição de Plantas; Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ ESALQ-USP; Piracicaba; São Paulo; E-mail: micheleagronomia@yahoo.com.br; ⁽³⁾ Professor Associado III; Centro de Energia Nuclear na Agricultura/CENA; ⁽⁴⁾ Doutorando do PPG em Solos e Nutrição de Plantas; Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ESALQ-USP.

RESUMO: As concentrações de clorofila e de nitrogênio total nas folhas correlacionam-se positivamente, e podem ser determinadas pelo uso de clorolômetro portátil. Objetivou-se relacionar as concentrações de clorofila e nitrogênio total das folhas de cana-de-açúcar com os valores SPAD determinados por meio de clorofilômetro portátil. O experimento foi conduzido na região de Piracicaba/SP em primeira soqueira de cana-de-açúcar. Os tratamentos utilizados foram: sulfato de amônio, nitrato de amônio, ureia, YaraBela NitromagTM, aplicados manualmente sobre os resíduos depositados no solo após a colheita da cana-planta na dose de nitrogênio de 100 kg ha⁻¹. A quantificação não-destrutiva dos teores relativos de clorofila foi realizada utilizando clorofilômetro portátil. As leituras foram realizadas no terço médio das lâminas de folhas +1 da cana-de-açúcar aos 90 e 150 dias após a adubação da primeira soqueira e nessas mesmas folhas, foi realizada a determinação de nitrogênio total, clorofila *a*, *b* e carotenóides. Os teores de clorofila determinados pelo clorofilômetro não apresentaram correlação com os teores de nitrogênio total na folha diagnóstico de cana-de-açúcar. Os valores SPAD obtidos com utilização do clorofilômetro foram considerados apropriados para prever o estado nutricional da cana-de-açúcar, em nitrogênio, por terem relação direta com a concentração de clorofila *a* na folha.

Termos de indexação: clorofilômetro, valor SPAD, clorofila.

INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um dos principais fatores de produção responsáveis pelo aumento de produtividade, especialmente em solos de regiões tropicais onde sua disponibilidade é fator limitante para o desenvolvimento das culturas. Esse nutriente encontra-se em apenas 1% da massa de matéria seca das plantas, e sua deficiência causa a redução na síntese de clorofila, de aminoácidos e da energia necessária à produção de carboidratos e esqueletos carbônicos, refletindo diretamente no desenvolvimento e rendimento das culturas (EPSTEIN & BLOOM, 2006).

As gramíneas cultivadas do tipo C4 caracterizam-se por apresentar respostas pronunciadas, em termos de produção de fitomassa, ao nitrogênio aplicado como fertilizante (BOLTON & BROWN, 1980). O nitrogênio absorvido propicia aumento na atividade meristemática da parte aérea, provocando incrementos na área foliar e na intensidade de perfilhamento (MARSCHNER, 2012).

As clorofilas e os carotenóides são pigmentos presentes nos vegetais, capazes de absorver a radiação visível, desencadeando as reações fotoquímicas da fotossíntese, processo essencial nos vegetais e por isso denominado de metabolismo primário (ENGEL & POGGIANI, 1991). Os métodos utilizados para a extração de clorofila em folhas de vegetais são destrutivos e baseiam-se na utilização de solventes orgânicos.

O trabalho foi realizado com o objetivo de quantificar os teores relativos de clorofila por meio do uso de clorofilômetro portátil e pelo método analítico relacionando com o N-total na cultura da cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na região de Piracicaba/SP em primeira soqueira de cana-de-açúcar. O plantio da cana-de-açúcar, cultivar SP89 1115, foi realizado em linhas espaçadas por 1,5 m. A cana-planta foi colhida mecanicamente sem despalha a fogo e os resíduos culturais (ponteiros, folhas e pedaços de colmos) depositados na superfície do solo. O solo foi classificado como Latossolo Vermelho distrófico (EMBRAPA, 2006) e o delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com quatro repetições.

Os fatores de estudo foram compostos de quatro fontes de nitrogênio: sulfato de amônio (SA), nitrato de amônio (NA), ureia (UR), YaraBela NitromagTM (NITRO), aplicadas manualmente sobre os resíduos depositados no solo após a colheita da cana-planta na dose de 100 kg ha⁻¹ de N e a 20 cm da linha de cana-de-açúcar, além de uma parcela controle (sem a aplicação de N-mineral).

A quantificação não-destrutiva das concentrações de clorofila foi realizada utilizando clorofilômetro portátil da Yara International ASA, Noruega (N-

TESTER). Este medidor de clorofila é uma modificação do SPAD 502 (Minolta, Japão), ambos com o mesmo princípio de medição, no entanto, os valores são apresentados em escala diferente.

As leituras foram realizadas em campo no terço médio de trinta lâminas de folhas +1 da cana-de-açúcar aos 90 e 150 dias após a adubação da primeira soqueira. Nessas mesmas folhas, foi realizada a determinação de nitrogênio total pelo método semimicro Kjeldahl (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Os valores obtidos por meio das leituras com o clorofilômetro N-TESTER foram extrapolados para valores SPAD por meio da fórmula: $SPAD = (NT+90)/15$, em que, NT corresponde ao valor obtido pelas leituras com o clorofilômetro N-TESTER.

Após as leituras com o clorofilômetro as folhas foram levadas para o laboratório para a determinação dos conteúdos de clorofila *a*, *b* e carotenóides. Foi pesado 0,2 g de tecido vegetal e colocado em tubos de ensaio, onde foram adicionados 5 mL de Dimetil sulfoxido (DMSO). Os tubos de ensaio com as folhas imersas foram incubados em banho-maria a temperatura de 70°C por 150 minutos (HISCOX; ISRAELSTAM, 1979). Uma alíquota de 3 mL foi utilizada para leituras a 470, 649 e 665 nm em espectrofotômetro. A partir das leituras obtidas no espectrofotômetro determinou-se o conteúdo das clorofilas *a*, *b* e o conteúdo de carotenóides utilizando-se as equações propostas por Wellburn (1994).

Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando o teste F, ao nível de 5% de probabilidade, por meio do uso do software *System Analysis Statistical* (SAS, 2004). Posteriormente para as causas de variação significativas aplicou-se o teste Tukey ($p < 0,05$). Realizou-se também, a correlação de Pearson entre os parâmetros nutricionais e produtivos da cultura utilizando o comando PROC CORR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os conteúdos de clorofila *a* e *b* variaram em função dos tratamentos nas duas épocas de avaliação (**Tabela 1**). Aos 90 dias após a adubação (d.a.a.) o conteúdo de clorofila *a* foi inversamente proporcional ao de clorofila *b*, sendo os valores médios de carotenóides semelhantes aos de clorofila *b*. Nas duas épocas de avaliação os resultados de clorofila *a* e *b* apresentaram proporção média de 3:1, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os apresentados por Von Elbe, (2000).

Os conteúdos de clorofila e carotenóides aos 150 d.a.a. diminuíram substancialmente em comparação

aos 90 d.a.a (**Tabela 1**). A deficiência de clorofila foi evidente pela aparência clorótica das plantas nessa época de avaliação. É importante ressaltar que no presente experimento houve infestação de ferrugem alaranjada, tendo em vista o clima úmido e quente predominante entre os meses de setembro de 2009 a março de 2010, o que favoreceu o desenvolvimento do fungo (*Puccinia kuehni*), proporcionando, provavelmente, redução da área fotossintética da cultura.

Aos 90 d.a.a. as plantas adubadas com sulfato de amônio foram as que apresentaram as maiores concentrações de clorofila *a* e carotenóides, diferindo dos demais tratamentos (**Tabela 1**). Com relação à concentração de clorofila *b* aos 90 d.a.a. a menor concentração no tratamento SA é uma evidência de que os conteúdos de clorofilas *a* e *b* são inversamente proporcionais. Aos 150 d.a.a. o controle se apresentou com concentração igual ou superior de clorofila *a* e *b* aos demais tratamentos. Esse resultado também é um forte indicativo de que nessa época a infestação de ferrugem alaranjada encontrava-se em estágio avançado nas folhas, reduzindo e igualando dessa forma, o conteúdo de clorofila e carotenóides no aparato fotossintético dos tratamentos. Em trabalho realizado por Donato et al (2004), cujo objetivo foi avaliar a eficiência no processo de assimilação do nitrogênio e encontrar parâmetros indicativos do potencial de fixação biológica em variedades de cana-de-açúcar, os autores concluíram que a redução nos níveis de nitrogênio ou ausência de adubação não afetaram significativamente o conteúdo das clorofilas *a* e *b* das plantas.

Houve efeito de fontes de N no valor SPAD e na concentração de N total da folha diagnóstico aos 90 d.a.a. (**Tabela 2**). O maior índice SPAD foi obtido para o tratamento SA (41), que diferiu do tratamento NA (39) e controle (39). Com relação à concentração de N total aos 90 d.a.a. o tratamento UR foi o que apresentou mais elevada concentração, diferindo apenas do controle. Aos 150 d.a.a., apesar de a estatística ter se mostrado significativa para os valores SPAD, não foi evidenciado efeito da adubação nitrogenada no N-total. O controle apresentou valor SPAD igual ou superior aos tratamentos com aplicação de fontes de N, não havendo também diferença entre os tratamentos na concentração de N total na folha diagnóstico (**Tabela 2**).

O uso do clorofilômetro também tem se mostrado eficiente para prever o stress fisiológico e hídrico da cultura da cana-de-açúcar. Guimarães (2011) avaliou os efeitos do déficit hídrico, em 20 variedades de cana-de-açúcar, visando identificar características para auxiliar no programa de



melhoramento da cultura, e constatou que a estimativa do conteúdo de clorofila por meio do clorofilômetro SPAD foi eficiente para diferenciar variedades de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis à deficiência hídrica. Silva et al. (2007), também consideraram o conteúdo relativo de clorofila estimado por meio do índice SPAD uma ferramenta eficaz para diferenciar cultivares de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis à deficiência hídrica.

As concentrações de clorofila *a* se correlacionaram positivamente com conteúdo de carotenoides ($r=0,8^{***}$), valor SPAD ($r=0,78^{***}$) e produtividade de colmos ($r=0,54^{***}$); e negativamente com as concentrações de clorofila *b* ($r= -0,97^{***}$) corroborando os dados apresentados na **tabela 1**. Para as concentrações de clorofila *b* foi verificada correlações negativas para concentração de carotenoides ($r= -0,83^{***}$) e o valor SPAD ($r= -0,84^{***}$). A correlação positiva do valor SPAD com a clorofila *a* pode estar diretamente relacionada à faixa de comprimentos de ondas associados à atividade da clorofila. O medidor portátil de clorofila possui diodos que emitem luz na faixa de 650 nm (vermelho) e 940 nm (infravermelho). A clorofila *a*, é capaz de absorver uma boa quantidade de energia no comprimento de 650 a 700 nm, enquanto a clorofila *b* absorve baixa quantidade de energia nessa faixa.

CONCLUSÕES

O clorofilômetro não apresentou relação com os teores de N total nas folhas +1 de cana-de-açúcar.

Os valores SPAD obtidos com utilização do clorofilômetro são considerados apropriados para prever o estado nutricional da cana-de-açúcar, em nitrogênio, por terem relação direta com a concentração de clorofila *a* na folha.

AGRADECIMENTOS

À usina Itacema, Grupo São Martinho pela concessão da área de estudo e à FAPESP pela bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS

BOLTON, J.K.; BROWN, R.H. Photosynthesis of grass species differing in carbon dioxide fixation pathways. V. Response of *Panicum maximum*, *Panicum milioides* and tallfescue (*Festuca arundinacea*) to nitrogen nutrition. *Plant Physiology*, 66:97-100, 1980.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G. DE; SOUZA, E. S. DE; FRANÇA, J. G. E. DE; MACIEL, G. A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas

in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:1087-1093, 2004.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisas de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: Embrapa Produção de informação; Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2006. 412 p.

ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. *Revista Brasileira de Fisiologia*, 3:39-45, 1991.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. 2. ed. Londrina: Editora Planta, 2006. 403 p.

GUIMARÃES, A.C.R. Caracterização de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) submetidas a déficit hídrico. 2011. 66 p. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57:1332-1334, 1979.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional de plantas. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MARSCHNER, P. Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. London: Academic Press, 2012. 651p.

VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. Química de los alimentos. 2. ed. Zaragoza: Editora Acribia, 2000. p. 782-799.

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 of Plant Physiology*, 144:307-313, 1994.

SILVA, M.A.; JIFON, J.L.; Da SILVA, J.A.G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19:193-201, 2007.

Tabela 1 – Concentrações de clorofila a, clorofila b e carotenóides na F+1 em função da aplicação de fontes de N na dose de 100 kg ha⁻¹

Fontes N	90 d.a.a.			150 d.a.a.		
	Clorofila a	Clorofila b	Carotenóides	Clorofila a	Clorofila b	carotenóides
.....µg g ⁻¹ de folha.....						
CONTROLE	96,3 b	38,1 a	29,2 ab	7,1 a	2,4 a	2,7
NITRO	104,7 b	33,2 ab	28,7 ab	4,8 b	1,5 ab	2,5
NA	108,1 b	34,9 a	27,9 ab	5,8 ab	1,5 ab	2,4
SA	127,6 a	27,1 b	30,9 a	5,5 b	1,5 ab	2,4
UR	93,4 b	39,8 a	26,5 b	4,4 b	1,2 b	2,4
DMS	17,3	7,6	4,4	1,6	1,1	0,7
Valor F	***	***	ns	***	**	ns
CV (%)	8,5	11,4	8,0	14,9	35,8	15,4

NITRO: YaraBela NitromagTM, NA: nitrato de amônio, SA: sulfato de amônio, UR: ureia. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey. ** e *** significativos a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente; ns: não significativo; DMS: diferença mínima significativa; CV (%): Coeficiente de variação

Tabela 2 – Valor SPAD e N total na folha+1 em função da aplicação de fontes de N na dose de 100 kg ha⁻¹ de N

Fontes N	90 d.a.a.		150 d.a.a.	
	SPAD	N total (g kg ⁻¹)	SPAD	N total (g kg ⁻¹)
CONTROLE	39 b	22 b	34 a	22
NITRO	40 ab	23 ab	33 ab	19
NA	39 b	23 ab	31 ab	19
SA	41 a	23 ab	31 ab	20
UR	40 ab	24 a	30 b	20
DMS	1,8	1,5	3,2	3,2
Valor F	**	**	**	ns
CV (%)	2,3	3,4	5,3	8,5

NITRO: YaraBela NitromagTM, NA: nitrato de amônio, SA: sulfato de amônio, UR: ureia. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey. ** significativo a 5% de probabilidade; ns: não significativo; DMS: diferença mínima significativa; CV (%): Coeficiente de variação