

PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS DETERMINADOS COM CLOROFILÔMETROS PORTÁTEIS EM GENÓTIPOS DE *COFFEA CANEPHORA* (PIERRE EX A. FROEHNER)

Angélica Tomazeli da Silva²; Josimar Aleixo da Silva³; Lucas da Silva Alves⁴; Paulo Cezar Cavatte⁵

¹ Trabalho Financiado pela FAPES

² Mestranda em Biologia Vegetal, UFES, angelicatamazeli.bio.2012@gmail.com

³ PhD, UFES, josimaraleixo_@hotmail.com

⁴ Estudante de agronomia, UFES, lucasagro.ufes@hotmail.com

⁵ Professor do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, UFES, cavattepc@hotmail.com

RESUMO: Com as alterações climáticas previstas e seus impactos sobre os regimes de chuvas e temperaturas, faz-se necessário o desenvolvimento de variedades tolerantes a tais alterações. Desta forma, é necessário o aperfeiçoamento das técnicas de fenotipagem empregando metodologias que possibilitem a obtenção de resultados mais rápidos, permitindo avaliar um maior número de genótipos em campo. Para este estudo foram utilizados genótipos de *Coffea canephora* cultivados em condições de campo na Fazenda Experimental Bananal do Norte, no Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER, localizado no município de Cachoeiro de Itapemirim, ES. Foram determinados índices de pigmentos fotossintéticos em folhas de ramos plagiotrópicos do cafeeiro, do terceiro ou quarto par, contadas a partir do ápice, com auxílio de dois clorofilômetros portáteis (ClorofiLOG[®] CFL 1030, Falker; Dualex Scientific (“dual excitation”, Force-A, Orsay, France), sendo as mesmas folhas coletadas para análises bioquímicas de clorofila “a”, “b” e total. Observou-se relações significativas entre as concentrações estimadas pelos clorofilômetros com as concentrações obtidas por meio de metodologias bioquímicas, destrutivas. Desta forma, os clorofilômetros portáteis podem ser indicados para a determinação de pigmentos fotossintéticos em folhas de genótipos de *Coffea canephora*, sendo ferramentas úteis para a fenotipagem em larga escala.

PALAVRAS-CHAVE: conilon, fenotipagem, fotossíntese.

PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS DETERMINED WITH PORTABLE CHLOROPHYLL METERS IN *COFFEA CANEPHORA* GENOTYPES (PIERRE EX A. FROEHNER)

ABSTRACT: With the expected climate change and its impact on rainfall and temperature regimes, it is necessary to develop varieties that are tolerant of such changes. Therefore, it is necessary to improve the phenotyping techniques using methodologies that allow faster results, which allows to evaluate a greater number of genotypes in the field. For this study we used *Coffea canephora* genotypes grown in field conditions at the Bananal do Norte Experimental Farm, at the Capixaba Institute for Research, Technical Assistance and Rural Extension - INCAPER, located in Cachoeiro de Itapemirim, ES. Photosynthetic pigment indices were determined on leaves of plagiotropic coffee branches of the third or fourth pair, counted from the apex, with the help of two portable chlorophyll meters (ClorofiLOG[®] CFL 1030, Falker; Dualex Scientific (“double excitation”, Force-A, Orsay, France)), the same leaves are collected for biochemical analysis of chlorophyll “a”, “b” and total. Significant relationships were observed between the concentrations estimated by chlorophyll meters and the concentrations obtained by destructive biochemical methodologies. Therefore, portable chlorophyll meters may be indicated for the determination of photosynthetic pigments in *Coffea canephora* genotype sheets, being useful tools for large-scale phenotyping.

KEY WORDS: conilon, phenotyping, photosynthesis.

INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade importante do setor agropecuário do Brasil, com importante papel no desenvolvimento socioeconômico do país (FASSIO; SILVA, 2007). Atualmente são reconhecidos mais de 100 espécies de café, sendo que as mais importantes comercialmente são as espécies *Coffea canephora* (café conilon) e *Coffea arabica* (café arábica) (DAVIS et. al, 2011), com safra estimada em 36,98 milhões de sacas de *Coffea arabica* e 13,94 milhões de sacas de *Coffea canephora* (CONAB, 2019). No entanto, de acordo com as alterações climáticas que são previstas pelo IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) e seus possíveis impactos sobre os regimes de chuvas, umidade e temperatura, faz - se necessário que se desenvolvam variedades que apresentem tolerância a tais alterações. Para isso ainda é necessário avaliações de um grande número de genótipos em condições de campo, no entanto essas avaliações ainda são realizadas de forma destrutiva, demandando mais recursos, espaço e tempo. Por outra perspectiva, há metodologias menos invasivas, e de mais rápidas análises que permitem a avaliação de um maior número de genótipos em menor tempo, sem a necessidade de estrição do material vegetal (MIELKE, et. al, 2012). As técnicas de fenotipagem vem passando por processos de aperfeiçoamento, através de metodologias que possibilitem obtenção de

resultados de forma mais rápida e avaliação de um número maior de amostras (FURBANK; TESTER, 2011; CHEN et al., 2011). Dentre os principais métodos de fenotipagem destacam-se as análises de parâmetros fotossintéticos, por meio da utilização de clorofilômetros portáteis, que permitem a mensuração de forma não destrutiva (BERG & PERKINS, 2004) e, devido a sua praticidade, possibilita a comparação de um grande número de tratamentos. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é determinar a concentração de pigmentos fotossintéticos através da utilização de clorofilômetros portáteis ClorofiLOG® (CFL 1030 Falker) e Dualex Dualex Scientific (“dual excitation”, Force-A, Orsay, France), e relaciona-los, por meio de regressões lineares, com as concentrações de clorofilas obtidas de forma bioquímica, de forma a estabelecer modelos matemáticos para se determinar a concentração de pigmentos fotossintético em genótipos de *Coffea canephora* de forma rápida e não destrutiva, possibilitando a fenotipagem em larga escala.

METODOLOGIA

O experimento foi instalado na Fazenda Experimental Bananal do Norte (FEBN), do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER, localizada no município de Cachoeiro de Itapemirim, ES. Foram utilizados seis genótipos de *Coffea Canephora*, implantados em delineamento experimental inteiramente casualizados (DIC), com 5 repetições. Com a utilização de dois clorofilômetros portáteis (ClorofiLOG® CFL 1030 Falker; Dualex Scientific, “dual excitation”, Force-A, Orsay, France), foram realizadas avaliações no terço médio das plantas, em folhas de ramos plagiotrópicos, do terceiro ou quarto par contadas a partir do ápice. Foram mensurados índices de clorofila, flavonoides, antocianinas e Índice de Balanço de Nitrogênio. Realizou-se duas medições em cada folha (sendo duas folhas por indivíduo avaliado). Após as mensurações não destrutivas, as mesmas folhas foram coletadas para posteriores análises bioquímicas no laboratório de botânica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da UFES, Campus de Alegre- ES. Os dados obtidos por meio das avaliações foram submetidos a análises de regressões lineares utilizando o Software RStudio, integrado ao Programa R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os clorofilômetros portáteis estimam a intensidade do verde foliar, apresentando unidades adimensionais, ou seja, não expressam os resultados em concentrações reais, desta forma há a necessidade de se estabelecer relações a fim de que se possa, com a utilização destes equipamentos, estimar concentrações reais de pigmentos fotossintéticos. Nota-se que ambos os aparelhos utilizados neste estudo apresentam similaridades nas leituras (Figura 1), sendo que o ClorofiLOG apresenta valores de índices maiores que os estimados pelo Dualex. O uso de um ou outro, portanto, depende da necessidade do pesquisador, pois o ClorofiLOG estima índices de clorofila “a”, “b” e total, e o Dualex estima índices de clorofila total, bem como antocianinas, flavonoides, e balanço de nitrogênio.

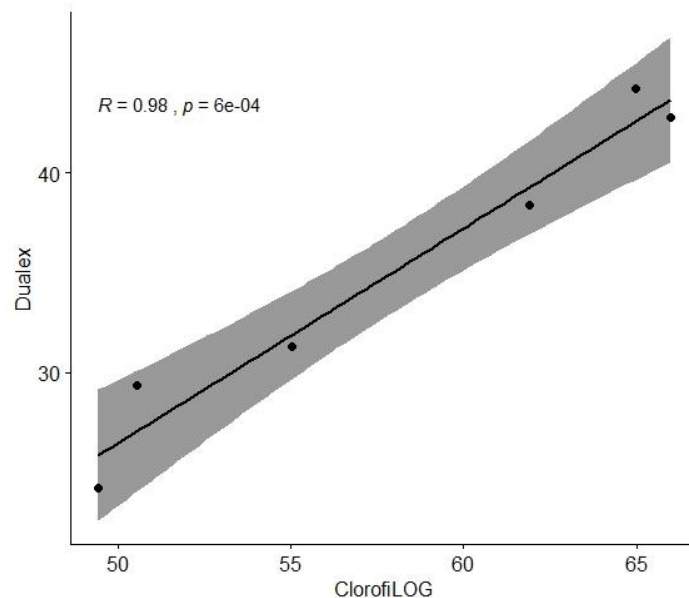


Figura 1. Análise comparativa de clorofilômetros portáteis na estimada de índices de Clorofila Total em genótipos de *Coffea canephora*.

O teor de clorofila total quando comparado por meio de regressão linear com os índices estimados através de ambos os clorofilômetros apresentaram parâmetros de regressão significativos (Figura 2), com p valor <0,05.

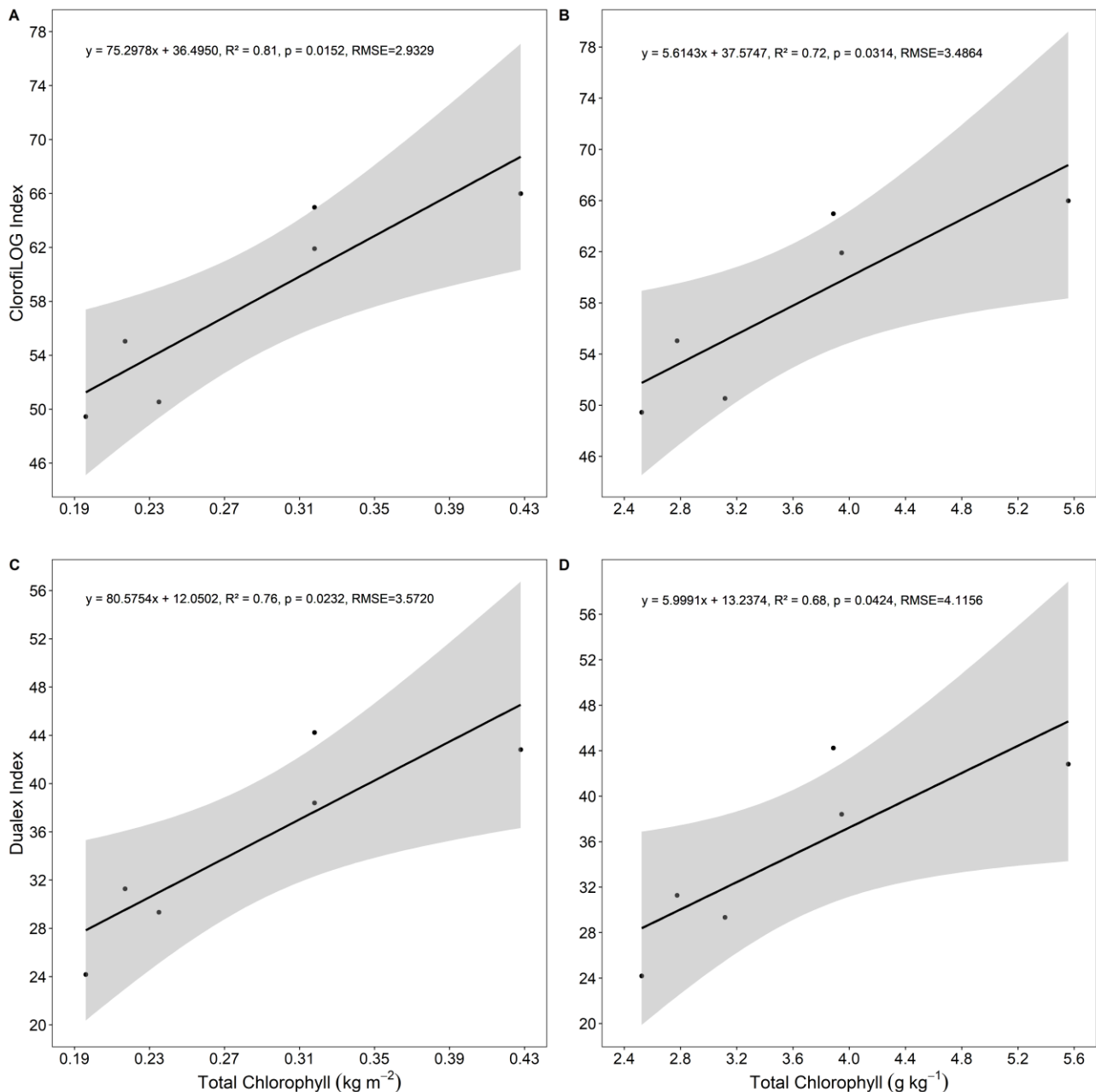


Figura 2. Análise comparativa entre o índices de clorofila total e as concentrações de clorofila obtidas por meio de análises bioquímicas em genótipos de *Coffea canephora*. (A) e (B) Índice de Clorofila obtidos com ClorofiLOG e Concentração de Clorofila em base de área e massa, respectivamente; (C) e (D) Índice de Clorofila obtidos com Dualex e Concentração de Clorofila em base de área e massa, respectivamente.

Nota-se que ambos clorofilômetros apresentam similaridades nas relações estabelecidas, apresentando resultados mais satisfatórios quando representados em base de área, visto que o efeito da espessura foliar é eliminado expressando-se os resultados em área, pois considera-se para tal a área foliar específica, que é expressa como a razão entre a área foliar e a massa seca das folhas. Considerando-se os resultados obtidos, pode-se utilizar o ClorofiLOG e o Dualex para se estimar a concentração de clorofila foliar de forma não destrutiva, visto que durante a extração e diluição para quantificação de clorofilas, perdas significativas de pigmento podem ocorrer, levando a uma alta variabilidade nos resultados (Netto et. al., 2005). Desta forma, as metodologias não destrutivas, por permitirem mensurações sem a necessidade de coleta do material vegetal, são boas ferramentas para a determinação de tais pigmentos, bem como permitem avaliar um número maior de amostras, em um intervalo menor de tempo. Netto et. al, 2005 em um trabalho semelhante, realizado com a utilização do clorofilômetro portátil SPAD-502, Minolta, obteve também relações significativas com a utilização de modelos quadráticos. Observa-se que, dependendo do clorofilômetro a ser utilizado, as relações obtidas podem variar de lineares (no presente estudo) à quadráticas e polinomiais. Deferentemente do relatado por Netto et. al., 2005, para

índices de clorofila a e b obtidos com ClorofiLOG, obteve-se resultados satisfatórios utilizando modelos lineares simples, considerando-se $p < 0,05$ (Tabela 1).

Tabela 1. Equação e calibração para os índices de clorofila “a” e “b”. A equação converte os valores de índices em concentrações de clorofila.

Method	Expressed	y	r ²	RMSE	p value	Calibration equation
ClorofiLOG	Area	Chlorophyll a Index	0.81	0.8709	0.0143	$y = 32.3089x + 33.7775$
		Chlorophyll b Index	0.78	2.2294	0.0205	$y = 174.4145x + 0.0814$
	Mass	Chlorophyll a Index	0.72	1.0520	0.0316	$y = 2.4023x + 34.1792$
		Chlorophyll b Index	0.69	2.6160	0.0404	$y = 12.9050x + 1.0237$

Os dados obtidos para índices de clorofila a e b também são melhores expressos em base de área, pois anula o efeito da espessura foliar nos resultados, obtendo-se resultados mais precisos. Os clorofilômetros portáteis também já são indicados para utilização em várias culturas, dentre elas, trigo (Shah et. al., 2017), lichia (Fu et. al., 2013), e mamona (Rigon et. al, 2012), batateira (Coelho et. al., 2012), e café conilon (Netto et. al., 2005). As clorofilas são os pigmentos responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia, sob a forma de ATP e NADPH. Por essa razão, estes pigmentos estão estreitamente relacionados com a eficiência fotossintética das plantas, produzindo os metabólitos necessários para os processos fisiológicos (Taiz et. al., 2017). Desta forma, quantificar concentrações de clorofilas em tecido foliar fornece informações sobre o estado fisiológico do vegetal. Desta forma, observa-se que tais equipamentos podem ser boas ferramentas para auxiliar na determinação de concentrações de pigmentos fotossintéticos, de forma indireta e não destrutiva.

CONCLUSÕES

1. Ambos os clorofilômetros apresentaram similaridades em suas leituras, sendo os valores estimados pelo ClorofiLOG maiores do que os estimados pelo Dualex Scientific.
2. Ambos equipamentos demonstraram boas correlações com as concentrações de clorofilas obtidas por meio de metodologias laboratoriais, sendo os resultados melhores representados em base de área.
3. Desta forma, o ClorofiLOG e o Dualex podem ser utilizados para estimar a concentração de clorofilas em genótipos de *Coffea canephora*, de forma indireta e não destrutiva.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo – FAPES; ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER; a Universidade Federal do Espírito Santo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERG, A. K. V. D.; PERKINS, T. D. Evaluation of a portable chlorophyll meter to estimate chlorophyll and nitrogen contents in sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) leaves. *Forest Ecology and Management*, v. 200, p. 113 – 117, 2004.
- COELHO, F. S.; FONTES, P. C. R.; FINGER, F. L.; CECON, P. R. Avaliação do estado nutricional do nitrogênio em batateira por meio de polifenóis e clorofila na folha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n. 4, p. 584-592, 2012.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: café, safra 2019. v. 5, n. 1, 2019.
- DAVIS, A. P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M. F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 167, p. 357-377, 2011.
- FASSIO, L.H.; SILVA, A.E.S. Importância Econômica e Social do Café Conilon. In: FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; BRAGANÇA, S.M.; FERRÃO, M.A.G.; DEMUNER, L.H. (Ed.) *Café Conilon*. Vitória, ES: Incaper, Cap.1, p.35-49. 2007.
- FURBANK, R.T.; TESTER, M. Phenomics – Technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends in Plant Science*, v. 16, p. 635-644, 2011.
- FU, X. et al. Relating photosynthetic performance to leaf greenness in litchi: A comparison among genotypes. *Scientia Horticulturae*, v. 152, p.16-25, 2013.
- IPCC - INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability*, Geneva, Switzerland, 151 p, 2014.
- MIELKE, M. S.; SCHAFFER, B.; SCHILLING, A. C. Evaluation of reflectance spectroscopy índices for estimation of chlorophyll content in leaves of a tropical tree species. *PHOTOSYNTHETICA International Journal for Photosynthesis Research*. v. 50, n. 3, p. 343 – 352, 2012.

NETTO, A. T. et al. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae*, v. 104, n. 2, p.199-209, 2005.

RIGON, J. P. G. et al. Non-destructive determination of photosynthetic pigments in the leaves of castor oil plants. *Acta Scientiarum*, v. 34, n. 3, p.325-329, 2012.

SHAH, S. H.; HOUBORG, R.; MCCABE, M. F. Response of Chlorophyll, Carotenoid and SPAD-502 Measurement to Salinity and Nutrient Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*, v. 61, p.2-21, 2017.

TAIZ, L. ZEIGER, E. MØLLER, I. M. MURPHY, A. Fotossíntese: reações luminosas. *Fisiologia Vegetal* 6ªed, p. 171-199, 2017.