

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Características Estruturais, Teores de Clorofila e suas Relações com o
Nitrogênio Foliar e a Biomassa em Capim-Tifton 85**

Élio Barbieri Junior

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS, TEORES DE CLOROFILA E
SUAS RELAÇÕES COM O NITROGÊNIO FOLIAR E A BIOMASSA
EM CAPIM-TIFTON 85**

ÉLIO BARBIERI JUNIOR

Sob a Orientação do Professor
Roberto Oscar Pereyra Rossiello

e Co-orientação do Professor
Mirton José Frota Morenz

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2009

631.842

B236c

T

Barbieri Junior, Élio, 1982-

Características estruturais, teores de clorofila e suas relações com o Nitrogênio foliar e a biomassa em Capim-Tifton 85 / Élio Barbieri Junior – 2009. 49. : il.

Orientador: Roberto Oscar Pereyra Rossiello.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Bibliografia: f. 43-49

1. Nitrogênio na agricultura – Teses. 2. Capim das bermudas - Teses. 3. Adubos e fertilizantes - Teses. 4. Nitrogênio – Fixação – Teses. 5. Adubação foliar - Teses. I. Rossiello, Roberto Oscar Pereyra, 1948-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

ÉLIO BARBIERI JUNIOR

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20 / 02 / 2009

Roberto Oscar Pereyra Rossiello Dr. UFRRJ
(Orientador)

Domingos Sávio Campos Paciullo Dr. EMBRAPA

Carlos Augusto de Miranda Gomide Dr. EMBRAPA

À **Deus**, forma suprema de energia, meu criador e senhor.

Ao orientador e amigo Professor **Roberto** pelo seu exemplo de vida e superação.

À minha esposa **Roberta**, pela paciência, compreensão, e pela presença durante esta jornada.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus grande criador do universo pela fé, esperança e por iluminar meus caminhos.

Ao Prof. Dr. Roberto Oscar Pereyra Rossiello, que tanto admiro, pela orientação, confiança, apoio, pelo constante estímulo e pelo carinho e amizade adquirida. A sua esposa Iracema pelo carinho e paciência.

A minha esposa e companheira de todas as horas Roberta Cristiane Ribeiro que foi fundamental para a conquista deste grande sonho. Amo muito você.

Aos meus pais Élio Barbieri e Aladaides T. Barbieri e minhas irmãs Juliana Barbieri e Bianca L. Barbieri pelo amor e incentivo, a este filho e irmão ausente.

Ao professor Mirton J. F. Morenz do Instituto de Zootecnia pela grande ajuda no planejamento e execução das análises.

A Osvaldo Tolentino Ribeiro e Neide Teruco Ribeiro pelo incentivo e pelas orações.

A Márcio Albuquerque da Falker Automação Agrícola, pelos esclarecimentos e orientações técnicas.

Aos Professores Dr. Carlos Luiz Massard e Dr. Laerte Grisi do Departamento de Parasitologia Animal, coordenadores da Estação Experimental de Parasitologia Wilhelm Otto Neitz do Instituto de Veterinária da UFRRJ, pela concessão da área experimental.

Aos funcionários Betinho, Paulo, Pedro Timótio, Valdecir Galvão, Guilherme e Frank Sarubi que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos amigos Rosani Matoso, Wellington Urselino, Bruno de Souza, Rosana Lorena, Raquel Amorim, Raphael Pavesi, Bruna, Leonardo, Juliana, Jéferson, Osmário, Camila e José Igor pelo auxílio nos trabalhos de campo e análises em laboratório.

Aos professores e pesquisadores, Carlo Alberto Varella, Sérgio Trabali, José Guilherme M. Gerra, Manilo Silvetre Fernandes e João Paulo Guimarães Soares e Josué Lopes de Castro que contribuíram para a realização e melhoria deste trabalho.

Aos Professores Gonzalo E. Moya Borja, Marco Edilson F. de Lima e João Carlos de Carvalho Almeida pelas importantes contribuições na minha formação acadêmica.

A Neide Thurler, Débora Cardoso e Márcia Aguiar do NAAP. A Kátia Regina, Cremilda e Wanda do DPPG e a Professora Aurea Echevarria, Decana de Pós-Graduação pela atenção, profissionalismo e competência dedicados ao longo da graduação e do mestrado.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Instituto de Zootecnia.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

Ao CNPq pelos recursos financeiros fornecidos para realização do projeto.

E a todos que por circunstância do momento não foram citados, e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Élio Barbieri Junior, filho de Élio Barbieri e de Aladaides Terezinha Barbieri, nasceu no dia 25 de Fevereiro de 1982, no município de Sinop, norte do estado de Mato Grosso.

Cursou o primeiro grau em escolas estaduais de Mato Grosso e concluiu o segundo grau na Escola Agrotécnica Federal de Cuiabá.

Obteve formação de Técnico Agrícola com habilitação em Zootecnia pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Cuiabá (CEFET-Cuiabá).

Em 2002 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), onde cursou um semestre.

Ainda em 2002 iniciou novamente os estudos pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), graduando-se como Médico Veterinário em Agosto de 2007.

Durante a Graduação foi bolsista na categoria de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante o período de 2004-2007. Na graduação foi monitor de ensino da disciplina Plantas Forrageiras por um ano.

Em agosto de 2007 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRRJ em nível de Mestrado, com bolsa da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Concluiu o curso de Mestrado em Fevereiro de 2009.

Em Março do mesmo ano iniciou seu doutoramento em Zootecnia na mesma instituição.

RESUMO

BARBIERI JUNIOR, Élio. **Características estruturais, teores de clorofila e suas relações com o nitrogênio foliar e a biomassa em capim-Tifton 85**. 2009. 49p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Dentre as propriedades bioquímicas relacionadas à utilização do nitrogênio (N) pelas plantas, os teores de clorofila ocupam posição de destaque. Por essa razão, e dada a importância que a adubação nitrogenada tem na expressão da produtividade das pastagens, tem sido desenvolvidas metodologias que permitem a determinação do teor de clorofila por procedimentos indiretos e não destrutivos. No intuito de fornecer subsídios para a definição de estratégias de adubação nitrogenada em pastagens de *Cynodon* spp. cv. Tifton 85 foi instalado um experimento com o propósito primordial de verificar o desempenho de um clorofilômetro comercial. Foi utilizada uma estratégia experimental consistente na indução de três níveis de disponibilidade de N no solo, através de adubação nitrogenada. As hipóteses que guiaram o experimento foram as seguintes: *i*) níveis diferenciados de N no solo, resultam em teores diferenciados de clorofila em folhas recém emergidas; *ii*) leituras obtidas com um clorofilômetro guardam relação com os teores foliares das clorofilas; *iii*) teores de clorofila total relacionam-se com os teores foliares de N; e *iv*) os indicadores ligados à clorofila foliar guardam relação com a produção de matéria seca. O experimento foi desenvolvido sobre um Planossolo Háplico, no campo experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, município de Seropédica, RJ, durante o período de julho a dezembro de 2008. O experimento foi disposto segundo um desenho em blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições. Os tratamentos, alocados nas parcelas (4x4m), consistiram de três níveis de N (0; 75 e 150kg N-uréia/ha), enquanto que nas sub-parcelas, foram alocadas quatro datas de coletas, contados a partir um corte de uniformização, realizado 131 dias após o plantio do capim. Três das datas de amostragem foram pre-fixadas, aos 8, 16 e 24 dias, enquanto a última foi realizada quando a pastagem atingiu um nível de interceptação de 95% da radiação fotossinteticamente ativa incidente. A dinâmica estrutural foi acompanhada através da mensuração das seguintes variáveis do dossel: altura; densidade populacional de perfilhos; índice de área foliar, índice de cobertura verde, e acúmulo de massa verde seca. As clorofilas *a*, *b*, e (*a+b*), foram quantificadas, sempre em primeiras folhas completamente expandidas de perfilhos de sol, pelo método de Arnon modificado, e indiretamente, com um aparelho ClorofiLOG[®]. Os teores de N total foram determinados nas mesmas folhas, pelo método de Kjeldhal. Os resultados mostraram que os teores de clorofila *a*, *b* e (*a+b*) diferiram entre doses de N, e dias de amostragem, atingindo diferenças máximas entre as doses de N aos 24 dias após corte. As leituras do clorofilômetro (Índice de Clorofila Falker, ICF) e os teores de N foliar também responderam sensivelmente às doses de N, atingindo valores máximos aos 16 dias. Nesse mesmo dia, a análise de regressão linear entre os teores de clorofila total e de N total, contra os respectivos valores de ICF resultou em coeficientes de determinação de 0,93 e 0,89 respectivamente. O coeficiente de correlação entre a massa verde seca total e os valores de ICF foi de 0,867. O acúmulo de matéria verde seca total aos 28 dias após o corte relacionou-se linearmente com as leituras do clorofilômetro feitas aos 16 dias ($r^2=0,72$), um tipo de resultado promissor em termos de estimativas de disponibilidade de forragem. Como conclusão, os resultados permitiram verificar que os teores de clorofila total presentes na primeira folha totalmente expandida, responderam à aplicação de doses diferenciadas de N e se relacionaram estreitamente com os teores de N foliar. Ambos os atributos foram discriminados de forma precisa pelo clorofilômetro sob avaliação. Este aparelho maximizou o

seu desempenho no período onde ocorreram os máximos teores de N foliar, relacionando-se diretamente com a matéria seca acumulada no final do período de rebrota.

Palavras-chave: *Cynodon* spp. Absorbância foliar. Adubação nitrogenada. Clorofilômetro.

ABSTRACT

BARBIERI JUNIOR, Élio. **Structural characteristics, chlorophyll contents and its relationship with leaf nitrogen and biomass in Tifton 85 bermudagrass.** 2009. 49p. Dissertation (Master Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Among the biochemical properties related to the use of nitrogen (N) for the plants, chlorophyll pigments occupy a relevant position. For that reason, and given the importance of the N fertilization for pasture productivity, it has been developed methodologies that allow determining leaf chlorophyll contents for indirect and non destructive procedures. With the purpose of supplying subsidies for N fertilization management in pastures of *Cynodon* spp. cv. Tifton 85 was installed an experiment with purpose of verifying the performance of a commercial chlorophyll meter. The experimental strategy consisted of the induction of three levels of soil N availability, through N fertilization. The working hypotheses were the following ones: *i*) different soil N availabilities result in differentiated leaf chlorophyll contents in leaves recently emerged and fully expanded; *ii*) readings obtained with a chlorophyll meter are related with foliar Total chlorophyll contents; *iii*) chlorophyll contents are related with foliar N concentrations; e *iv*) chlorophyll content indicators keep relationship with green dry matter production. This study was carried out on a Haplic Planosol at the Experimental Campus of the Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, during the period of July to December 2008. An entirely randomized block design was used, with four repetitions. Main treatments were allocated in plots (4x4 m) and consisted of three N fertilization levels (0; 75 and 150kg N-uréia). Four sampling dates designed as days from a standardization cut made 131days after planting were allocated in sub-plots. Three of the sampling dates (8, 16 and 24 days) were pre-fixed, while the last was accomplished when the sward interception level of photosynthetically active radiation reached a value of 95%. Structural dynamics was followed by monitoring the following canopy variables: sward height; tiller density, leaf area index, green cover index and green dry mass accumulation. Chlorophylls *a*, *b* and (*a+b*) were measured always in the first fully expanded leaves of sun tillers by the Arnon method with modifications, and indirectly, with the chlorophyll meter ClorofiLOG[®]. In the same type of leaves, total N content was determined by Kjeldhal routine procedures. Principal results showed that concentrations of chlorophylls *a*, *b* and (*a + b*) in Tifton leaf blades were affected by nitrogen fertilization and sampling dates reaching maximal differences at the 24th day after cut. Chlorophyll meter readings (Falker Chlorophyll Index, FCI) and foliar N contents also responded very sensibly to N rates, reaching maximal values at the 16th day after cut. In the same day, Total chlorophyll contents and Total N leaf contents were also significantly correlated with FCI values, with r^2 coefficients of 0,93 and 0,89 respectively. Correlation coefficient between total green dry matter and FCI values was 0,867. Total green dry matter accumulation at the last sampling date and FCI readings at 16th day after cut also resulted significantly related ($r^2 = 0,72$), a promising relation for purposes of forage yield estimation. In conclusion, the obtained results allow affirming that, in Tifton 85, total chlorophyll content present in the first leaf totally expanded is a sensitive marker of soil N availability and therefore of N fertilization needs. Total chlorophyll content through its relationship with leaf N contents may be also a valuable tool for foliar N diagnosis. Both attributes were discriminated properly by the chlorophyll meter under evaluation. This apparatus maximized its performance in the period were happened the highest leaf N content and linking directly with final green dry matter accumulation.

Key words: *Cynodon* spp. Foliar absorption. N fertilization. Chlorophyll meter.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resultados da análise da fertilidade do solo da área experimental. Amostragem em Agosto de 2008.....	11
Tabela 2.	Teores de pigmentos foliares em Tifton 85 utilizando-se diferentes métodos de extração.....	20
Tabela 3.	Níveis de significação estatística (teste F) para as análises de variância das variáveis estudadas no experimento com Tifton 85.....	23
Tabela 4.	Altura do dossel de Tifton 85, em função de níveis de aplicação de N e dos dias após um corte de uniformização. Valores médios de quatro repetições.....	24
Tabela 5.	Produção de massa verde seca total (g.m^{-2}) do Tifton 85 em função dos níveis de adubação nitrogenada e das épocas de amostragem.....	29
Tabela 6.	Coefficientes de correlação linear simples (Pearson) aos 16 e 24 DAC.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Superior: Espectro de absorção das clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> e de carotenóides em função do comprimento de onda, entre 400-700nm. Inferior: Taxa fotossintética relativa, dentro da mesma banda espectral. (Adaptado de GOVINDJEE e WHITMARSH, 1982).....	4
Figura 2.	Relação generalizada para absorbância total vs teor de clorofila total por unidade de superfície foliar, de acordo com o modelo de Evans (1993).....	5
Figura 3.	Valores diários das médias de temperaturas mínimas e máximas do ar, e da precipitação pluviométrica, registrada durante o período experimental (30/11-28/12/2008, Seropédica, RJ).....	12
Figura 4.	Valores de radiação solar global ($\text{MJ.m}^2.\text{dia}^{-1}$) registrados na região durante o período experimental (30/11-28/12/2008, Seropédica, RJ).....	12
Figura 5.	Vista parcial das parcelas experimentais, instaladas em Planossolo Háplico. Novembro de 2008, Seropédica, RJ.....	14
Figura 6.	Avaliação da Radiação Fotossinteticamente Ativa interceptada.....	15
Figura 7.	A) Exemplo de imagem recortada, correspondente a uma parcela com capim Tifton 85. B) Imagem classificada: as áreas escuras correspondem a solo descoberto e/ou solo coberto com liteira, e as áreas claras, à vegetação verde. O ICV, neste exemplo, é igual a 0,56.....	17
Figura 8.	Detalhe dos discos foliares e da lâmina da primeira folha completamente expandida, mostrando a região de extração de discos de tecido verde.....	18
Figura 9.	Fotografia lateral e frontal do aparelho clorofiLOG [®] - CFL 1030.....	20
Figura 10.	Teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e Total (<i>a+b</i>) extraídas de discos foliares de folhas de Tifton 85 por cinco metodologias diferentes, em função do tempo de extração. A: N ^o N-dimetilformamida (MORAN, 1982); B: Acetona 80% (modificado de ARNON, 1949); C: Álcool Absoluto (WINTERMANS e DE MOTTS, 1965); D: Acetona 80% (PORRA et al., 1989); E: Dimetilsulfóxido (BARNES et al., 1992).....	21
Figura 11.	Taxas médias de crescimento em altura (m.dia^{-1}) de dosséis de Tifton 85 sob três doses de adubação nitrogenada. As taxas foram calculadas a partir dos dados primários mostrados na Tabela 4.....	25
Figura 12.	Variação temporal da densidade populacional de perfilhos em parcelas experimentais de Tifton 85, em função de três níveis de adubação nitrogenada. As curvas de ajuste correspondem ao modelo sigmoidal de Boltzmann. Barra vertical indica o desvio padrão da média.....	26
Figura 13.	Variação temporal do Índice de Área Foliar em parcelas experimentais de Tifton 85, em função de três níveis de adubação nitrogenada. As curvas de ajuste correspondem ao modelo polinomial cúbico, para os níveis 75 e 150 N e quadrático para 0 N. Barra vertical indica o desvio padrão da média.....	27
Figura 14.	Variação temporal do Índice de Cobertura Verde em parcelas experimentais de Tifton 85, em função de três níveis de adubação nitrogenada. As curvas de ajuste correspondem ao modelo sigmoidal de Boltzmann. Barra vertical indica o desvio padrão da média.....	28
Figura 15.	Variação temporal da Interceptação de radiação fotossinteticamente ativa (RFAint, %), em parcelas experimentais de Tifton 85, em função de três níveis de adubação nitrogenada. As curvas de ajuste correspondem ao modelo sigmoidal de Boltzmann. Barra vertical indica o desvio padrão da média.....	29
Figura 16.	Variação temporal da produção de massa verde seca (MVS g.m^{-2}) da parte	

	aérea do Tifton 85, para três níveis de adubação nitrogenada, em função do período de rebrota (Dias após corte). As curvas de ajuste correspondem ao modelo exponencial. Barras verticais indicam o desvio padrão da média.....	30
Figura 17.	Variação temporal dos teores de clorofila extraídos de discos foliares de folhas do Tifton 85, em função de três níveis de adubação nitrogenada. A) Clorofila total; B) Clorofila <i>a</i> ; C) Clorofila <i>b</i> . As curvas conectando os pontos foram geradas pelo procedimento de análise gráfico “Cubic spline”. Barra vertical indica o desvio padrão da média.....	32
Figura 18.	Variação temporal de leituras do clorofilômetro (ICF) para o teor de clorofila total em folhas do Tifton 85, após corte de uniformização, para três níveis de adubação nitrogenada. As curvas conectando os pontos foram geradas pelo procedimento de análise gráfico “Cubic spline”. Barra vertical indica o desvio padrão da média.....	33
Figura 19.	Relação linear entre teor de clorofila total ($a+b$, $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{.folha}$) e os valores das leituras do clorofilômetro CFL 1030. A variabilidade dos dados é produto de três níveis de aplicação de N (0, 75 e 150kg/ha) em parcelas de Tifton 85. A) Amostragem realizada aos 16 dias após corte; B) Amostragem realizada aos 16 dias após corte.....	34
Figura 20.	Variação temporal dos teores de N foliar da primeira folha completamente expandida do capim Tifton 85, para três níveis de adubação nitrogenada. As curvas conectando os pontos foram geradas pelo procedimento de análise gráfico “Cubic spline”. A linha horizontal tracejada indica o máximo teor médio de N. Barra vertical indica o desvio padrão da média.....	35
Figura 21.	Correlação entre os teores de N foliar total (mg.g^{-1}) e de clorofila total ($a+b$, $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{.folha}$). A variabilidade dos dados é produto de níveis de N (0, 75 e 150kg/ha) e datas de amostragem. A) Coeficiente de correlação para as quatro datas de amostragem; B) Coeficiente de correlação para os dados correspondentes aos 16 e 24 dias. As barras indicam os desvios padrão das médias, na horizontal, para o teor de clorofila total; na vertical, para o teor de N foliar.....	36
Figura 22.	Relação linear entre teor de clorofila total ($a+b$, $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{.folha}$) e os teores de N foliar da primeira folha completamente expandida. A variabilidade dos dados é produto de três níveis de N (0, 75 e 150kg/ha) em parcelas de Tifton 85. Círculo cinza: parcelas que não receberam N; Círculo vazio: 75kg N/ha; Círculo bicolor: 150kg N/ha. Valores referentes a amostragem realizada aos 16 dias após corte.....	37
Figura 23.	Correlação entre os teores de N foliar total (mg.g^{-1}) e as leituras do clorofilômetro CFL 1030. A variabilidade dos dados é produto de níveis de N (0, 75 e 150kg/ha) e datas de amostragem. A) Coeficiente de correlação para as quatro datas de amostragem; B) Coeficiente de correlação para os dados correspondentes aos 16 e 24 dias. As barras indicam os desvios padrão das médias, na horizontal, para a leitura do ClorofiLOG; na vertical, para o teor de N foliar.....	38
Figura 24.	Relação linear entre o Teor de N em folhas de Tifton 85 e valores ICF, obtidos 16 dias após o corte de uniformização.....	38
Figura 25.	Relação linear entre valores ICF e a produção de massa verde seca total (MVST).....	39
Figura 26.	Relação linear entre os teores de clorofila total ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{.folha}$) e a produção de massa verde seca (MVS g.m^{-2}).....	40

Figura 27. Relação linear entre leitura do clorofilômetro (ICF) aos 16 dias e a produção de massa verde seca (MVS g.m^{-2}) aos 28 dias..... 41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Estrutura e Propriedades das Clorofilas.....	3
2.2 Índice de Área Foliar.....	5
2.3 Relações Entre Teores de Clorofila e Capacidade Fotossintética.....	6
2.4 Clorofila e Estresses Ambientais.....	7
2.5 Quantificação de Clorofilas.....	7
2.6 Nitrogênio e Crescimento Vegetal.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Localização da Área Experimental.....	11
3.2 Caracterização Edafoclimática.....	11
3.2.1 Solo.....	11
3.2.2 O clima regional e local.....	11
3.3 Utilização Anterior da Área Experimental.....	13
3.4 Preparo da Área.....	13
3.5 Plantio.....	13
3.6 Tratamentos.....	14
3.7 Monitoramento das Variáveis Experimentais.....	15
3.7.1 Radiação fotossinteticamente ativa (RFA).....	15
3.7.2 Altura do dossel.....	16
3.7.3 Índice de área foliar (IAF).....	16
3.7.4 Índice de cobertura verde (ICV).....	17
3.7.5 Perfilhamento e produção de massa seca verde.....	18
3.7.6 Teor de clorofila foliar.....	18
3.7.7 Teores de nitrogênio foliar.....	22
3.8 Análises Estatísticas.....	22
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	23
4.1 Efeitos das Doses de N e dos Dias Após o Corte (Épocas de Amostragem): Níveis de Significação Estatística.....	23
4.2 Altura do Pasto.....	23
4.3 Número de Perfilhos.....	25
4.4 Índice de Área Foliar, Índice de Cobertura Verde, e Interceptação de Luz.....	26
4.5 Produção de Massa Seca.....	29
4.6 Teores de Clorofila Foliar.....	30
4.7 Leituras do Clorofilômetro.....	33
4.8 Relação Entre Teor de Clorofila Total e Leitura do Clorofilômetro.....	33
4.9 Concentração de N na Primeira Folha Completamente Expandida.....	34
4.10 Relação Entre Teores de N Foliar e Teores de Clorofila Total.....	36
4.11 Relação Entre Teores de N Foliar e Leituras de Clorofilômetro.....	37
4.12 Relações Entre Teores de Clorofila Total, Leituras de Clorofilômetro e Produção de Massa Seca.....	39
5 CONCLUSÕES	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é o macronutriente de maior demanda metabólica pelas gramíneas forrageiras e, quando outras condições não são limitantes, a vida produtiva das pastagens é limitada pela disponibilidade de N no solo.

Entre as propriedades bioquímicas relacionadas à utilização do N pelas plantas forrageiras, os teores de clorofila ocupam uma posição central, dado seu papel no processo de assimilação fotossintética do carbono. Por essa razão, e dada a importância que a adubação nitrogenada tem na expressão do potencial produtivo das pastagens, tem sido desenvolvidas metodologias que permitem a determinação do teor de clorofila por procedimentos indiretos e não destrutivos. Os clorofilômetros são instrumentos que aferem, de forma indireta, o teor de clorofila com base nas propriedades óticas das folhas. A atividade fotossintética, o conteúdo de proteínas e carboidratos solúveis, o N total e os teores de micronutrientes existentes na folhas são algumas das variáveis que podem ser correlacionadas com o conteúdo de clorofila no tecido foliar.

Estudos realizados principalmente com espécies produtoras de grão, como arroz, milho e trigo, têm evidenciado a existência de múltiplas interrelações entre a interceptação da radiação solar, o índice de área foliar, a atividade fotossintética, os teores de clorofila o acúmulo de N na biomassa vegetal e a produtividade das culturas. Pesquisas básicas têm mostrado que essas interrelações são moduladas pela ação de fatores ambientais, como luz, temperatura, umidade ou o nível nutricional disponível ao vegetal em crescimento.

Para cada espécie forrageira de interesse econômico, essas interrelações precisam ser compreendidas e quantificadas, de forma a obter informações úteis ao manejo de sua nutrição mineral, no intuito de maximizar o acúmulo de matéria seca com elevada qualidade nutricional.

Nas regiões tropicais e subtropicais, diversas espécies forrageiras do gênero *Cynodon* são tidas como de grande valia e versatilidade em uma ampla gama de empreendimentos pecuários, por possuírem elevado potencial de produção, bom valor nutritivo e grande flexibilidade de uso. O Tifton 85 é um híbrido F1 entre a cultivar Tifton 68 e uma introdução sul africana (BURTON et al., 1993), que combina potencial produtivo com flexibilidade fenotípica, possibilitando a sua adaptação a diversos ambientes caracterizados por recursos hídricos e nutricionais variados. De uma forma geral, as espécies do gênero *Cynodon*, são tidas como “exigentes” em fertilidade e responsivas à adubação nitrogenada. Tal padrão de demanda nutricional por parte dessas forrageiras exige a definição de estratégias de adubação nitrogenada baseadas no monitoramento de mudanças dinâmicas na estrutura dos dosséis. Visando contribuir nessa direção, estruturou-se a presente pesquisa, focada sobre metodologias de determinação de clorofilas foliares, assim como nas suas relações temporais com os teores de N foliar.

O propósito deste trabalho foi verificar as possibilidades de aferir o nível da nutrição nitrogenada, dos teores de clorofila e a produção de matéria seca em pastagens do capim Tifton 85 de forma indireta e não destrutiva, através da utilização de um clorofilômetro comercial. As hipóteses de trabalho propostas foram: *i*) níveis diferenciados de disponibilidade de N no solo, induzidos por adubação nitrogenada, resultam em teores diferenciados de clorofila em folhas recém emergidas; *ii*) leituras obtidas com um clorofilômetro guardam relação com os teores foliares das clorofilas; *iii*) teores de clorofila total relacionam-se com os teores foliares de N e *iv*) os teores de clorofila foliar guardam relação com a produção de matéria seca ao final do período de rebrota da pastagem.

Para testar tais hipóteses foi montado um experimento com Tifton 85, de acordo com uma estratégia experimental consistente na aplicação de doses crescentes de N-uréia, logo após um corte de uniformização, como forma de induzir níveis diferenciados de

disponibilidade de N no solo. Para testar a validade dessa estratégia foram feitas uma série de avaliações sequenciais sobre atributos estruturais do dossel, no curso de um único período de crescimento. Em conjunto, foram feitas quantificações dos teores de clorofilas, de N-Kjeldhal foliar, e de produção de matéria seca, para finalmente, através de análises de regressão e correlação, verificar a validade das hipóteses formuladas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nas plantas, os variados matizes de cor, desde o verde escuro de folhas fotossinteticamente ativas ao verde pálido ou quase amarelo das folhas senescentes, são determinados, primariamente, pelas propriedades espectrais das clorofilas. As pesquisas relacionadas aos pigmentos fotossintéticos têm sido desenvolvidas durante décadas (ARNON, 1949) e continuam atualmente, em estudos relacionados à ecologia e fisiologia da produção vegetal (BARET et al., 2007; NIINEMETS, 2007; CHEN et al., 2008; CIGANDA et al., 2008; RITCHIE, 2008). Numerosos estudos têm mostrado que as variações nos teores de clorofilas estão relacionadas com a capacidade fotossintética dos dosséis, o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de diversos estresses ambientais (BARET et al., 2007; CIGANDA et al., 2008). Para melhor compreender esses tópicos, torna-se necessária uma breve caracterização da estrutura e propriedades das clorofilas.

2.1 Estrutura e Propriedades das Clorofilas

A cor verde é o resultado da mistura de duas classes de pigmentos insolúveis em água: as clorofilas (principalmente a clorofila azul, ou clorofila *a*) e os carotenóides, principalmente o β -caroteno (SENGE et al., 2006).

A molécula de clorofila pertence ao grupo das porfirinas, cuja estrutura está baseada num sistema tetrapirrólico, no qual os anéis de pirrol (contendo quatro C e um N) formam um circuito conjugado fechado, coordenados com um átomo de magnésio (Mg) central. A molécula contém ainda outro anel isocíclico (inserido nos carbonos 13, 14 e 15 do anel tetrapirrólico), além de um resíduo do ácido propiônico, na posição do carbono 17. O último dos três carbonos do ácido propiônico é esterificado com um resíduo fitol, que é uma cadeia alcoólica longa (vinte carbonos) altamente saturada e hidrofóbica (STREIT et al., 2005). A clorofila *b* difere da clorofila *a* pela presença de um resíduo aldeído ($-\text{CHO}$) no lugar do grupo metila ($-\text{CH}_3$) na posição 7, o que lhe confere maior polaridade. Quanto à sua distribuição, a clorofila *a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica (plantas, algas e cianobactérias). É o pigmento utilizado no primeiro estágio do processo fotossintético, enquanto que a clorofila *b* funciona como um pigmento acessório, auxiliando na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação (STREIT et al., 2005, SENGE et al., 2006).

Os espectros de absorção da clorofila *a* e da clorofila *b* em solventes orgânicos revelam a presença de duas bandas distintas, uma no vermelho e outra no azul, com pequenas diferenças entre elas. Modificações químicas que não afetem o cromóforo, não alteram o espectro de absorção desses pigmentos (RITCHIE, 2008). Em função das características dos pigmentos, a absorção da radiação é mais acentuada nos comprimentos de ondas de 480nm (clorofila *b*) e 435-440nm (clorofila *a*), passando por uma absorção muito baixa entre 540 a 620nm (Figura 1).

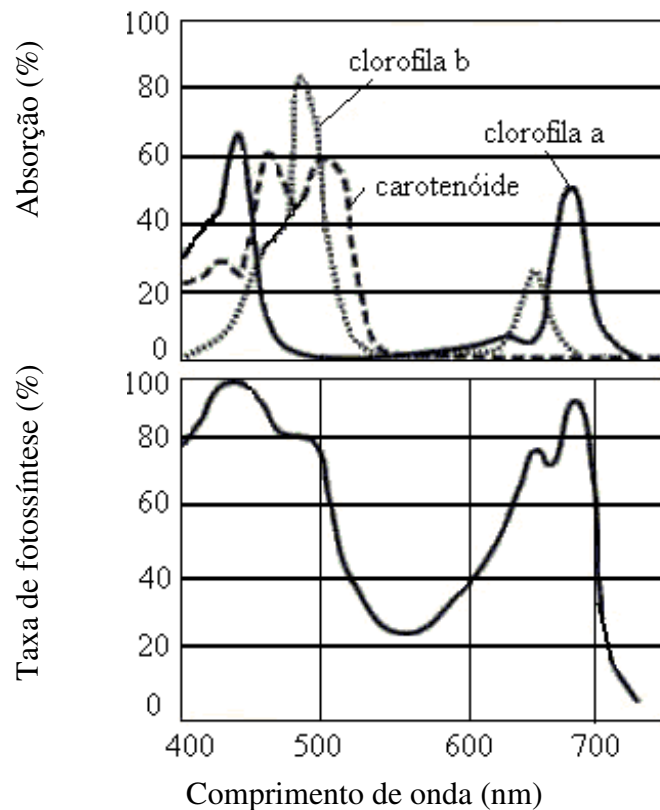


Figura 1. Superior: Espectro de absorção das clorofilas *a* e *b* e de carotenóides em função do comprimento de onda, entre 400-700nm. Inferior: Taxa fotossintética relativa, dentro da mesma banda espectral (Adaptado de GOVINDJEE e WHITMARSH, 1982).

Com o aumento do teor de clorofila, aumenta a absorção total, na faixa visível do espectro, atingindo acima de 90% nas bandas correspondentes à região do azul (400–500nm) e do vermelho (~670nm), onde ambas as clorofilas absorvem (HATFIELD et al., 2008). Os coeficientes de absorção específicos dos pigmentos são altos nos comprimentos de onda correspondentes ao azul e ao vermelho, de forma que a profundidade de penetração da luz dentro da folha é muito baixa. Em consequência, mesmo quantidades relativamente baixas de pigmentos são suficientes para saturar a absorção. Em folhas de milho com um teor de clorofila total da ordem de $100\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$ ($\approx 0,112\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}$), a absorção total pode exceder 90%, e aumentos posteriores no teor dos pigmentos não causam um incremento na absorção total (HATFIELD et al., 2008). Em termos práticos, a relação entre a absorbância foliar e o teor de clorofila total atinge um *plateau*, e a absorção se torna insensível a aumentos adicionais de clorofila (Figura 2).

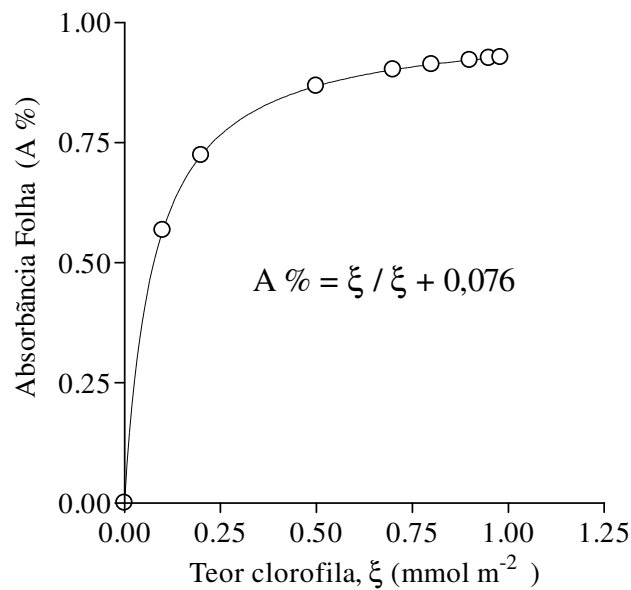


Figura 2. Relação generalizada entre o teor de clorofila total por unidade de superfície e a absorbância foliar, de acordo com o modelo de Evans (1993).

Já com relação à refletância foliar, dentro da faixa visível do espectro solar, ocorre uma relação inversa, ou seja, um aumento no esverdeado (teor de clorofila) reduz a refletância. Resultados de várias pesquisas, desenvolvidas em grande parte na cultura de milho, mostram resultados com essas características. Daughtry et al. (2000), observaram que a refletância no comprimento de onda médio dentro da faixa visível ($\lambda=550\text{nm}$), em folhas com alto teor de clorofila foi de 15,8% enquanto nas de baixo teor foi de 21,5%. Hatfield et al. (2008) resumiram observações anteriores, estabelecendo que: *i*) dentro da faixa $\lambda=400\text{-}500\text{nm}$ (azul) e em $\lambda=780$ (infravermelho próximo), a sensibilidade da refletância ao teor de clorofila é mínima; *ii*) folhas com teores moderados a altos de clorofila ($>100\text{mg.m}^{-2}$), mostram saturação de absorbância e refletância na banda vermelha de absorção da clorofila *a*, próxima a 670nm; *iii*) as bandas de maior sensibilidade da refletância foliar às variações nos teores de clorofila encontram-se entre 530-590nm (verde) e na borda vermelha, em torno de 700nm.

Existem múltiplas interrelações entre a interceptação da radiação solar, o índice de área foliar, os teores de clorofila e a atividade fotossintética. Essas interrelações são modificadas por efeito de fatores ambientais, o nível nutricional ou a desfolha imposta pelo sistema de pastejo adotado na utilização da forrageira.

2.2 Índice de Área Foliar

Uma das principais propriedades dos dosséis forrageiros é o índice de área foliar (IAF), definido por Watson (1947) como a área foliar total por área unitária de terreno. Um conceito mais restrito, o IAF verde, é usualmente definido como a área verde das folhas, por unidade de superfície subjacente.

Tanto no seu sentido amplo ou restrito, essa propriedade é básica para a análise do crescimento, sendo componente imprescindível dos modelos utilizados para estimar o potencial fotossintético das pastagens (PEDREIRA e PEDREIRA, 2007). Todavia, tanto o IAF comum quanto o IAF verde têm algumas restrições para a caracterização do “status” fisiológico das culturas. No caso do IAF, porque, pela sua própria definição, não é possível diferenciar o estado real das folhas, uma vez que tanto folhas vivas ou verdes são computadas

de igual forma que folhas mortas ou necróticas, o que significa superestimar os componentes fotossintéticos funcionais (CIGANDA et al., 2008, SBRISSIA e DA SILVA, 2008). Nesse sentido, o IAF verde, na medida em que exclui os componentes não funcionais, é uma medida mais precisa. Entretanto, como não há um limiar quantitativo definido para usar na sua determinação (por ex. no caso de folhas parcialmente senescentes), o conceito torna-se propenso à subjetividade (CIGANDA et al., 2008). A introdução de índices baseados na refletância do dossel, ou no uso de câmaras digitais combinadas com análise de imagens (HIMSTEDT et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006; HONG et al., 2007; STEWART et al., 2007; XIONG et al., 2007; OLIVEIRA, 2008) oferecem alternativas para superar algumas dessas limitações.

Independentemente das limitações, vários estudos têm sido feitos relacionando o IAF com o acúmulo total de clorofila na superfície verde (BARET et al., 2007; CIGANDA et al., 2008), o acúmulo de N na fitomassa (LEMAIRE et al., 2007) e mais comumente, com a interceptação de radiação solar por parte do dossel. Especificamente, no caso do capim-Tifton 85, objeto da presente pesquisa, relações entre variações do IAF e interceptação da radiação fotossinteticamente ativa foram estudadas por Fagundes et al. (2001) e por Oliveira (2008). Embora as condições experimentais nesses trabalhos fossem bastante diferentes, em ambos foi possível verificar que o coeficiente de extinção luminosa varia em escala sazonal, sendo, além disso, afetado também pela altura média do relvado. Por outro lado, no estudo de Oliveira (2008), as doses de N aplicadas influenciaram a produção de área foliar.

Como a absorção, reflexão e transmissão de luz pelos dosséis vegetais são fenômenos biofísicos afetados pela extensão da área foliar, parte dos efeitos do N sobre o crescimento, dependerá do seu efeito quantitativo sobre o IAF (FERNANDES e ROSSIELLO, 1995; GASTAL e LEMAIRES, 2002; LEMAIRES et al., 2007). Quando a disponibilidade hídrica não é limitante, a aquisição e uso de N e C tornam-se estreitamente ligados, através do desenvolvimento da área foliar e conseqüentemente da interceptação e uso da radiação (LEMAIRE et al., 2007). Por exemplo, em *Dactylis glomerata* L., Mills et al. (2009) observaram que quando a umidade disponível foi adequada para o crescimento, a principal causa das diferenças em rendimento entre pastagens com mais e menos nitrogênio (+N e -N), foi a eficiência de uso da radiação. As pastagens não adubadas produziram, na primavera, menos da metade do que as adubadas com N, por unidade de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) interceptada (0,54 vs. 1,16g.MS.MJ RFA respectivamente).

2.3 Relações Entre Teores de Clorofila e Capacidade Fotossintética

As clorofilas são responsáveis pela coleta da energia contida nos fótons provenientes da luz solar, e de sua transdução, na forma de potencial eletroquímico através da membrana fotossintética (o sistema tilacóide), o qual serve, em última instância, para reduzir o CO₂ atmosférico a carboidratos (SENIGE et al., 2006). Portanto, a energia luminosa absorvida pelo dossel somente pode ser transferida à reação escura da fotossíntese através de processos mediados por clorofilas. Dessa forma, o teor de clorofila foliar pode ser visto como o sucedâneo imediato da quantidade de energia transferida para os processos de assimilação fotossintética de carbono, constituindo uma expressão direta do tamanho e a funcionalidade dos componentes fotossintéticos (STREIT et al., 2005; SENIGE et al., 2006; CIGANDA et al., 2008). Essa é a razão pela qual os picos de máxima capacidade absorptiva das clorofilas, dentro da faixa fotossinteticamente ativa do espectro solar, correspondem estreitamente com a máxima atividade fotossintética relativa (Figura 1). Então, na medida em que as clorofilas exercem um controle dominante sobre a quantidade de radiação solar que uma folha absorve, as concentrações foliares desses pigmentos controlam o potencial fotossintético e

conseqüentemente, a produção primária (ARGENTA et al., 2001a; BLACKBURN, 2007; CIGANDA et al., 2008; HATFIELD et al., 2008; RITCHIE, 2008).

Por outro lado, a distribuição de clorofila entre folhas depende, em última análise, da aclimação do dossel à penetração de luz (EICHELMANN et al., 2005; NIINEMETS, 2007). Em várias espécies vegetais foi verificado que a fotossíntese foliar declina proporcionalmente ao declínio em densidade de fluxo de fótons dentro do dossel, o que significa que o maquinário fotossintético sofre ajustes a fim de otimizar as proporções das reações associadas às fases clara e escura. Ao longo de um gradiente de luz, as características do aparato fotossintético que mudam são o tamanho dos cloroplastos, a estrutura das membranas tilacóides, a relação entre clorofilas a/b e a atividade das enzimas de assimilação de carbono (KULL, 2002; NIINEMETS, 2007). Essas mudanças adaptativas, de natureza biofísica ou bioquímica, vão acompanhadas por mudanças anatômicas e estruturais em folhas e perfilhos (TERASHIMA et al., 2001), destinadas ao aumento da eficiência global de utilização de luz pelo dossel (NIINEMETS, 2007).

Nas folhas superiores do dossel, expostas mais diretamente à radiação global, a otimização requer uma maior capacidade das reações da fase escura, enquanto nas folhas inferiores, desenvolvidas à sombra, o sistema de captura e concentração de luz é de maior importância (EICHELMANN et al., 2005). Particularmente, a situação de aclimação à baixa irradiância, como a prevalente na parte inferior do dossel, envolve uma redução na capacidade de transporte de elétrons por unidade de clorofila presente, e ao mesmo tempo, um aumento no teor de clorofilas (CIGANDA et al., 2008). Todavia, como visto anteriormente, o aumento no teor de clorofila visando aumentar a absorção de radiação fotossinteticamente ativa é uma estratégia limitada pelas próprias características óticas dos pigmentos, sendo mais eficiente, para o mesmo propósito, a diluição de um dado teor de clorofila numa área foliar maior (NIINEMETS, 2007). Este tipo de regulação morfo-fisiológica é um dos principais mecanismos que ligam a expansão da área foliar com o acúmulo de matéria seca.

2.4 Clorofila e Estresses Ambientais

Os teores foliares de clorofila estão estreitamente relacionados com o estresse vegetal e a senescência (CARTER e KNAPP, 2001; BARET et al., 2007), processos associados, tipicamente, com perda de clorofilas e declínio na capacidade fotossintética (RAJCAN et al., 1999; HATFIELD et al., 2008).

Muitos estresses são induzidos, direta ou indiretamente, por deficiência hídrica ou insuficiência na satisfação dos requerimentos minerais do dossel, particularmente o nitrogênio. Pragas e doenças também induzem estresses reduzindo a área de folha verde, o fluxo de seiva, ou alterando o metabolismo celular (CARTER e KNAPP, 2001; BARET et al., 2007). A maioria dos estresses ambientais se manifesta através de sintomas similares: *i*) redução do IAF, devido a um efeito combinado de redução da produção de área foliar e de incremento na taxa de senescência; *ii*) decréscimo no teor de clorofila total, e *iii*) aumentos na temperatura do dossel, devido a menores fluxos transpiratórios. Isto significa que o nível do estresse poderá ser expresso através da mensuração de variações em poucas variáveis de estado do dossel, tais como o IAF, o teor de clorofila ou a temperatura da superfície foliar (BARET et al., 2007).

2.5 Quantificação de Clorofilas

A determinação quantitativa do conteúdo das clorofilas pode ser realizada através de métodos diretos, de caráter destrutivo, ou de forma indireta e não destrutiva, com base nas suas assinaturas espectrais (ARGENTA et al., 2001b; HATFIELD et al., 2008).

Os métodos de natureza destrutiva, têm sido os tradicionalmente empregados e são baseados na extração por meio de solventes orgânicos, seguida pela sua quantificação (ARNON, 1949).

De forma geral, as principais fontes de variação associadas à extração dos pigmentos clorofilianos incluem a natureza, polaridade e grau de pureza do solvente, a prévia maceração e centrifugação ou não dos tecidos; a temperatura e tempo de incubação, e as equações usadas para calcular as concentrações das clorofilas (BARNES et al., 1992; PORRA, 2002; TAIT e HIK, 2003; RITCHIE, 2008). Para a extração completa das clorofilas, solventes com grau variado de polaridade como metanol, etanol, acetona, dimetilformamida são tidos como mais eficazes que os solventes mais apolares, como o hexano e o éter de petróleo (RITCHIE, 2008). O solvente acetona dá picos de absorção muito agudos e por essa razão tem sido um dos solventes preferidos para testes de clorofila (ARNON, 1949; PORRA et al., 2002; ZOTARELLI et al., 2003), porém em alguns casos de plantas vasculares, e algas verdes, comporta-se como um extrator pobre (RITCHIE, 2008).

Em solução, a clorofila *a* apresenta uma cor azul-esverdeada, enquanto a *b* apresenta-se amarelo-esverdeada (SENIGE et al., 2006). Essa diferença pode ser quantificada por três técnicas analíticas: espectrofotometria, fluorimetria e cromatografia líquida de alta eficiência. Esta última é a mais precisa, porém é inadequada para a rotina, sendo muito mais usual a determinação espectrofotométrica em solução (LICHTENHALER, 1987). Por outro lado, a presença e abundância dos pigmentos fotossintéticos variam de acordo com a espécie, sendo que cada espécie requer ajustes para que ocorra a extração e conservação máxima dos pigmentos foliares (DA CRUZ et al., 2007).

Além de serem demoradas e destrutivas, as metodologias baseadas em processos de extração, apresentam outros inconvenientes de ordem variada, como o custo e as propriedades de alguns dos solventes, como o N,N-dimetilformamida, que exala odor de amônia, além de ser um produto com efeitos potencialmente mutagênicos e cancerígenos (VETEC, 2009).

Essas razões levaram ao desenvolvimento de opções não destrutivas, representadas pelos medidores de clorofila e as técnicas de sensoriamento remoto, que se apóiam nas características espectrais dos pigmentos clorofilianos.

Para as regiões espectrais do verde ($\lambda \sim 550\text{nm}$) e do bordo vermelho ($\lambda \sim 700\text{nm}$), os coeficientes de absorção das clorofilas em extratos é muito baixa, da ordem de 6% dos correspondentes ao azul e vermelho (LICHTENTHALER, 1987). Para valores de λ correspondentes ao verde e ao extremo vermelho, verificou-se que a penetração da luz nas folhas é entre quatro a seis vezes maior do que para os λ do azul e vermelho. Isto significa, portanto, que a sensibilidade da absorção à variação no teor de clorofilas é muito maior nessas regiões espectrais (λ entre 530-590nm e $\lambda \sim 700\text{nm}$) que naquelas do azul (λ entre 400-500nm) e do vermelho ($\lambda \sim 670\text{nm}$) (HARTFIELD et al., 2008). Assim, o uso de comprimentos de onda exatamente no pico de absorção das clorofilas, conduziria a uma rápida saturação das respostas, mesmo com baixos a moderados teores de clorofila total (HARTFIELD et al., 2008 e Figura 2).

Com base nesses fundamentos foram desenvolvidos aparelhos portáteis, capazes de medir indiretamente os teores de clorofila. O primeiro e mais difundido, é o SPAD (“*Soil Plant Analysis Development*”) fabricado pela empresa Konica Minolta (Tokyo, Japão). Este aparelho possui diodos que emitem luz a 650nm (vermelho) e a 940nm (infravermelho). A luz em 650nm situa-se próxima dos dois comprimentos primários de ondas associados à atividade da clorofila (645 e 663nm). O comprimento de onda de 940nm serve como referência interna para compensar diferenças na espessura ou no conteúdo de água da folha (MARKWELL et al., 1995). A luz que passa através da amostra da folha atinge um receptor (fotodiodo de silicone) que converte a luz transmitida em sinais elétricos analógicos. Esses sinais são convertidos em digitais, e usados por um microprocessador para calcular valores SPAD,

proporcionais aos teores de clorofila presentes no tecido foliar amostrado (MARKWELL et al., 1995). Este aparelho, originalmente proposto para facilitar o manejo da adubação nitrogenada em arroz, permanece sendo largamente utilizado com esse propósito no seu país de origem (SUNAGA et al., 2006), mas tem encontrado uma aplicação mais ampla em outras culturas produtoras de grão, com destaque para o milho (ARGENTA et al., 2001a e 2001b; ZOTARELLI et al., 2003; CIGANDA et al., 2008; ZHANG et al., 2008). Assim mesmo o seu uso tem sido expandido, para avaliar frações do N total em outros compartimentos da planta, como raízes e caules (SUNAGA et al., 2006; MARTÍN et al., 2007). Mais especificamente, em trabalhos desenvolvidos em nosso meio de pesquisas com pastagens, podem ser referidos os estudos de Paulino et al. (1998) com cultivares de *Panicum maximum*; Lavres Jr. e Monteiro (2006) com *Panicum maximum* cv. Aruana e Araújo (2008) com cultivares de *Pennisetum purpureum* (capim-elefante anão).

Um aparelho similar, chamado “N-Tester”, baseado no SPAD, foi apresentado por Yara International (Oslo, Noruega) e aplicado à identificação de desordens nutricionais e a determinação de níveis críticos de N-foliar. O aparelho mede a transmitância da folha em $\lambda=650$ e 960nm , respectivamente, isto é, em valores de λ quase iguais aos do SPAD (ORTUZAR-IRAGORRI et al., 2005; ARREGUI et al., 2006). Finalmente, de mais recente lançamento no mercado é o aparelho chamado ClorofiLOG[®] modelo CFL 1030, produzido por FALKER Automação Agrícola (Porto Alegre, Brasil) que será objeto de avaliação no presente trabalho. Diferentemente do SPAD, que trabalha com leituras em dois comprimentos de onda, o ClorofiLOG[®] utiliza emissores em três comprimentos de onda: dois emitem dentro da banda do vermelho, próximos aos picos de cada tipo de clorofila ($\lambda=635$ e 660nm) e um outro no infravermelho próximo ($\lambda=880\text{nm}$). Da mesma forma que o SPAD, um sensor inferior recebe a radiação transmitida através da estrutura foliar. A partir desse dado, o aparelho fornece valores de leitura proporcionais à absorvância das clorofilas *a*, *b* e total (*a+b*). Tanto o SPAD quanto o clorofiLOG[®] fornecem resultados em unidades adimensionais, no caso do último, são chamados valores ICF (Índice de Clorofila Falker) (FALKER, 2008).

2.6 Nitrogênio e Crescimento Vegetal

De forma geral, o fator que mais influencia a produtividade das pastagens é a adubação nitrogenada, pois o nitrogênio é usualmente o nutriente mais limitante ao crescimento das plantas (SINCLAIR e HORIE, 1989).

A evidência sugere que mudanças na nutrição nitrogenada influenciam fortemente a capacidade fotossintética foliar e a distribuição das propriedades fotossintéticas dentro do dossel (KULL, 2002). Em folhas de milho, por exemplo, as concentrações de clorofila total mais do que duplicaram conforme aumentaram as doses de fertilizante nitrogenado aplicado (DAUGHTRY et al., 2000). Sendo o desenvolvimento do aparato fotossintético baseado na disponibilidade de N (ENGELS e MARSCHNER, 1995), uma distribuição otimizada do nutriente entre os constituintes das reações da fase clara e escura é de crucial importância para o desempenho fotossintético do dossel (EICHELMANN et al., 2005).

Em muitas espécies vegetais, as taxas fotossintéticas, em altos níveis de irradiância, são proporcionais aos teores foliares de N (SINCLAIR e HORIE, 1989; VAN KEULEN et al., 1989), o que é confirmado em condições de campo, onde a relação entre a produção fotossintética foliar e o teor de N, expresso por unidade de área foliar, é geralmente linear (SINCLAIR e HORIE, 1989). Todavia, também há razões que justificam a falta de linearidade. Em primeiro lugar, nem todo o N foliar está alocado na maquinaria fotossintética. Isto fica mais claro, quando se consideram experimentos de adubação, em solução nutritiva, onde a aplicação de altos níveis de N mineral induz ao acúmulo de N inorgânico (principalmente nitrato) nas folhas (FERNANDES et al., 1985; ARGENTA et al., 2001a;

LAWLOR, 2002). Em segundo lugar, há que considerar a redistribuição vertical de N no dossel. Nas camadas superiores, onde normalmente haverá um excesso de luz disponível o N será preferencialmente usado para sustentar as reações de assimilação de CO₂ e do metabolismo do carbono associado. Já nos níveis inferiores do dossel, onde a disponibilidade de luz será um fator limitante, e uma maior quantidade de N encontra-se alocado nos complexos clorofila-proteína, para tornar eficiente a captura de luz (VAN KEULEN et al., 1989). Uma terceira razão é que uma fração das enzimas foliares contendo N podem não estar totalmente ativadas, isto é podem funcionar apenas parcialmente na catálise enzimática. É o caso da enzima Rubisco, que as pesquisas têm mostrado possuir um papel duplo, podendo ser usada, parcialmente, como forma de armazenamento de N nas folhas (EICHELMANN et al., 2005).

Os parâmetros de planta mais estudados no intuito de indicar o teor de N na planta são o teor de nitrato no colmo (SUNAGA et al., 2006), o teor e o acúmulo de N na folha e/ou planta (GASTAL e LEMAIRE, 2002) e o teor relativo de clorofila na folha (LAVRES JR. e MONTEIRO, 2006). Desses, obviamente o último tem merecido maior atenção dos pesquisadores, por apresentar uma série de vantagens, tanto se a clorofila é determinada por métodos diretos quanto indiretos (ARGENTA et al., 2001b).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização da Área Experimental

O experimento foi realizado em área pertencente à Estação Experimental de Parasitologia Wilhelm Otto Neitz do Instituto de Veterinária da UFRRJ, Seropédica-RJ (22°45'53'' S, 43°41'56''W e 33m de altitude).

3.2 Caracterização Edafoclimática

3.2.1 Solo

O solo da área experimental está classificado no atual Sistema Brasileiro de Classificação de Solos como Planossolo Háptico (EMBRAPA, 2006). Trata-se de solos de textura arenosa no perfil de enraizamento (0,5-0,7m), com teores de areia total acima de 90% na camada superficial (0-0,2m). Embora bem drenados superficialmente, a ocorrência de um horizonte sub-superficial de textura barro-argilo-arenosa, com características de fragipã, limita a drenagem profunda. O absoluto predomínio de areia faz com que a capacidade de retenção de água nos horizontes superficiais seja muito baixa e a altura do lençol freático oscile sazonalmente (RAMOS et al., 1973).

Em Agosto de 2008 foram realizadas amostragens na camada superficial do terreno (0-0,2m) para caracterização de suas propriedades químicas, realizada segundo as rotinas analíticas do Laboratório de Análise de Solos, Plantas e Resíduos da UFRRJ (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da análise da fertilidade do solo da área experimental. Amostragem em Agosto de 2008.

Prof. (m)	Ca ²⁺ (cmol _c /dm ³)	Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³)	K ⁺ (cmol _c /dm ³)	H+Al (cmol _c /dm ³)	V (%)	P ^(*) (mg/dm ³)	M.O. ^(**) (g/kg)	pH água (1:2,5)
0,0-0,2	2,9	2,1	0,1	1,2	80	21	12,9	5,8

(*) P disponível (Mehlich-1) (**) C orgânico (Walkey-Black) x 1,72.

3.2.2 O clima regional e local

O clima da região é caracterizado basicamente por duas estações distintas, quente e úmido no verão (outubro/março), sem invernos pronunciados, e muito secos (abril/setembro). Este tipo climático, embora não corresponda exatamente ao clima de savanas, se enquadra no tipo Aw da classificação de Köppen.

Dados agrometeorológicos horários, relativos ao período de execução do presente trabalho, foram registrados pela Estação Ecologia Agrícola km 47, Seropédica RJ (INMET/PESAGRO), distante aproximadamente 1,5km da área experimental, e obtidos *on-line* na página do Instituto Nacional de Meteorologia (<http://www.inmet.gov.br>). Na Figura 3 são mostrados os dados diários relativos às temperaturas máxima, mínima e média do ar, e as precipitações ocorridas durante o período 30 de novembro a 28 de dezembro de 2008. Na Figura 4, são apresentados os dados correspondentes à radiação solar global, os quais foram expressos em MJ.m⁻².dia⁻¹.

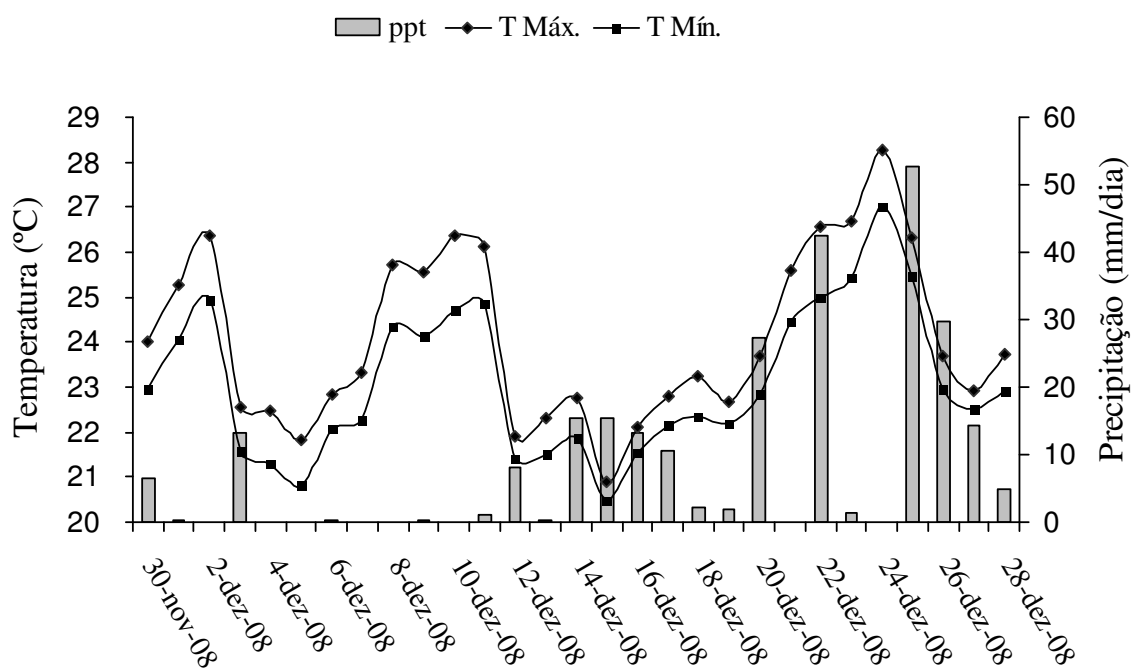


Figura 3. Valores diários das médias de temperaturas mínimas e máximas do ar, e da precipitação pluviométrica, registrada durante o período experimental (30/11-28/12/2008, Seropédica, RJ.).

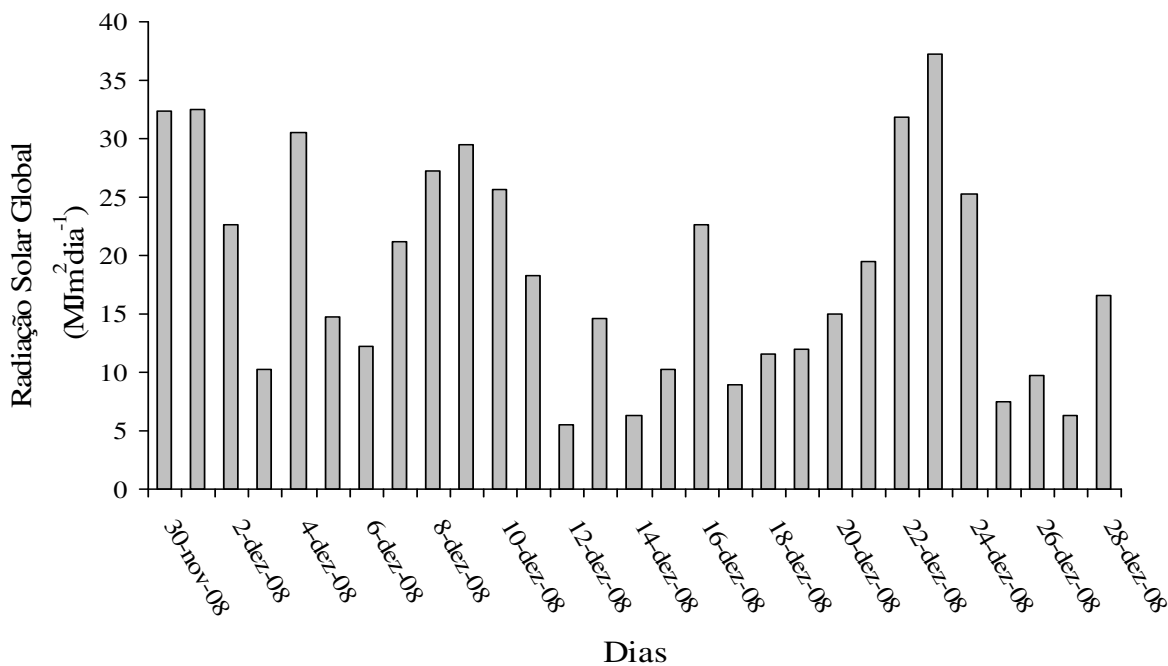


Figura 4. Valores de radiação solar global (MJ.m⁻².dia⁻¹) registrados na região durante o período experimental (30/11-28/12/2008, Seropédica, RJ).

3.3 Utilização Anterior da Área Experimental

A área experimental vem sendo utilizada para pesquisas com a cultivar Tifton 85 (*Cynodon* spp.) desde meados de 2006. Anteriormente, a área era utilizada como capineira de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). Segundo levantamento realizado, a área original não possui registro de aplicação de fertilizantes nitrogenados ou adubo orgânico. Na escolha da área para implantação do presente experimento, optou-se pela utilização de área adjacente, na qual não foram desenvolvidos experimentos ou qualquer prática de adubação nitrogenada, sendo predominantemente vegetada com *Brachiaria* spp., capim colômbio e capim-elefante.

As primeiras pesquisas desenvolvidas na área envolveram aspectos ecofisiológicos e produtivos observados durante o estabelecimento do capim-Tifton 85 em função de doses de N (GALZERANO, 2008). No mesmo período, e até os dias atuais, outros trabalhos têm abordado aspectos relacionados ao crescimento, produtividade e composição bromatológica do Tifton 85 em função de doses e fontes de nitrogênio (OLIVEIRA, 2008; MILAN et al., 2008; SILVA et al., 2008), em experimentos conduzidos principalmente durante a estação chuvosa.

3.4 Preparo da Área

Na primeira semana do mês de julho de 2008, foi realizado o corte da vegetação presente na área, com auxílio de roçadeira costal ao nível do solo. A seguir (10/07/2008) foi realizada uma aração, e após cinco dias, foi realizada uma primeira gradagem, seguida de outra três dias depois. Nos dois dias subsequentes foi realizada a limpeza e a delimitação das parcelas experimentais. Paralelamente, foram executadas atividades de limpeza e desassoreamento dos canais de drenagem, o que envolveu, além de capinas manuais, a aplicação do herbicida glifosato (Roundup®) nas laterais dos canais de drenagem existentes na área, segundo as doses recomendadas do fabricante.

A delimitação das parcelas ou unidades experimentais foi realizada no dia 19/07/2008, sendo cada parcela representada por um canteiro com 16m² de área total (4x4m). A área útil para avaliações experimentais foi o quadrado central, com área de 9,0m², considerando-se uma bordadura de 0,5m. Dentro de cada bloco, cada parcela foi separada da contígua por uma faixa de 2,0m, mesma largura da rua de circulação entre blocos. A Figura 2 mostra uma vista parcial das parcelas, em fotografia tomada no mês de novembro de 2008.

3.5 Plantio

O plantio foi realizado nos dias 20 e 21 de julho de 2008, utilizando-se estolões enraizados provenientes da área estabelecida em 2006. O plantio das mudas foi realizado em sulcos separados 0,5m entre si (seis linhas), utilizando-se aproximadamente cinco mudas por metro linear. Por ocasião do plantio, as parcelas receberam uma aplicação basal de fósforo (P), na forma de superfosfato simples, incorporado no fundo do sulco (0,1m de profundidade) em dose equivalente 150kg P/ha. Potássio (K), na forma de KCl, na dose de 80kg/ha, foi aplicado em cobertura, logo após o plantio. Sempre que necessário, foi realizada a irrigação das parcelas experimentais, por aspersão manual, de modo a evitar a deficiência hídrica no desenvolvimento inicial do capim. Também, durante todo o período de estabelecimento foi realizado o controle de plantas daninhas, através de capinas manuais nas linhas e entrelinhas das parcelas, assim como nas ruas de circulação.



Figura 5. Vista parcial das parcelas experimentais, instaladas sobre Planossolo Háplico. Novembro de 2008, Seropédica, RJ.

O período de determinações experimentais foi de 30 de novembro a 28 de dezembro de 2008, onde foram realizadas quatro amostragens. Durante este período foi necessária a aplicação de água apenas durante o primeiro terço do período de rebrota (Figura 3).

3.6 Tratamentos

As doses de nitrogênio (N) tiveram como objetivo proporcionar níveis nutricionais diferenciados, de modo a gerar diferenças que pudessem ser utilizadas em ensaios das diferentes metodologias de avaliação. Levando-se em consideração a experiência prévia de trabalho (item 3.3) foram definidos três níveis de disponibilidade de N: baixo (representado pelo N nativo do solo); médio (representado por uma aplicação de 75kg/ha) e alto (representado por uma aplicação de 150kg/ha). Para tal, o experimento foi arranjado segundo um delineamento em blocos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas, com três doses de N nas parcelas, e quatro datas de amostragens nas sub-parcelas, com quatro repetições.

A adubação nitrogenada (Uréia agrícola, com 45% N) foi aplicada em 30/11/2008, por ocasião do corte de uniformização, realizado a 0,1m de altura. Desta forma, as doses de N utilizadas foram: $T_1=0$; $T_2=75$ e $T_3=150$ Kg/ha. Juntamente com o adubo nitrogenado foi aplicada adubação potássica (como KCl), numa relação N:K=1:1; em cobertura, ambos diluídos em água e aplicados com auxílio de regador plástico.

A partir do corte de uniformização e aplicação dos tratamentos, tiveram início as avaliações periódicas, que ocorreram aos 8, 16, 24 e 28 dias após o corte de uniformização (DAC).

A utilização de interceptação luminosa como referência de acompanhamento do processo de rebrotação permite que a forragem seja colhida (por corte ou pastejo) sempre numa mesma condição fisiológica (PEDREIRA e PEDREIRA, 2007). Desta forma, a última data de amostragem não foi pré-fixada, mas sim correspondente ao dia onde se atingiu um nível de interceptação da radiação fotossinteticamente ativa incidente igual a 95%, em ao menos duas parcelas experimentais de um mesmo tratamento (Figura 6). Tais parcelas corresponderam ao maior nível de N aplicado, que nessa data, apresentou um valor médio de interceptação de $94,8 \pm 0,5\%$.



Figura 6. Avaliação da Radiação Fotossinteticamente Ativa interceptada.

3.7 Monitoramento das Variáveis Experimentais

As avaliações foram realizadas seguindo um mesmo protocolo de determinações e amostragens, conforme descrito a seguir.

3.7.1 Radiação fotossinteticamente ativa (RFA)

A radiação fotossinteticamente ativa ($\lambda=400-700\text{nm}$) incidente sobre o dossel foi aferida em várias datas durante o período experimental, com o intuito de estimar a fração de radiação luminosa interceptada pelo dossel. As avaliações de RFA foram realizadas através da utilização de dois radiômetros portáteis, sendo realizadas medições simultâneas da radiação

incidente no topo do dossel (0,5-0,6m de altura), utilizando-se um sensor de *quantum* LI 190 AS, e no interior do dossel, rente ao solo, uma barra sensora LI 191 SA (LICOR, EUA) dotada de 10 sensores em linha, distribuídos em 1m de comprimento (Figura 6). Foram tomadas duas leituras, uma no sentido Leste-Oeste e outra no sentido Norte-Sul, de forma que a média dos valores obtidos representasse um valor médio proporcional à RFA incidente em área equivalente a 1m². Ambos os sensores eram conectados a medidores digitais portáteis LI 250 (LI-COR, EUA). As avaliações foram realizadas sempre no horário compreendido entre 12:30 e 13:30 horas (horário de Brasília).

Para reduzir a variabilidade espacial do fluxo incidente, os medidores foram operados sempre na modalidade “AVERAGE”, que fornece um valor médio de oito medições seguidas. As medições foram tomadas na modalidade de densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (μmol.m⁻².s⁻¹). A radiação fotossinteticamente ativa interceptada pelo dossel (RFA_{int}), foi calculada com base na seguinte expressão:

$$RFA_{Int} (\%) = 100 \times \frac{\left(RFA_{\text{incidente no topo}} - RFA_{\text{transmitida até o solo}} \right)}{RFA_{\text{incidente no topo do dossel}}}$$

A determinação de um nível de RFA_{int} ≥ 95%, em pelo menos duas parcelas de um mesmo tratamento, foi tomado como critério para encerramento do período de rebrota.

3.7.2 Altura do dossel

A altura foi determinada pelo método de altura não comprimida, utilizando régua com graduação em milímetros, sendo adotada como altura do dossel, a média entre o ponto mais alto e o mais baixo sob uma folha de transparência (acetato), colocada sobre a superfície do dossel forrageiro em quatro pontos distintos dentro de uma mesma parcela, conforme descrito por Da Silva e Cunha (2003).

3.7.3 Índice de área foliar (IAF)

O IAF funcional (verde) foi estimado por ocasião de cortes realizados aos 8, 16, 24 e 28 DAC. Em cada parcela, toda a massa de forragem incluída dentro de um quadrante com 0,25m², foi cortada a 0,05m acima do nível do solo e levada ao laboratório. No material verde, foi feita a contagem do número total de perfilhos existentes, separando-se 10 perfilhos representativos por amostra. Os perfilhos foram fracionados em colmos+bainhas foliares, material morto e lâminas verdes, sendo em seguida pesados em balança eletrônica. As lâminas foliares foram estocadas em sacos plásticos junto com uma pequena quantidade (5-10ml) de água gelada, posteriormente acondicionados dentro de uma caixa isotérmica, visando à preservação do conteúdo hídrico foliar. A área das lâminas foi quantificada fotoeletronicamente, utilizando-se um aparelho integrador de área foliar marca LI-COR, modelo LI 3100. O valor resultante, dividido por 10, representou a área foliar média por perfilho. Finalmente o IAF foi calculado multiplicando-se o número de perfilhos por unidade de superfície (item 3.7.5) pela área foliar média por perfilho.

3.7.4 Índice de cobertura verde (ICV)

Esta variável foi aferida com uso de câmara colorida digital, combinada com análise digital de imagens (BAESSO et al., 2007; STEWART et al., 2007). A aquisição das imagens foi feita com uma câmara digital Sony, modelo DSC-P52, a partir de uma altura de 1,60m (RIBEIRO, 2006), utilizando-se para tal, uma escada de tipo doméstico. A escada foi posicionada sempre na mesma direção, evitando-se a projeção de sombras. A área da imagem correspondeu a 1,0m², demarcada por um quadrante de PVC branco, posicionado no centro da área útil de cada parcela. As imagens foram captadas sempre entre as 07:30 e 09:00 h. Foram obtidas duas fotos para cada parcela experimental. Trabalho prévio (OLIVEIRA, 2008) tinha indicado a necessidade de considerar valores de ICV com baixos valores de IAF (<1,0), e por essa razão foram feitas duas determinações adicionais, aos 4 e aos 12 dias, além das determinações realizadas aos 8, 16, 24 e 28 dias. A metodologia descrita por Ribeiro (2006) inclui os seguintes aspectos: *i*) a programação da câmara digital foi sempre à mesma para todas as imagens obtidas, que foram transferidas para um computador e armazenadas em formato JPEG; *ii*) as imagens originais foram recortadas para um mesmo formato padrão com o emprego do programa Photoshop (Figura 7A); *iii*) do conjunto armazenado, e com emprego do programa MATLAB (MATHWORKS, 2000) foram separadas dez imagens representativas de pixels de vegetação verde e outras dez de outras cores, relativas à pixels de solo nú ou com vegetação seca, para gerar uma imagem classificadora binária (Figura 7B); *iv*) subsequentemente, as imagens foram organizadas e processadas para obtenção da estimativa do índice de cobertura verde (ICV) o qual representa a fração de pixels originalmente verdes em relação ao número total de pixels da imagem (STEWART et al., 2007).

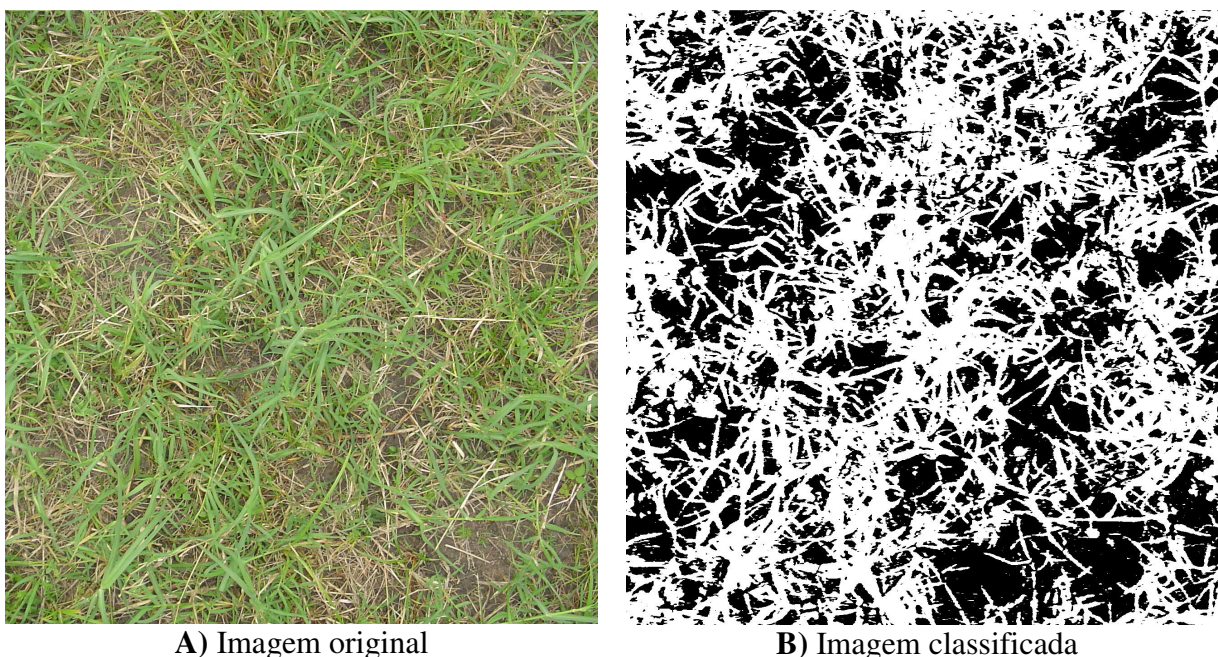


Figura 7. A) Exemplo de imagem recortada, correspondente a uma parcela com capim Tifton 85. B) Imagem classificada: as áreas escuras correspondem a solo descoberto e/ou solo coberto com liteira, e as áreas claras, à vegetação verde. O ICV, neste exemplo, é igual a 0,56.

3.7.5 Perfilamento e produção de massa seca verde

O número de perfilhos e a massa de forragem total foram determinados ao longo do ciclo de rebrota através das avaliações aos 8, 16 e 24 dias e por ocasião do corte final, aos 28 dias. O corte foi realizado com auxílio de uma tesoura e de um quadrante de PVC com $0,25\text{m}^2$, o qual era colocado acima de área representativa dentro da parcela, conforme avaliação visual. Após a coleta em cada unidade experimental, o material era levado a uma sala adjacente, onde se procedeu à remoção de invasoras e material morto, e realizou-se a contagem do número de perfilhos de cada amostra. Após separação morfológica, a massa fresca de cada componente foi registrada em balança com duas casas decimais e subsequentemente posta a secar em estufa ventilada, a $65\pm 5^\circ\text{C}$, por 72 horas, com posterior pesagem em balança de duas casas decimais. A partir dessas determinações, foi estimada a densidade populacional de perfilhos (n° perfilho. m^{-2}) e a massa verde seca total da parte aérea, por unidade de superfície (MVST, $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$).

3.7.6 Teor de clorofila foliar

Em função da grande variedade de informações sobre extratores, e da falta de informações mais detalhadas sobre a utilização destes em gramíneas forrageiras, houve a necessidade de se avaliar o extrator mais adequado para o capim Tifton 85. Neste sentido, foi desenvolvido um experimento, visando selecionar qual a melhor combinação entre os diferentes solventes, tempos de extração e equações características de diversos métodos selecionados, para determinação espectrofotométrica dos teores de clorofila *a*, *b* e total (*a+b*).

Foram avaliados cinco métodos que utilizaram quatro solventes distintos. Para avaliação dos solventes foi utilizada sempre a primeira folha completamente expandida, de cada perfilho selecionado. A forragem apresentava cerca de quatro meses de idade. Foram utilizados frascos com capacidade para 50ml, envolvidos por completo com papel alumínio para evitar o efeito prejudicial da luminosidade. Em cada frasco foram transferidos 20ml de cada solvente, em cinco repetições para cada método. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha, lacrados com filme de parafina (Parafilm[®]) e mantidos a temperatura ambiente. Discos foliares, foram obtidos do terço médio da lâmina foliar, com auxílio de um furador de papel manual, com 6,0mm de diâmetro (Figura 8), foram transferidos, a razão de 10 discos/frasco (área total: $282,74\text{mm}^2$ de tecido verde) para os frascos contendo os respectivos extratores.



Figura 8. Detalhe dos discos foliares e da lâmina da primeira folha completamente expandida, mostrando a região de extração de discos de tecido verde.

Foram realizadas oito avaliações, com intervalos de 12 horas (12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas) visando identificar o lapso de tempo mais eficiente na extração dos pigmentos. As absorbâncias dos extratos foram analisadas em Espectrofotômetro UV-Visível marca Biospectro modelo SP 220, nos comprimentos de onda indicados em cada uma das metodologias. Durante o período de extração, as temperaturas máximas oscilaram entre 26-23°C, as mínimas variaram entre 24-23°C, a umidade relativa máxima variou de 75-56% e a mínima entre 40-69%.

Os solventes e comprimentos de onda utilizados nas fórmulas para o cálculo dos valores de clorofila *a*, *b*, e clorofila total são apresentados a seguir:

1- Acetona 80%, Espectroscópico (Vetec®) (ARNON, 1949);

$$\text{Clor a} = 12,7 \times (A_{663}) - 2,69 \times (A_{645})$$

$$\text{Clor b} = 22,9 \times (A_{645}) - 4,68 \times (A_{663})$$

$$\text{Clor t (a+b)} = 8,02 \times (A_{663}) + 20,2 \times (A_{645})$$

2- Álcool etílico absoluto 99.8% Espectroscópico (Vetec®) (WINTERMANS e DE MOTS, 1965);

$$\text{Clorofila a} = 13,70 \times (A_{665}) - 5,76 \times (A_{649})$$

$$\text{Clorofila b} = 25,80 \times (A_{649}) - 7,60 \times (A_{665})$$

$$\text{Clorofila t (a+b)} = 6,10 \times (A_{665}) + 20,04 \times (A_{649})$$

3- N’N-Dimetilformamida (DMF) Espectroscópico (Vetec®) (MORAN, 1982);

$$\text{Clor a} = 12,64 \times (A_{664}) - 2,99 \times (A_{647})$$

$$\text{Clor b} = 23,26 \times (A_{647}) - 5,6 \times (A_{664})$$

$$\text{Clor t (a+b)} = 7,04 \times (A_{664}) + 20,27 \times (A_{647})$$

4- Dimetilsulfóxido (DMSO) 99.7% Espectroscópico (Vetec®)(BARNES et al., 1992);

$$\text{Clor a} = 14,85 \times (A_{665}) - 5,14 \times (A_{648})$$

$$\text{Clor b} = 25,48 \times (A_{648}) - 7,36 \times (A_{665})$$

$$\text{Clor t (a+b)} = 7,49 \times (A_{665}) + 20,34 \times (A_{648})$$

5- Acetona 80% Espectroscópico (Vetec®) (PORRA et al., 1989).

$$\text{Clor a} = 12,25 \times (A_{664}) - 2,55 \times (A_{647})$$

$$\text{Clor b} = 20,31 \times (A_{647}) - 4,91 \times (A_{664})$$

$$\text{Clor t (a+b)} = 7,34 \times (A_{664}) + 17,76 \times (A_{647})$$

Todas as equações utilizadas fornecem os teores das classes de clorofilas em unidades de µg /mililitro de extrato. Considerando-se o volume do extrator, a área foliar total extraída e a massa molar das clorofilas *a* e *b* (RITCHIE, 2008), os teores foram finalmente expressos como µmol.m⁻² lâmina foliar. Os resultados principais deste experimento preliminar são mostrados na Tabela 2 e Figura 10.

Tabela 2. Teores de pigmentos foliares em Tifton 85 utilizando-se diferentes métodos de extração.

SOLVENTE	Clorofila A	Clorofila B ($\mu\text{mol.m}^{-2}$)	Clorofila T
N'N Dimetilformamida ⁽¹⁾	297 \pm 3,58 A	85 \pm 2,03 B	383 \pm 5,13 A*
Dimetilsulfóxido ⁽²⁾	316 \pm 2,93 A	66 \pm 1,41 C	383 \pm 3,70 A
Acetona 80% ⁽³⁾	250 \pm 2,65 B	111 \pm 1,5 A	361 \pm 4,05 A
Álcool absoluto ⁽⁴⁾	259 \pm 2,84 B	84 \pm 2,25 B	343 \pm 3,86 B
Acetona 80% ⁽⁵⁾	242 \pm 2,55 B	81 \pm 1,18 B	324 \pm 3,62 B

⁽¹⁾MORAN, (1982); ⁽²⁾BARNES et al., (1992); ⁽³⁾ARNON, (1949) modificado; ⁽⁴⁾(WINTERMANS e DE MOTTS, 1965); ⁽⁵⁾PORRA et al., (1989); ⁽⁶⁾Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p > 0.05$).

Com base nesses resultados e considerando-se a análise estatística dos valores de clorofila total (Tabela 2), foi escolhido o método utilizando acetona 80% (ARNON, 1949), com modificações referentes à não trituração e centrifugação dos discos, e com um tempo de extração de 48 horas (Figura 10).

Avaliação do teor de clorofila em condições de campo: uso de clorofilômetro e extração de discos foliares. Para a quantificação dos teores de clorofila existentes nas folhas das diferentes parcelas experimentais, foi seguida uma mesma ordem seqüencial de operações, combinando os métodos indireto e direto de avaliação. Assim, sempre na primeira folha completamente expandida (do topo do dossel para a base) e exposta à radiação solar, foram realizadas, no terço médio da lâmina, três leituras com um clorofilômetro marca ClorofiLOG[®] modelo CFL 1030 (Figura 9), o qual fornece medições dos teores das clorofilas *a*, *b* e total (*a+b*), expressas em unidades chamadas Índice de Clorofila Falker (ICF). Imediatamente após a tomada das leituras, retirou-se da posição central do terço médio, um disco foliar. Este procedimento foi repetido em 10 folhas por parcela, obtendo-se assim dez discos foliares para extração em acetona 80%, e dez medições de ICF, cada uma das quais foi feita em triplicata (30 leituras por parcela).

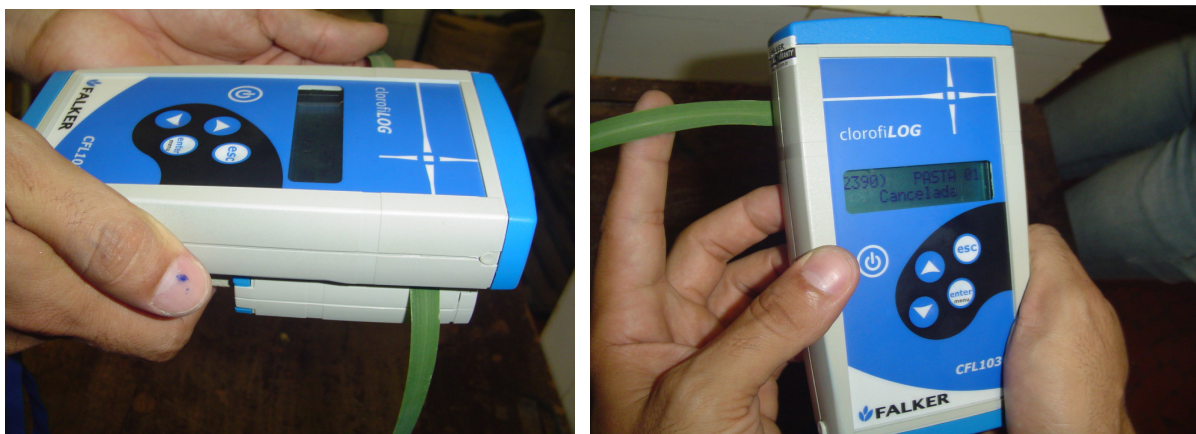


Figura 9. Fotografia lateral e frontal do aparelho ClorofiLOG[®]-CFL 1030.

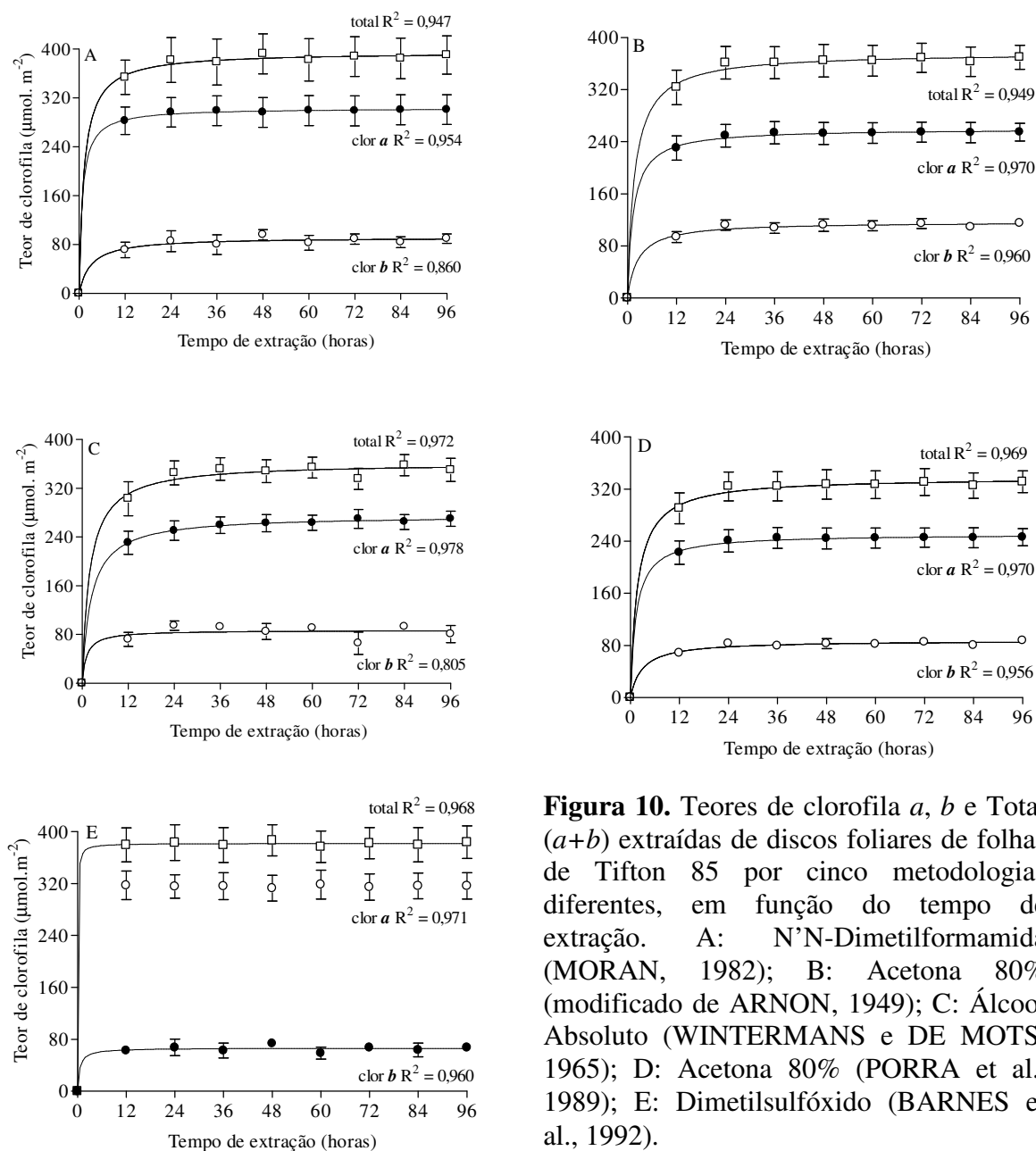


Figura 10. Teores de clorofila *a*, *b* e Total (*a+b*) extraídas de discos foliares de folhas de Tifton 85 por cinco metodologias diferentes, em função do tempo de extração. A: N’N-Dimetilformamida (MORAN, 1982); B: Acetona 80% (modificado de ARNON, 1949); C: Álcool Absoluto (WINTERMANS e DE MOTTS, 1965); D: Acetona 80% (PORRA et al., 1989); E: Dimetilsulfóxido (BARNES et al., 1992).

As determinações dos teores de clorofila pelo método direto foram realizadas aos 8, 16, 24 e 28 dias, seguindo o protocolo definido previamente (vide início desta seção), em conjunto com as demais avaliações das propriedades do dossel.

3.7.7 Teores de nitrogênio foliar

Após o registro das leituras do clorofilômetro e a retirada dos discos foliares para a extração de clorofila com acetona 80%, foram selecionadas mais sessenta folhas por parcela (do mesmo nível de inserção que a utilizada para a determinação da clorofila) as quais foram imediatamente postas a secar em estufa ventilada (65±5°C; 72horas), sendo em seguida moídas em moinho tipo Wiley, com peneira de 1mm. Todas as análises de N foram realizadas

pelo método de semi-micro Kjeldahl, com digestão e titulação com ácido sulfúrico (AOAC, 1990).

3.8 Análises Estatísticas

As análises dos dados primários foram guiadas inicialmente pela análise de variância, a qual separou efeitos devidos a tratamentos (doses de N), dias de amostragem (tratados como épocas sequenciais) e à interação dose x DAC, procedendo-se aos desdobramentos, quando indicado, conforme os procedimentos do programa SISVAR. As médias foram discriminadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ao nível de significância de 5%. Todas as propriedades do dossel estudadas foram analisadas sem transformações, salvo o ICV, cujos dados foram transformados para $(x+1)^{0.5}$. Verificado o nível de significância das fontes de variação, procedeu-se então à análise de regressão, em atenção ao caráter quantitativo dos tratamentos. Desde que, na ausência de desfolhação devida ao pastejo, a produção e crescimento de folhas e perfilhos podem ser vistos como variáveis contínuas dependentes do tempo, os dados foram graficados em função dos dias após corte (DAC), para visualização de possíveis padrões de variação ao longo dos dias. A parametrização dessas tendências foi feita com auxílio dos modelos disponíveis no programa GraphPad Prism versão 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Além dos modelos comuns, linear, polinomial e exponencial, trabalhos prévios indicaram a necessidade de considerar modelos sigmoidais. Dentro desses, a função sigmoidal de Boltzmann, é do tipo quatro parâmetros, conforme a expressão a seguir:

$$Y = a + \frac{(b - a)}{1 + \exp \left[\frac{c - x}{d} \right]}$$

onde: a = assíntota inferior; b = assíntota superior; c = valor de x onde Y corresponde a 50 % da diferença entre a e b ; d = parâmetro relacionado à inclinação da curva.

Os critérios de seleção foram o valor do coeficiente de determinação do modelo (R^2), complementado com a expectativa biológica, a partir da experiência prévia. Quando os modelos disponíveis se mostraram insatisfatórios, a alternativa foi a utilização do procedimento de ajuste por curvas de tendência, utilizando-se o procedimento “lowess/cubic spline”, no qual as curvas são geradas usando um algoritmo adaptado de Chambers et al. (1983). As interrelações entre as diversas variáveis foram estudadas com emprego de técnicas de correlação simples.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O propósito principal dos tratamentos estudados foi a indução de gradientes diferenciados de disponibilidade do N entre as unidades experimentais, visando assim aumentar a faixa de expressão dos atributos a serem estudados. Como tal, esta estratégia permite, através de estudos de regressão, o estabelecimento de níveis críticos de suficiência nutricional (ARGENTA et al., 2001a; RAMBO et al., 2004; BARBOSA FILHO et al., 2008), assim como o estabelecimento de métodos indiretos de avaliação de diversas características morfofisiológicas ou bioquímicas ligadas à produtividade das culturas (JEUFFROY et al., 2002; BARET et al., 2007; LEMAIRE et al., 2007; CIGANDA et al., 2008). Como primeiro passo nessa estratégia, inicialmente serão apresentados os resultados obtidos em relação ao desenvolvimento temporal e espacial do dossel, em resposta à adubação nitrogenada.

4.1 Efeitos das Doses de N e dos Dias Após o Corte (DAC): Níveis de Significação Estatística

A Tabela 3 mostra uma síntese dos resultados estatísticos (teste F) obtidos na análise das características do dossel de Tifton 85 estudadas.

Tabela 3. Níveis de significação estatística (teste F) para as análises de variância das variáveis estudadas no experimento com Tifton 85.

Característica	Dose N	DAC	Trat x DAC
ALT	0,0001	****	****
IAF	0,0041	****	0,0046
ICV	0,0001	****	0,0133
PERF	0,0002	****	0,0055
MSVT	0,0112	****	0,0006
ICF <i>a</i>	****	****	0,0013
ICF <i>b</i>	****	****	****
ICF T	****	****	****
CLOR <i>a</i>	****	****	0,0001
CLOR <i>b</i>	0,0001	0,0115	0,0154
CLOR T	****	****	0,0002
N Foliar	****	****	0,0090

****Significativo a $p < 0,0001$; DAC: dias após o corte (8, 16, 24 e 28 dias); ALT: altura do dossel; IAF: índice de área foliar; ICV: índice de cobertura verde; PERF: número de perfilhos; MSVT: matéria seca verde total; ICF *a*: índice de clorofila falker *a*; ICF *b*: índice de clorofila falker *b*; ICF T: índice de clorofila falker total; CLOR *a*: Clorofila extraída *a*; CLOR *b*: Clorofila extraída *b*; CLOR T: Clorofila extraída total; N Foliar: teor de N-Kjeldhal foliar.

É possível apreciar que todos os parâmetros analisados responderam significativamente às doses de N, aos DAC, e à interação entre esses fatores. A seguir, essas variações serão consideradas com maior detalhamento.

4.2 Altura do Pasto

A análise de variância mostrou existirem efeitos significativos para doses de N; para dias após corte e para a interação entre os fatores ($p < 1 \times 10^{-4}$, Tabela 3). O desdobramento das doses de N dentro de DAC mostrou que, na primeira amostragem, as doses de N não afetaram

a altura do pasto (Tabela 4). A partir dessa data, as diferenças começaram a se manifestar rapidamente, através de ritmos de crescimentos diferenciados. Entre os dias 8 e 16, as taxas médias de crescimento foram de 0,0031; 0,0106 e 0,0147m.dia⁻¹, para os níveis baixo, médio e alto de N, respectivamente (Figura 11). Após duas semanas da aplicação da adubação nitrogenada, e sob o maior nível de N, a taxa de crescimento em altura mais do que quadruplicou em relação à testemunha não adubada. Nos dias seguintes, as taxas continuaram a aumentar em todos os tratamentos, sendo que, no de maior dose de adubação, os valores tenderam à estabilização entre os 24-28 dias (Figura 11). Por ocasião do corte aos 28 dias, observou-se que as alturas finais continuaram a refletir os três níveis de disponibilidade de N entre os tratamentos, sendo que a altura do tratamento sob a maior dose de N duplicou em relação à testemunha (Tabela 4).

Tabela 4. Altura do dossel (m) de Tifton 85, em função de doses de N e dos dias após um corte de uniformização. Valores médios de quatro repetições.

Dose N (kg/ha)	Dias após corte				
	8	16	24	28	Média
0	0,130 Ac	0,155 Bc	0,198 Cb	0,233 Ca	0,179 C
75	0,148 Ad	0,233 Ac	0,325 Bb	0,390 Ba	0,274 B
150	0,150 Ad	0,268 Ac	0,408 Ab	0,450 Aa	0,319 A
Média	0,143 d	0,218 c	0,310 b	0,375 a	

Médias seguidas de letras comuns, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem significativamente pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

É de interesse observar, no contexto dos métodos indiretos de avaliação de pastagens, que a altura do pasto é uma característica que tem recebido bastante atenção, devido a sua estreita relação com a massa de forragem (DA SILVA e CUNHA, 2003; TEIXEIRA et al., 2003; AGUINAGA et al., 2008).

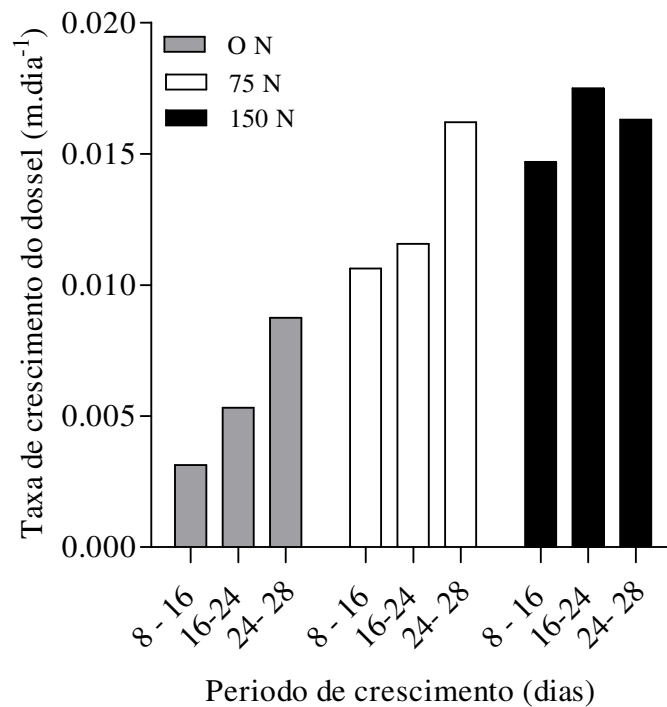


Figura 11. Taxas médias de crescimento em altura (m.dia^{-1}) de dosséis de Tifton 85 sob três doses de adubação nitrogenada. Taxas calculadas a partir dos dados primários mostrados na Tabela 4.

4.3 Número de Perfилhos

Para os valores relativos ao número de perfилhos, foi detectado efeito de doses de N; DAC e para a interação dose x DAC ($p=0,0055$, Tabela 3). O desdobramento dos níveis de N dentro de DAC, indicou que na amostragem inicial (8 DAC) não havia diferenças significativas entre as doses, verificando-se um valor médio de 125 ± 10 perfилho. m^{-2} , como mostra a Figura 12. Todavia, no período de crescimento subsequente, entre 8 e 16 dias, verificaram-se, em todos os tratamentos, as maiores taxas de crescimento nas densidades de perfилhos, com valores de 29, 48 e 64 perfилho. $\text{m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ para o baixo, médio e alto nível de N, respectivamente, ou seja um padrão semelhante ao verificado no crescimento vertical do dossel.

Tais padrões indicam que neste período, a atividade meristemática das gemas vegetativas foi maximizada. Isto pode ser explicado pela previsível interação entre influxos radiculares de N diferenciados entre os tratamentos, associados a uma prevalência de dias com elevado nível de radiação solar (acima de $20\text{-}25\text{MJ.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$, Figura 4), na ausência de deficiência hídrica, durante a fase de rebrotação, onde as plantas não estavam competindo por luz. Com efeito, a intensidade luminosa incidente pode ser considerada o fator ambiental mais importante na dinâmica de perfilhamento em gramíneas, sendo que, em altos níveis, a radiação solar estimula o perfilhamento, ao passo que em baixos níveis, o crescimento das gemas é reduzido (PEDREIRA et al., 2001), principalmente via alteração na composição espectral da luz que chega às gemas próximas ao solo (DEREGIBUS et al., 1983). Dessa forma, o potencial de perfilhamento só pode ser atingido quando o IAF da pastagem é baixo, uma vez que a taxa de surgimento de novos perfилhos decresce na medida que ocorre incremento no IAF (NABINGER e PONTES, 2001).

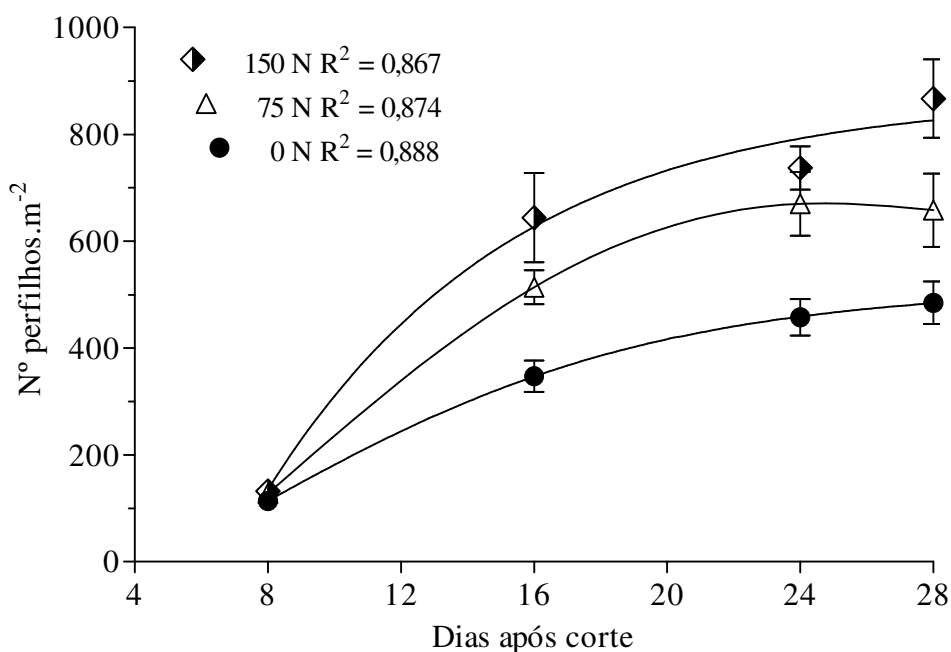


Figura 12. Variação temporal da densidade populacional de perfilhos em parcelas experimentais de Tifton 85, em função de três níveis de adubação nitrogenada. As curvas de ajuste correspondem ao modelo sigmoidal de Boltzmann. Barra vertical indica o desvio padrão da média.

Os dados mostrados na Figura 12 correspondem a esse modelo. Após atingir taxa máxima aos 16 dias, a população de perfilhos continua a aumentar de forma contínua no período de crescimento subsequente (16-24 dias), tendendo à estabilização após os 24 dias, de acordo com um padrão logístico de crescimento, e em patamares estatisticamente diferentes. Assim, ao final do período de rebrota, o maior nível de N produziu 78% mais perfilhos do que a testemunha não adubada (867 vs. 485 perfilho.m⁻², Figura 12).

4.4 Índice de Área Foliar, Índice de Cobertura Verde, e Interceptação de Luz

Para a variável IAF, a análise de variância detectou efeitos significativos para doses de N, dias após corte e para a interação ($p=0,0046$).

A Figura 13 mostra as tendências temporais de variação para este importante atributo estrutural do dossel no capim-Tifton 85. Resultados obtidos por Galzerano (2008) e por Oliveira (2008) durante o primeiro ano de estudos na área experimental (ver Material e Métodos, item 3.3) permitem afirmar que para a expressão da produtividade fotossintética da pastagem, a manutenção de altos valores de IAF (via adubação nitrogenada) é o principal requisito.

O padrão de variação mostrado pela Figura 13 indica um comportamento do IAF diferente do evidenciado pelo perfilhamento. Com efeito, enquanto o modelo sigmoidal explicou apropriadamente a variação temporal da densidade populacional de perfilhos, o mesmo não aconteceu com o IAF, onde tendências polinomiais foram uma melhor opção de ajuste (Figuras 12 e 13). A defasagem entre os dois modelos é mais evidente entre os 16 e 24 dias, onde os valores de IAF não mostraram variação significativa, em nenhum dos três níveis de N, acontecendo o oposto com o perfilhamento.

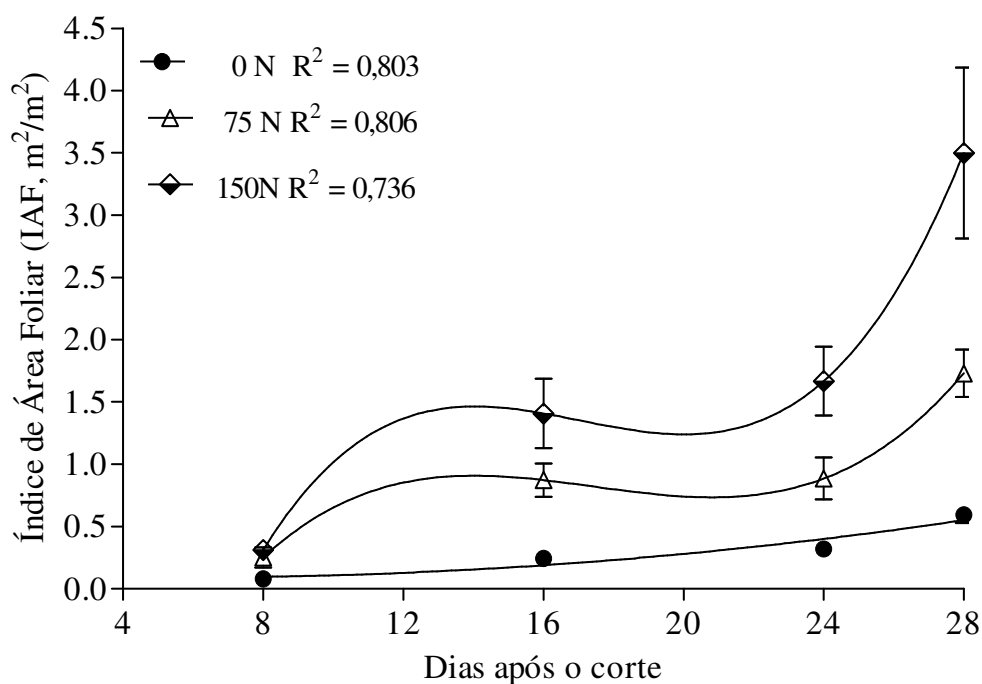


Figura 13. Variação temporal do Índice de Área Foliar em parcelas experimentais de Tifton 85, em função de três níveis de adubação nitrogenada. As curvas de ajuste correspondem ao modelo polinomial cúbico, para os níveis 75 e 150 N e quadrático para 0 N. Barra vertical indica o desvio padrão da média.

É difícil justificar essa diferença de comportamento, uma vez que pelo método de estimativa, os valores de IAF foram dependentes da densidade de perfilhos. É possível admitir que erros amostrais no outro componente do IAF, a área foliar média por perfilho possam explicar, ao menos em parte, as discrepâncias observadas. Independentemente desse aspecto, a adubação nitrogenada causou diferenças significativas na produção de área foliar, melhor evidenciadas aos 28 DAC, quando os valores de IAF entre os tratamentos guardaram uma relação aproximada de 6:3:1, isto é, exibiram o tipo de gradiente esperado através da estratégia experimental adotada.

A Figura 14 mostra as variações temporais do “Índice de Cobertura Verde” (ICV), durante o ciclo de rebrota estudado.

O intuito da introdução dos pontos suplementares foi o de melhorar a qualidade do ajuste do modelo ($R^2 \geq 0,95$, para os três níveis), definindo claramente um padrão sigmóide de desenvolvimento do dossel, como seria de esperar durante a rebrotação após uma desfolha severa (NASCIMENTO JUNIOR et al., 2002).

O ICV enquanto fração do solo coberto pela parte verde da folhagem (VARELLA et al., 2002), se constitui numa medida bidimensional do tamanho do dossel (Figura 7). Por essa razão, e dada a sua relativa facilidade de determinação, o ICV poderia se constituir em um estimador indireto, objetivo e não destrutivo. Todavia, os presentes dados apontam para uma saturação de resposta, uma vez que a análise estatística (teste F) indicou não existirem diferenças significativas entre as curvas correspondentes a 75 e 150kg N/ha, em nenhum dos dias analisados.

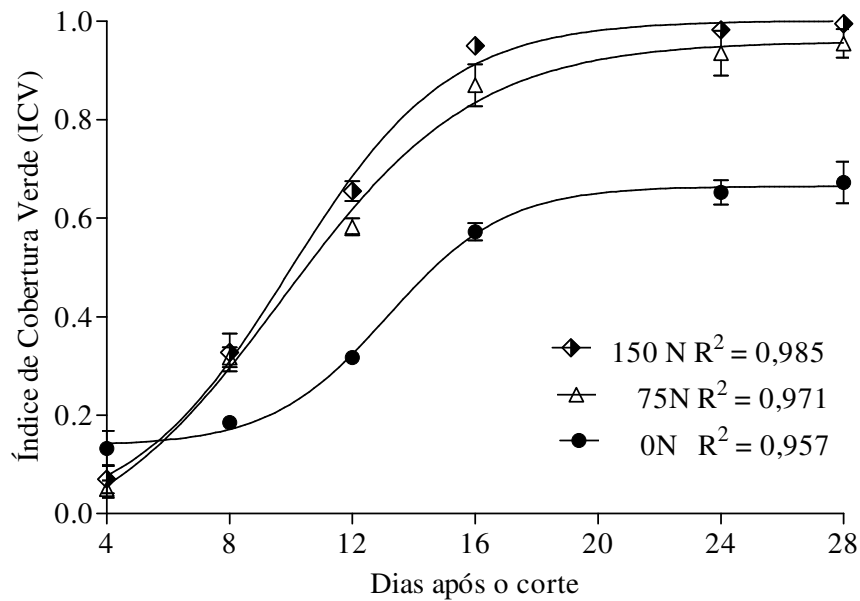


Figura 14. Variação temporal do Índice de Cobertura Verde em parcelas experimentais de Tifton 85, em função de três níveis de adubação nitrogenada. As curvas de ajuste correspondem ao modelo sigmoidal de Boltzmann. Barra vertical indica o desvio padrão da média.

A proposta de usar indicadores indiretos de produtividade a partir da cobertura vegetal não é nova. Werker e Jaggard (1997) sugeriram a sua utilização como um sucedâneo do IAF para estimativas de interceptação de luz em várias espécies cultivadas, utilizando recursos como fotografia infravermelha ou determinações de refletância foliar.

A Figura 15 mostra a variação temporal da percentagem de interceptação da radiação fotossinteticamente ativa, para os três níveis de N estudados.

Novamente verificou-se com este parâmetro, que a inclusão de pontos extras melhorou a qualidade do modelo ($R^2 \geq 0,96$, para os três níveis), principalmente por permitir, nos tratamentos que levaram N, uma melhor definição das assíntotas (inferior e superior) na função sigmoidal de Boltzmann utilizada. A forma das curvas sugere que houve diferenças em interceptação de RFA entre os níveis médio e alto de N, especialmente entre os dias 12 e 22. Todavia não foi possível validar a previsão das curvas para esse período, devido à ocorrência de dias com forte cobertura de nuvens ou chuvosos (Figuras 3 e 4), que impossibilitam as medições. Por outro lado, e como já observado durante o primeiro ano, depois do dia 24, as percentagens de interceptação para os níveis médio e alto de N tenderam a convergir a valores entre 91-95% aos 28 dias. Para o tratamento testemunha, que nessa data atingiu um valor de 63%, o comportamento foi totalmente diferenciado. A consideração conjunta das figuras 13, 14 e 15, permite detectar que, em termos de ICV, o tratamento testemunha estacionou após 16-18 dias (Figura 14), enquanto a sua interceptação de RFA continuava a aumentar, quase linearmente (Figura 15) em concordância com um moderado aumento linear do seu IAF (Figura 13). Novamente é difícil explicar este comportamento, uma vez que está bem estabelecido que a relação entre ICV e IAF é linear para valores de $IAF \leq 1,0-1,5$ (RIBEIRO, 2006; OLIVEIRA, 2008), tornando-se rapidamente assintótica em valores maiores de IAF.

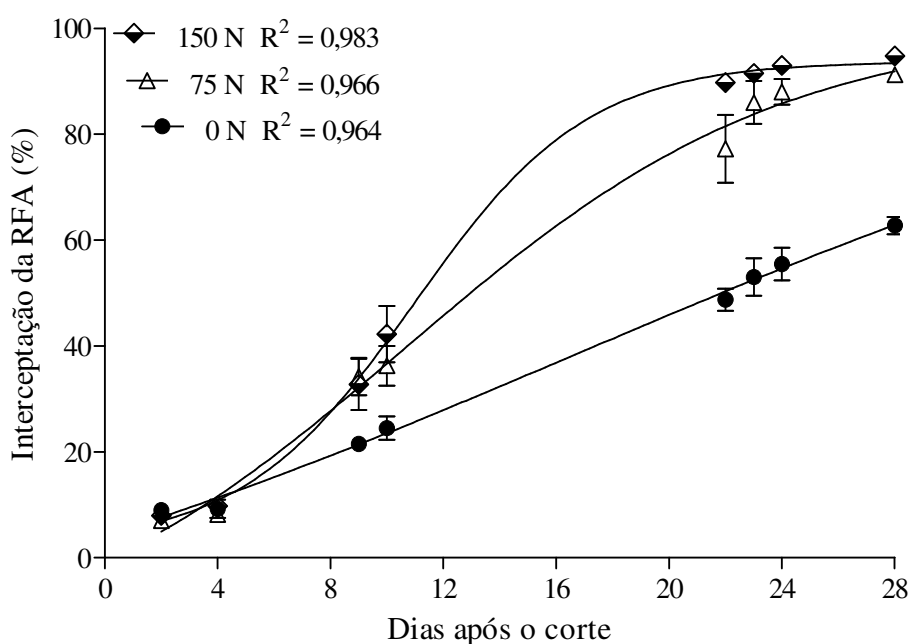


Figura 15. Variação temporal da Intercepção de radiação fotossinteticamente ativa (RFAint, %), em parcelas experimentais de Tifton 85, em função de três níveis de adubação nitrogenada. As curvas de ajuste correspondem ao modelo sigmoidal de Boltzmann. Barra vertical indica o desvio padrão da média.

4.5 Produção de Massa Seca

Com relação a produção de massa verde seca, a análise estatística revelou efeito para o nível de N ($p=0,0112$); os dias após o corte ($p<0,0001$) e a interação $N \times DAC$ ($p=0,0006$, Tabela 3). Entretanto, diferenças entre níveis de N só se evidenciaram aos 24 DAC, quando os tratamentos que levaram N, diferiram significativamente da testemunha (Tabela 5). Com o aumento do período de rebrota foi possível então evidenciar diferenças entre os três níveis de N. Aos 28 dias, observaram-se incrementos 230 e 175% para o alto e médio nível de N, em relação ao tratamento testemunha.

Tabela 5. Produção de massa verde seca total ($g \cdot m^{-2}$) do Tifton 85 em função dos níveis de adubação nitrogenada e das épocas de amostragem.

Nível (kg/ha)	Dias após corte			
	8	16	24	28
0	66,8±20,1 Ab	123,3±34,3 Ab	166,5±32,0 Ba	194,7±39,2 Ca
75	96,3±22,3 Ac	156,5±23,4 Ac	253,6±80,2 Ab	342,0± 81,4 Ba
150	104,4±30,9 Ad	203,5±28,0 Ac	278,0±53,3 Ab	461,7±106,9 Aa

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente (Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$).

A partir do resultado da interação entre dose de nitrogênio e dias após corte foram ajustadas curvas de regressão entre MSV e dias após o corte. Observou-se um melhor ajuste com o modelo exponencial, independentemente do nível de N (Figura16).

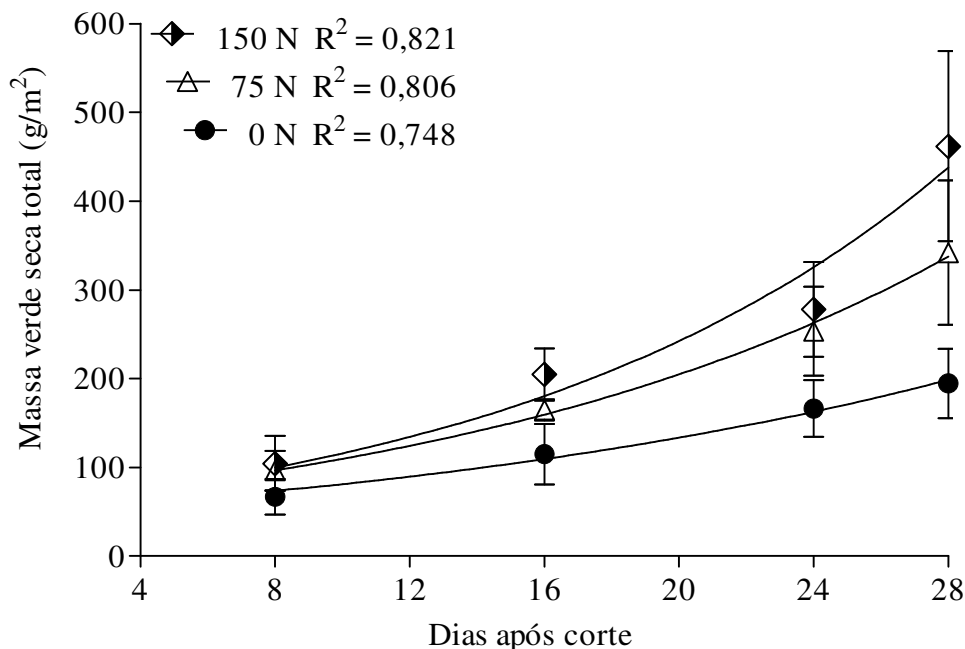


Figura 16. Variação temporal da produção de massa verde seca (MVS g.m⁻²) da parte aérea do Tifton 85, para três níveis de adubação nitrogenada, em função do período de rebrota (Dias após corte). As curvas de ajuste correspondem ao modelo exponencial. Barras verticais indicam o desvio padrão da média.

4.6 Teores de Clorofila Foliar

Para os teores de clorofila total, a análise de variância detectou efeitos significativos para nível de N; dias após o corte e para sua interação ($p=0,0002$, Tabela3). Na primeira amostragem houve diferença apenas entre a testemunha e as parcelas adubadas, com valores médios de 450 vs. 532-545 $\mu\text{mol.m}^{-2}$ de folha, para os tratamentos que levaram N (Figura 17A). Com o aumento do período de rebrota houve, na testemunha, uma queda gradual e significativa ($p<0,05$) dos teores de clorofilas (o que evidencia uma deficiência no influxo radicular de N mineral), enquanto na maior dose de adubo aplicado, a tendência foi oposta. O máximo contraste foi observado aos 24 DAC, onde os teores de clorofila total, na maior dose de N, excederam em quase 70% os observados na testemunha (648 vs. 384 $\mu\text{mol.m}^{-2}$ de folha, respectivamente). Essas diferenças concordam com a expectativa, uma vez que diversos resultados têm verificado aumentos consistentes nos teores de clorofila total em resposta à aplicação de adubo nitrogenado. Em plantas de berinjela (*Solanum melongena*), foi verificado que aumentos nos teores de N na rizosfera se corresponderam com aumentos nas concentrações foliares de clorofilas *a*, *b* e total (LOPEZ-CANTARERO et al., 1994). Em folhas de milho, Daughtry et al. (2000) observaram que os teores de clorofila total mais do que duplicaram conforme as doses de fertilizante nitrogenado aumentaram. Outros autores têm feito observações qualitativamente similares em outras espécies vegetais (SHADCHINA e DMITRIEVA, 1995; GUIMARÃES et al., 1999; ARGENTA et al., 2001a; HARIPRIYA ANAND e BYJU, 2008).

Para clorofila *a* observou-se, na análise de variância, a mesma tendência dos resultados de clorofila total, com significância para os níveis de N; dias após o corte e para a interação entre esses fatores ($p=0,0001$; Tabela 3). Na primeira amostragem houve diferença apenas entre a testemunha e as parcelas adubadas, com valores médios de 353 vs. 410-412 $\mu\text{mol.m}^{-2}$.folha para os tratamentos que levaram 75 e 150kg de N/ha respectivamente (Figura 17B). Com o aumento do período de rebrota houve, na testemunha, uma queda gradual e significativa ($p<0,05$) até os 16 dias, uma estabilização até os 24 dias, e uma nova redução, significativa, na última amostragem. Para as maiores doses de N, as diferenças entre os teores tornaram-se significativas após a primeira amostragem. Aos 24 DAC, foram observados os máximos contrastes, onde o teor de CLOR *a*, na maior dose de N aplicada, foi 60% maior do que o observado na testemunha (Figura 17B).

Com relação aos teores de clorofila *b*, os mesmos foram influenciados pelas doses de N; dias após o corte e pela interação NxDAC ($p=0,0154$, Tabela3).

Com base no período de rebrota, novamente na primeira coleta, só houve diferença ($p<0,05$) da testemunha em relação aos tratamentos que receberam +N e -N, e na terceira, onde destacou-se nitidamente o teor de clorofila *b* correspondente à maior dose de N aplicada (Figura 17C). As tendências dominantes entre doses de N, foram a de um leve declínio em 0 e 75kg N/ha, enquanto a maior dose mostrou um aumento sustentado, culminando com um pico (175 $\mu\text{mol.m}^{-2}$ de folha) aos 24 dias, ou seja, um incremento de 90% em relação à testemunha (91 $\mu\text{mol.m}^{-2}$ de folha, Figura 17C).

Em síntese, considerando-se a evolução conjunta dos dados relativos às clorofilas *a* e *b*, na dependência das doses de N aplicadas e dos dias transcorridos após o corte de uniformização, há dois fatos bem definidos: primeiro um declínio temporal, até os 24 dias da relação clorofila *a*/clorofila *b* associado ao maior nível de N aplicado, e motivada por um aumento absoluto do teor de clorofila *b* antes que uma redução em clorofila *a* (comparar figuras 17 B e 17 C), e, em todos os casos, um declínio nos teores de ambas as clorofilas no período final (24-28 dias). Na literatura mais específica, podem ser encontradas várias razões que em princípio poderiam explicar estas tendências. Por exemplo, Araújo (2008), cita observação de Wolf (1956), no sentido de que, com o aumento da idade da folha, uma maior proporção de clorofila *a* passa a ser degradada. Essa explicação, ligada ao tempo de vida da folha, não se aplicaria no presente caso, uma vez que sempre foi amostrada a primeira folha completamente expandida, a qual mostrou uma relativa estabilidade dos teores de clorofila *a* com o tempo (Figura 17 B). Sugestões alternativas incluem uma resposta fisiológica perante um quadro de estresse ambiental agudo por volta dos 24 DAC, caracterizado pela ocorrência dos maiores níveis de radiação global e temperaturas do ar registradas no período (Figuras 3 e 4), onde aumentos nos teores de clorofila *b* (e possivelmente de carotenóides) teriam um papel fotoprotetor e antioxidante (TAIZ e ZEIGER, 2004; HEBER et al., 2007; CHEN et al., 2008). Uma vez que o propósito principal deste trabalho é testar hipóteses relativas às possíveis interrelações entre os teores de clorofila, as leituras de um clorofilômetro e os teores de N foliar, a partir desta seção somente serão considerados os teores de clorofila total, omitindo-se por brevidade e clareza a discriminação entre clorofila *a* e *b*.

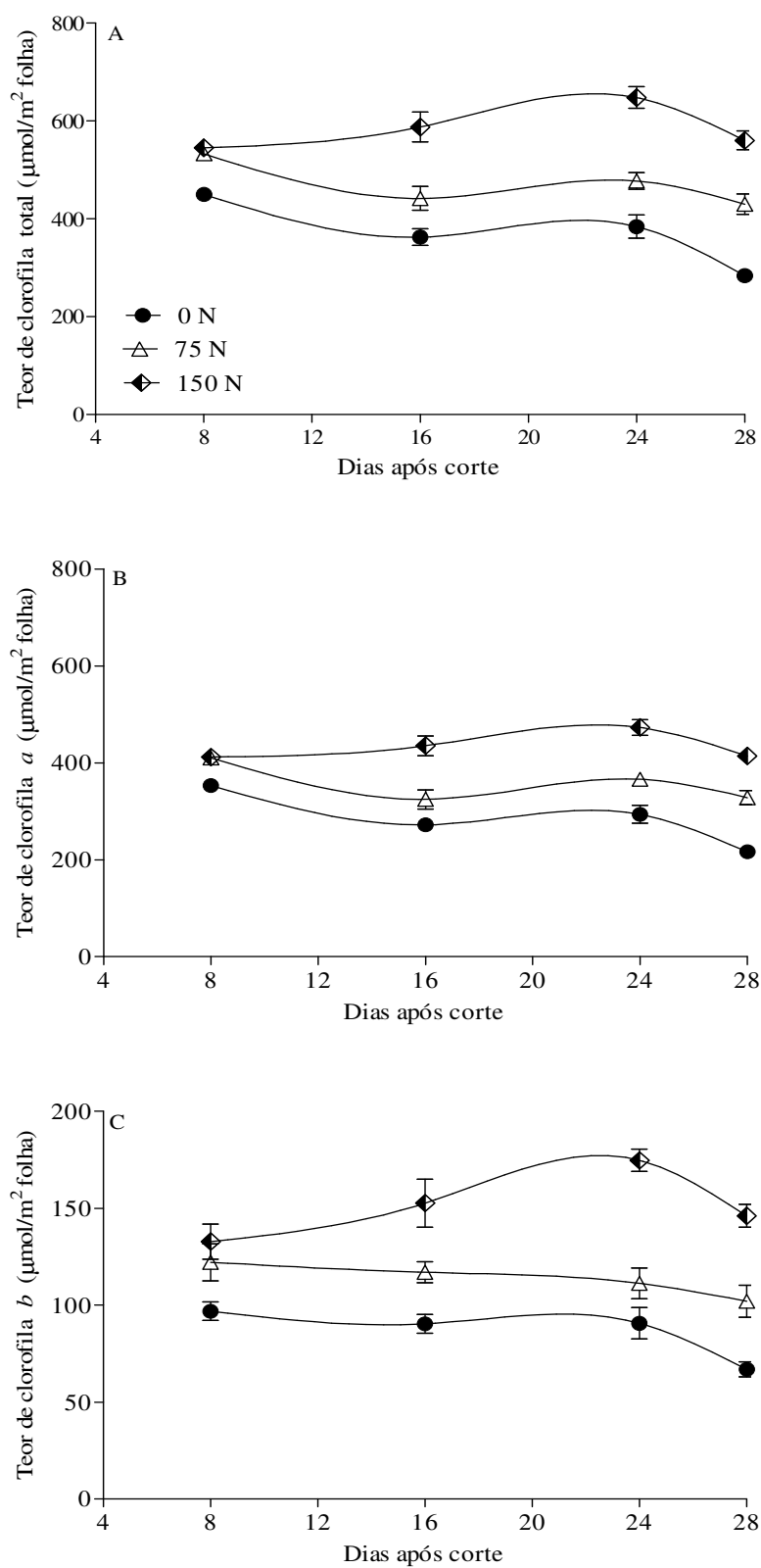


Figura 17. Variação temporal dos teores de clorofila extraídos de discos foliares de folhas do Tifton 85, em função de três níveis de adubação nitrogenada. **A)** Clorofila total; **B)** Clorofila a; **C)** Clorofila b. As curvas conectando os pontos foram geradas pelo procedimento de análise gráfico “Cubic spline”. Barra vertical indica o desvio padrão da média.

4.7 Leituras do Clorofilômetro

Para as leituras feitas com o aparelho ClorofiLOG[®], a análise estatística indicou existirem efeitos significativos do nível de N ($p < 0,0001$); dos dias após o corte ($p < 0,0001$) e da interação NxDAC ($p < 0,0001$). Exeção feita às leituras correspondentes aos tratamentos N=75 e N=150, aos 8 dias, as quais não diferiram ao nível de significância de 5% (Figura 18), todas as demais comparações, entre doses de N, mostraram diferenças estatisticamente significativas. Esse padrão foi similar ao observado entre as médias dos teores de clorofila total (Figura 17A).

Os maiores contrastes entre os valores das leituras foram observados aos 16 dias, sendo de $50,6 \pm 1,2$; $38,8 \pm 1,8$ e $31,7 \pm 2,1$ unidades de ICF (doravante ICF), para as doses de 150, 75 e 0kg/ha de N aplicado (Figura 18), o que representa uma diferença de quase 60% entre as doses extremas.

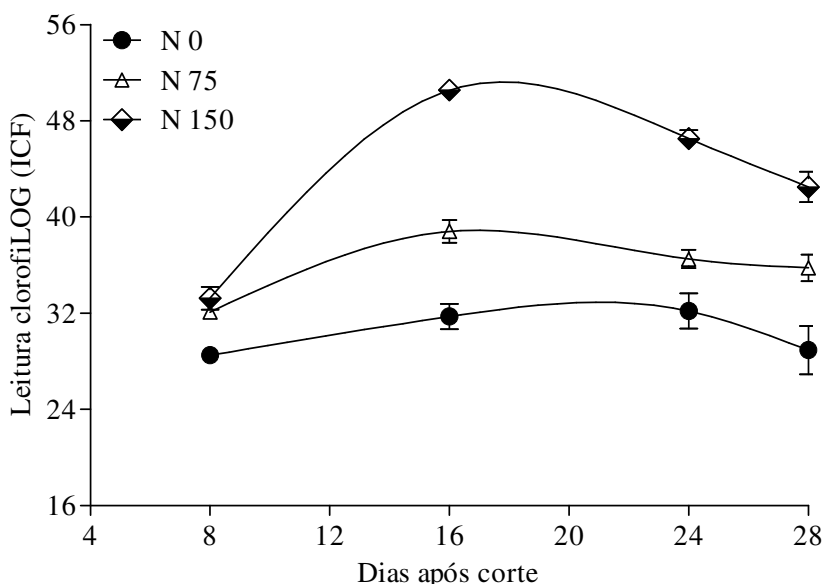


Figura 18. Variação temporal de leituras do clorofilômetro (ICF) para o teor de clorofila total em folhas do Tifton 85, após corte de uniformização, para três níveis de adubação nitrogenada. As curvas conectando os pontos foram geradas pelo procedimento de análise gráfico "Cubic spline". Barra vertical indica o desvio padrão da média.

Após o pico observado aos 16 DAC e com o aumento do período de rebrota houve, na maior dose de N, uma queda gradual e significativa ($p < 0,05$) dos valores de ICF. Já na dose intermediária como no tratamento testemunha, as variações nas leituras foram mais atenuadas, de forma que não se registraram diferenças estatísticas com o passar dos dias.

4.8 Relação Entre Teor de Clorofila Total e Leituras do Clorofilômetro

As leituras do clorofilômetro (Figura 18) e os teores de clorofila total (Figura 17A) se correlacionaram positiva e significativamente. Considerando-se a totalidade dos valores médios, o valor do coeficiente r (Pearson) foi de 0,721 ($p = 0,0081$; $n = 12$). Quando foram excluídas da correlação as médias da amostragem inicial (8 DAC) e da final (28 DAC), o coeficiente melhorou expressivamente, aumentando para $r = 0,926$ ($p = 0,0086$; $n = 6$).

A partir desse resultado, passou-se ao estabelecimento de uma relação funcional entre ambas as variáveis. A Figura 19 mostra a natureza linear da relação entre o teor de CLOR T e as leituras do clorofilômetro, tanto aos 16 quanto aos 24 dias (Figura 19A e B, respectivamente).

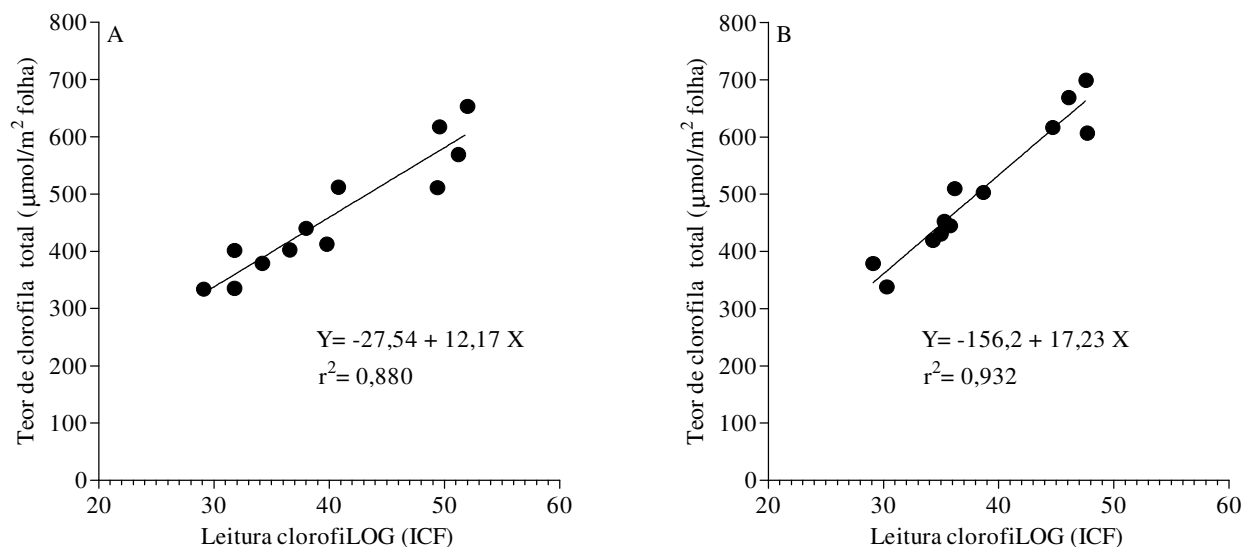


Figura 19. Relação linear entre teor de clorofila total ($a+b$, $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{folha}$) e os valores das leituras do clorofilômetro CFL 1030. A variabilidade dos dados é produto de três níveis de aplicação de N (0, 75 e 150kg/ha) em parcelas de Tifton 85. **A)** Amostragem realizada aos 16 dias após corte; **B)** Amostragem realizada aos 24 dias após corte.

Como não há antecedentes de trabalhos que tenham usado este equipamento em pastagens de *Cynodon* spp., não se dispõe de um termo de comparação direta, que possa aferir a ordem de grandeza dos resultados obtidos. Entretanto, como o ClorofiLOG® e o SPAD utilizam a mesma escala de mensuração, pode haver uma certa equivalência entre medições feitas com ambos os aparelhos. Por exemplo, Araújo (2008) obteve uma relação linear entre teores de clorofila total e valores de SPAD, combinando observações feitas com genótipos de capim-elefante anão e da cv. Mott. Utilizando os valores da sua regressão, pode se calcular leituras de SPAD na faixa de 30-50, que correspondem a teores de clorofila entre 540-940 $\mu\text{mol.m}^{-2}$. A mesma faixa de leitura, obtida com o CFL 1030, no capim Tifton, corresponde a teores de clorofila de 360-710 $\mu\text{mol.m}^{-2}$ (Figura 19B). É claro que as diferenças entre os teores estimados podem ser atribuídas a fatores como espécie vegetal; idade e posição dos tecidos amostrados e ao próprio método de extração da clorofila, além daquelas diferenças decorrentes das estratégias experimentais escolhidas. Porém, o interessante é que mesmo assim, quando se comparam os teores médios de clorofila dentro das respectivas espécies e faixas de leitura, a diferença a favor do capim elefante é de 38% (740 vs. 535 $\mu\text{mol.m}^{-2}$), isto é, são produzidos resultados (teores de clorofila) que estão dentro da mesma ordem de magnitude.

4.9 Concentração de N na Primeira Folha Completamente Expandida

Para o teor de N foliar, a análise de variância indicou existirem efeitos significativos das doses de N, dos dias após corte assim como da sua interação (Tabela 3). Na primeira amostragem, aos 8 dias, os dados indicaram que as folhas amostradas de ambos os

tratamentos com adubação nitrogenada, tinham teores de N iguais ($45,5\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), os quais contrastaram significativamente com o teor nas folhas das parcelas não adubadas com N, que foram 28% menor ($33\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, Figura 20).

Os maiores contrastes entre os teores de N foram encontrados na amostragem seguinte, onde foi observado o maior valor médio absoluto durante o período de rebrota ($52\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ na maior dose de N aplicada). Comparativamente, os teores nos tratamentos com 75kg N/ha e testemunha experimentaram uma ligeira redução, embora não significativa.

Finalmente, a partir dos 16 dias e até o final do período de rebrotação, foi observado um declínio constante dos teores, nos três tratamentos, com uma intensidade que dependeu do teor presente nas folhas na segunda amostragem.

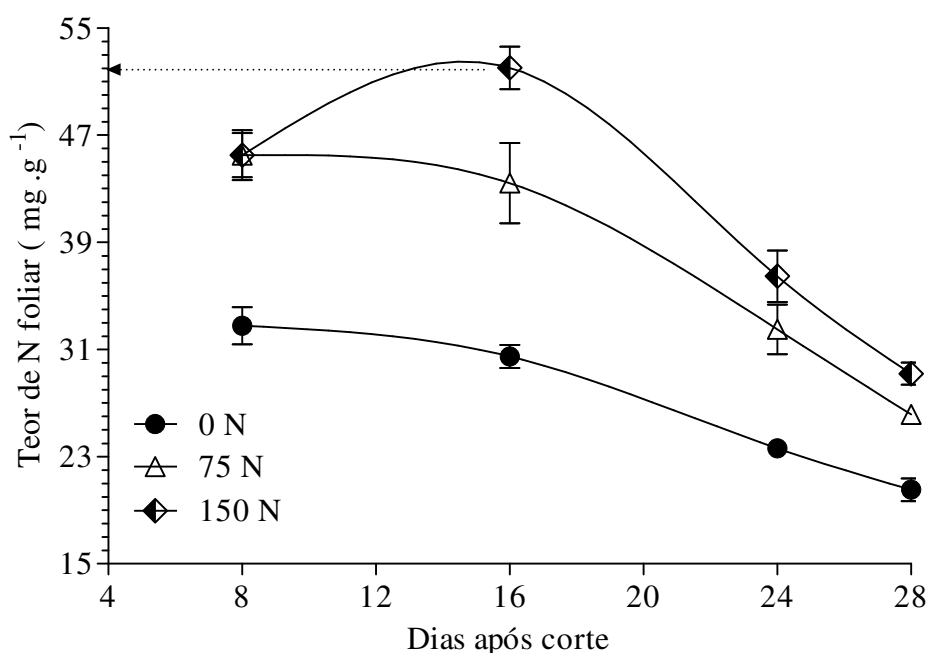


Figura 20. Variação temporal dos teores de N foliar da primeira folha completamente expandida do capim Tifton 85, para três níveis de adubação nitrogenada. As curvas conectando os pontos foram geradas pelo procedimento de análise gráfico “Cubic spline”. A linha horizontal tracejada indica o máximo teor médio de N. Barra vertical indica o desvio padrão da média.

Como consequência desses ritmos diferenciais de diluição do N na biomassa foliar, aos 24 e 28 dias os teores dos tratamentos com + N não diferiram entre si, separando-se como grupo de significância do tratamento com - N, que consistentemente, mostrou os menores teores durante todo o ciclo de rebrota (Figura 20).

Os teores de N existentes nas folhas em dado tempo, são o produto da interação dos fatores que regulam a aquisição de N pelas plantas: por um lado, aqueles ligados à disponibilidade do N mineral na solução do solo, e por outro, os que regulam o crescimento vegetal (JEUFFROY et al., 2002). Como foi discutido previamente, durante o período 8-16 dias, o dossel experimentou um acelerado crescimento (altura: Figura 11; perfilhamento: Figura 12; cobertura verde: Figura 14), associado a uma interceptação crescente de RFA (Figura 15), principalmente sob adubação nitrogenada. Então o baixo teor foliar de N na testemunha revela a escassa disponibilidade de N no solo, o qual limitou o tamanho dos influxos radiculares do nutriente (ENGELS e MARSCHNER, 1995; FERNANDES e ROSSIELLO, 1995) e conseqüentemente o crescimento do dossel. Em contraste, a alta oferta

de N no solo induzida pela maior dose de uréia aplicada, deve ter propiciado altos influxos radiculares, causando forte impacto nas taxas de crescimento do período, e ainda concentrando N nas folhas mais novas (Figura 20) como já comentado.

Incidentalmente, é de interesse observar que as formas de N mineral, particularmente o $N-NO_3^-$ na rizosfera, não cumpre somente um papel trófico, senão que têm efeitos rizomorfogênicos diretos, atuando como sinalizadores nos processos de indução gênica responsáveis pela produção de raízes laterais finas, de alta capacidade absorviva (ZHANG et al., 2007). É bem provável então que a maior disponibilidade de N através da adubação tenha exercido um efeito benéfico sobre o sistema radicular, acelerando a sua recuperação após a desfolha imposta pelo corte de uniformização, como sugerem os resultados de Lópes (2003) avaliando sistemas radiculares do capim coastcross. Já o período seguinte (16–24 dias) ficou caracterizado pela acumulação exponencial de matéria seca (Figura 16). Por outro lado, uma vez que os influxos radiculares de N são declinantes no tempo (VAN VUUREN et al., 1996; FRANÇA et al., 1999), o resultado foi a progressiva redução dos teores foliares de N (Figura 20), que no capim Tifton associam-se a aumentos da fração fibrosa (OLIVEIRA, 2008).

4.10 Relação Entre Teores de N Foliar e Teores de Clorofila Total.

Um dos propósitos do presente estudo foi o de pesquisar a hipótese de existir uma associação consistente entre os teores de clorofila e os de N foliar. Tal tipo de relação tem sido já evidenciada em outras espécies cultivadas (SHADCHINA e DMITRIEVA, 1995; ARGENTA et al., 2001a; TORRES NETTO et al., 2002; BARBOSA FILHO et al., 2008), mas no caso do *Cynodon* spp. cv. Tifton 85 não foi encontrado nenhum registro similar.

A Figura 21 mostra a correlação simples (Pearson) entre essas duas variáveis. Curiosamente a correlação é mais robusta quando se incluem todas as médias do período experimental (Figura 21A) do que quando se usam apenas os maiores valores, associados às amostragens intermediárias, aos 16 e 24 dias, onde não chega a atingir significância ao nível de 5% ($r=0,59$ Figura 21B). A explicação para essa tendência reside no fato de que o máximo teor de N ocorreu aos 16 dias e depois declinou abruptamente, enquanto que o teor máximo de clorofila total foi extraído aos 24 dias, conforme já discutido (Figuras 17 A e 20).

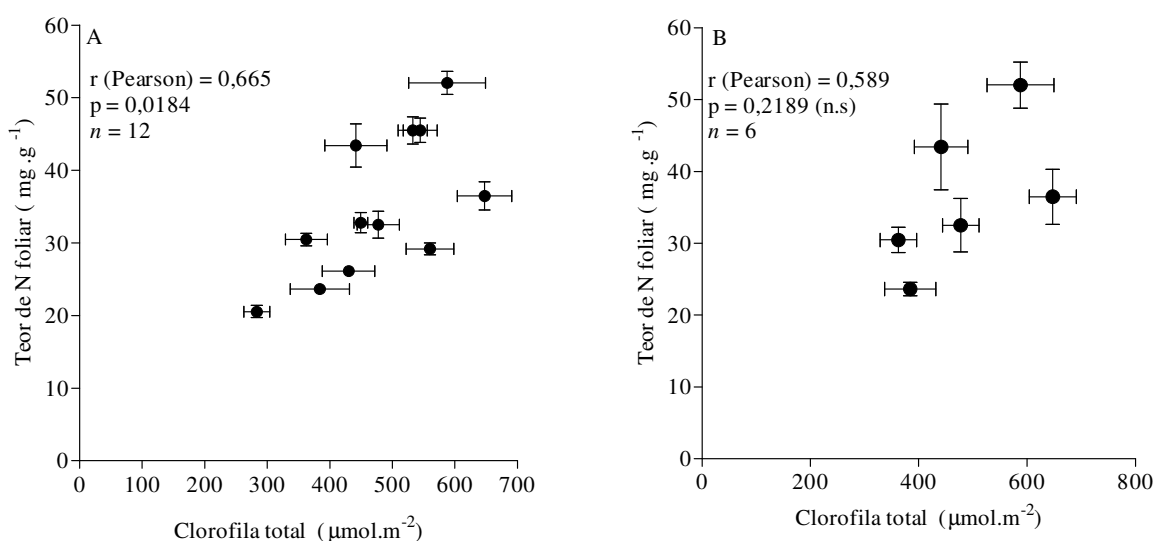


Figura 21. Correlação entre os teores de N foliar total ($mg.g^{-1}$) e de clorofila total ($a+b$, $\mu mol.m^{-2}.folha$). A variabilidade dos dados é produto de níveis de N (0, 75 e 150 kg/ha) e datas de amostragem. **A)** Coeficiente de correlação para as quatro datas de amostragem; **B)**

Coefficiente de correlação para os dados correspondentes aos 16 e 24 dias. As barras indicam os desvios padrão das médias, na horizontal, para o teor de clorofila total; na vertical, para o teor de N foliar.

Todavia, quando a relação se limita aos 16 dias (Figura 22), obtém-se uma relação linear consistente entre os teores de clorofila total que podem ser considerados moderados ($400-600\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$) e os teores de N foliar.

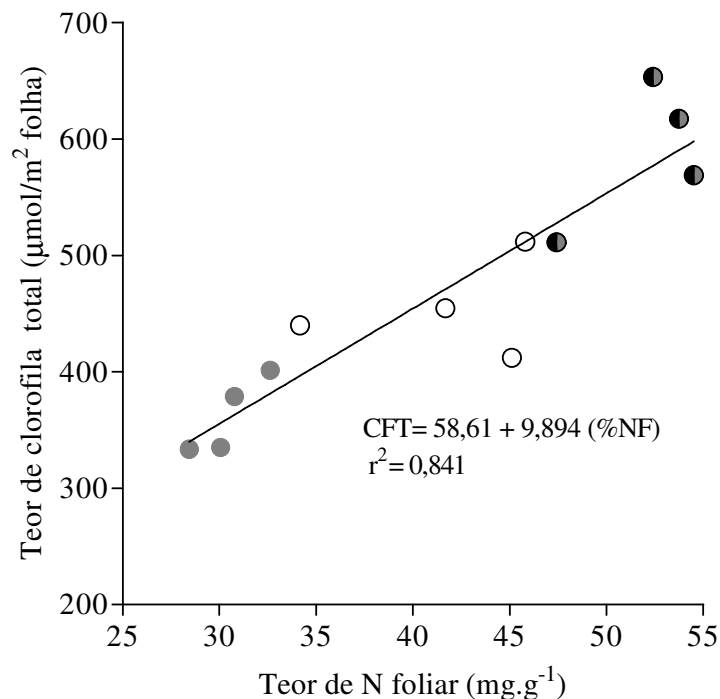


Figura 22. Relação linear entre teor de clorofila total ($a+b$, $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{folha}$) e os teores de N foliar da primeira folha completamente expandida. A variabilidade dos dados é produto de três níveis de N (0, 75 e 150kg/ha) em parcelas de Tifton 85. Circulo cinza: parcelas que não receberam N; Circulo vazio: 75kg N/ha; Circulo bicolor: 150kg N/ha. Valores referentes a amostragem realizada aos 16 dias após corte.

4.11 Relação Entre Teores de N Foliar e Leituras de Clorofilômetro

Quando se substituiu o teor de clorofila total pelos correspondentes valores de ICF, o nível da correlação com o teor de N foliar piorou quando se incluíram todas as médias do período experimental ($r=0,48$ n.s., Figura 23A), ao passo que ao se restringir a associação às duas amostragens centrais do período estudado, a correlação melhorou consideravelmente ($r=0,826$, $p=0,04$; Figura 23B), superando o desempenho da clorofila total, na mesma correlação (Figura 21B). Em vista deste resultado, procedeu-se à parametrização da relação, que resultou da forma: $\text{N foliar} = -3,662 + 1,115 \text{ ICF}$ ($r^2=0,88$, Figura 24). Este tipo de relação é

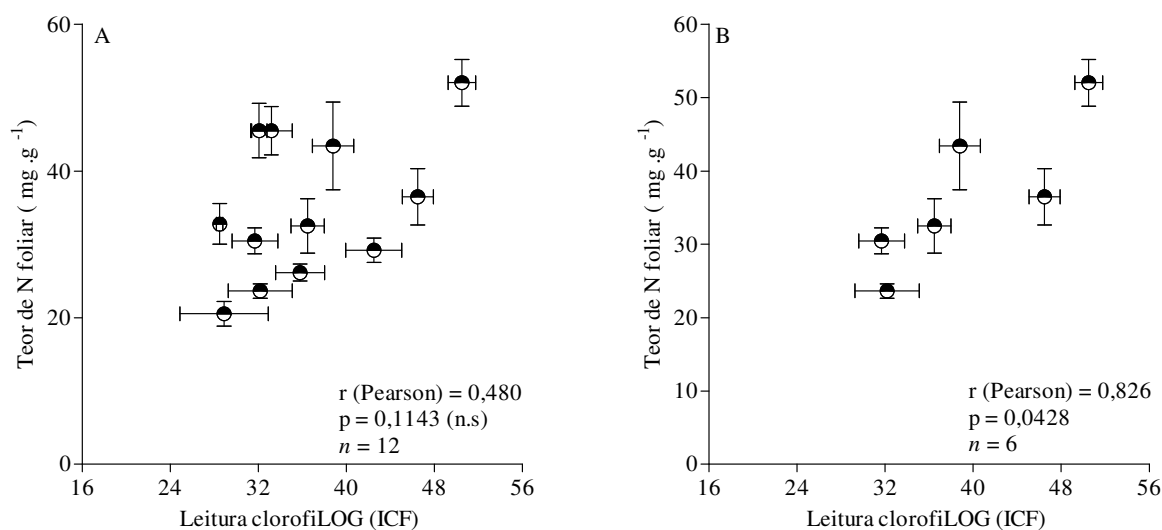


Figura 23. Correlação entre os teores de N foliar total (mg.g⁻¹) e as leituras do clorofilômetro CFL 1030. A variabilidade dos dados é produto de níveis de N (0, 75 e 150 kg/ha) e datas de amostragem. A) Coeficiente de correlação para as quatro datas de amostragem; B) Coeficiente de correlação para os dados correspondentes aos 16 e 24 dias. As barras indicam os desvio padrão das médias, na horizontal, para a leitura do ClorofiLOG; na vertical, para o teor de N foliar.

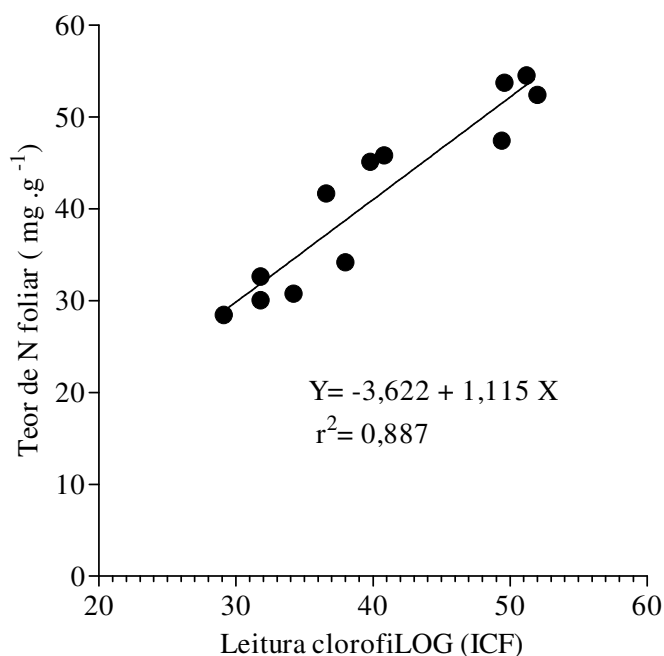


Figura 24. Relação linear entre o Teor de N em folhas de Tifton 85 e valores ICF, obtidos 16 dias após o corte de uniformização.

adequada para propósitos de diagnose nutricional, uma vez que produz informações sobre teores de N (e portanto de proteína bruta) em função da leitura do clorofilômetro, aos 16 dias

do período de rebrota. Em trabalho pioneiro, Alvim et al. (1999) estabeleceram que intervalos de cortes de duas semanas, na época das chuvas proporcionaram os mais altos teores de proteína bruta na matéria seca do Tifton 85. Os presentes dados podem ser tomados como uma confirmação dessa afirmativa, com o adendo que uma aferição rápida, não destrutiva e confiável do nível de proteína bruta pode ser obtida com emprego de um clorofilômetro.

4.12 Relações Entre Teores de Clorofila Total, Leituras de Clorofilômetro e Produção de Massa Seca.

Muitos trabalhos, envolvendo milho ou outras gramíneas produtoras de grão, têm mostrado correlações positivas entre os rendimentos em grãos, leituras de clorofilômetro e/ou teores de clorofilas obtidas em diferentes fases do ciclo vegetativo ou por ocasião da antese (BLACKMER e SCHEPERS, 1995; ARGENTA et al., 2001b; ZOTARELLI et al., 2003; ZHAO et al., 2005; ZHANG et al., 2008). Em vista disso, foi suposto que o estabelecimento de relações similares com gramíneas forrageiras poderia ser tarefa mais simples, uma vez que os rendimentos forrageiros não dependem dos processos de partição de fotoassimilados associados ao enchimento e maturação de grãos.

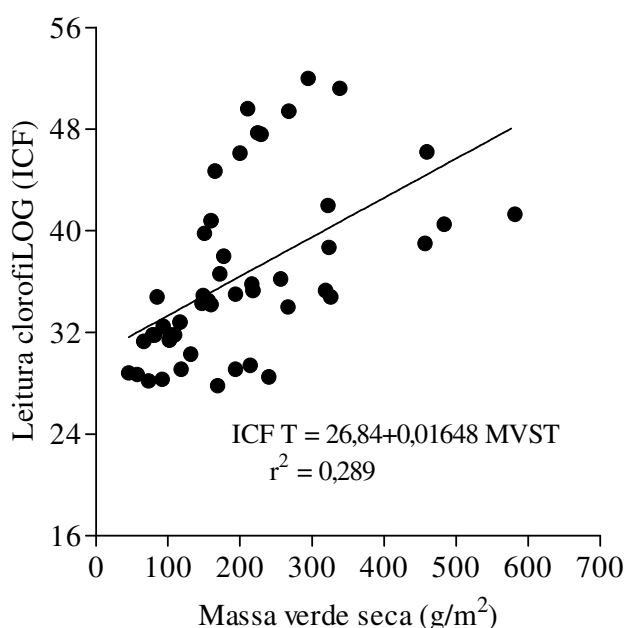


Figura 25. Relação linear entre valores ICF e a produção de massa verde seca total (MVST).

Com essa idéia em mente, procedeu-se a uma primeira aproximação, relacionando a produção de massa verde seca total (MSVT, $g.m^{-2}$) com as correspondentes leituras de ICF e com os teores de clorofila total, considerando-se todas as observações feitas ao nível de parcela ($n=48$). Os resultados são mostrados nas figuras 25 e 26.

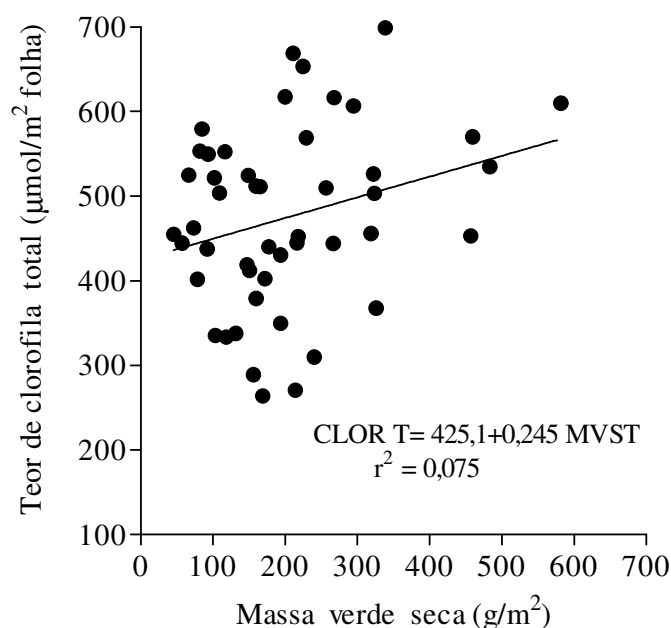


Figura 26. Relação linear entre os teores de clorofila total ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{folha}$) e a produção de massa verde seca (MVS $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$).

Em ambos os casos, os coeficientes de determinação das regressões lineares foram baixos (para ICF: $r^2 = 0,29$, significativo a $p < 0,01$ e para CLF T: $r^2 = 0,075$ n.s.), conforme mostram as figuras 25 e 26. A alta dispersão de pontos, observadas em ambos os casos, não são de surpreender, em vista dos ritmos diferenciais da marcha de absorção de N (evidenciados pelos teores foliares) e do acúmulo de massa verde seca, conforme foi discutido nos itens anteriores. Numa segunda abordagem, foram calculados os coeficientes de correlação correspondentes às MVST acumuladas até os 16 ou 24 dias após o corte, e os correspondentes valores de clorofilas totais ou ICF. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Coeficientes de correlação linear simples (Pearson) aos 16 e 24 DAC.

	CLOR T 16 DAC	CLOR T 24 DAC	ICF 16 DAC	ICF 24 DAC
MVST 16 DAC	0,803 ($p=0,0016$)	xxx	0,867 ($p=0,0003$)	xxx
MVST 24 DAC	0,533 ^{ns} ($p=0,0746$)	0,722 ($p=0,008$)	0,697 ($p=0,0117$)	0,677 ($p=0,0157$)

CLOR T 16 DAC=Clorofila total aos 16 dias após o corte; CLOR T 24 DAC=Clorofila total aos 24 dias após o corte. ICF 16 DAC=Índice de Clorofila Falker aos 16 dias após o corte; ICF 24 DAC=Índice de Clorofila Falker aos 24 dias após o corte; MVST 16 DAC=Massa Verde Seca Total aos 16 dias após corte; MVST 24 DAC=Massa Verde Seca Total aos 16 dias após corte. ns=não significativo.

Pode ser verificado, que de forma similar ao acontecido com os demais parâmetros, a restrição das correlações às duas amostragens centrais melhora grandemente os coeficientes, todos os quais (exceção feita da associação entre MSVT aos 24 DAC e a CLOR T aos 16 DAC); foram significativos com valores de $r \geq 0,67$. Novamente, as melhores associações foram obtidas aos 16 dias, confirmando esta data, como muito apropriada para realizar levantamentos de dados baseados no clorofilômetro.

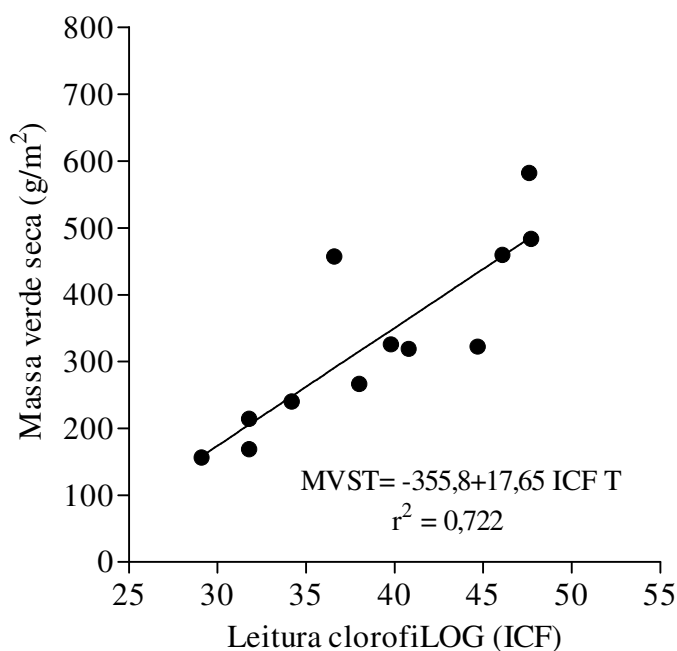


Figura 27. Relação linear entre leitura do clorofilômetro (ICF) aos 16 dias e a produção de massa verde seca (MVS g.m^{-2}) aos 28 dias.

Em vista desses resultados, procedeu-se então ao estabelecimento de uma relação que pudesse ser usada com finalidade predictiva. Para tal, os valores médios dos dados de MVST correspondentes à avaliação final, aos 28 dias, foram relacionados com as leituras de ICF obtidas aos 16 dias, que como visto, foi onde as associações se expressaram com maior vigor. O resultado, como mostra a figura 27, foi uma relação linear bem definida ($r^2=0,72$) entre essas variáveis. Obviamente que o importante na Figura 27 não são os parâmetros da regressão, produto de um período experimental muito limitado, mas sim a sua forma linear e o seu nível de significação estatística. Essa relação mostra a possibilidade de utilização do clorofilômetro para o estabelecimento de estimativas da produção de forragem. Essa situação pode acarretar benefícios variados para o produtor, em termos de adequação das taxas de lotação à disponibilidade de forragem, ou mesmo fazer inferências sobre a qualidade e quantidade da forragem disponível com propósitos de conservação. De outro ângulo, os presentes dados confirmam as observações feitas por vários autores, no sentido de que para cada espécie forrageira há a necessidade da sua calibração, quando se trata da utilização do teor de clorofila como um indicador da capacidade do pasto para acumular proteína e matéria seca.

5 CONCLUSÕES

De acordo com as hipóteses que guiaram a execução deste trabalho, podem ser concluído que:

- 1) A aplicação de doses de N imediatamente após um corte induzem diferentes respostas em termos de atributos estruturais, sendo que a altura, o índice de cobertura verde e a interceptação da radiação fotossinteticamente ativa, são as variáveis que melhor expressam essa diferenciação na disponibilidade de N no solo;
- 2) Os teores de clorofila total relacionam-se diretamente com as leituras de um clorofilômetro dentro do ciclo de rebrota;
- 3) Os teores de clorofila total na primeira folha completamente expandida guardam relação direta com os teores de N total, na mesma folha.
- 4) Em pastagens do capim-Tifton 85, a utilização do clorofilômetro, com finalidade preditiva, quer de matéria seca ou proteína bruta deve ser feita duas semanas após o início da rebrota.

6 REFERÊNCIAS

- AGUINAGA, A.A.Q.; CARVALHO, P.C.F.; ANGHINONI, I. et al. Componentes morfológicos e produção de forragem de pastagem de aveia e azevém manejada em diferentes alturas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 1523-1530, 2008.
- ALVIM, M.J.; XAVIER, D.F.; VERNEQUE, R.S. et al. Resposta do tifton 85 a doses de nitrogênio e intervalos de cortes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 34, 1999.
- ARAÚJO, S.A.C. **Avaliação e seleção de genótipos de capim-elefante anão para pastejo**. Tese de Doutorado em Ciência Animal. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes RJ, 2008. 102 p.
- ARGENTA, G.; DA SILVA, P.R. F.; BORTOLINI, C.G. Clorofila na folha como indicador do nível de nitrogênio em cereais. **Ciência Rural**, v. 31, p. 715-722, 2001a.
- ARGENTA, G.; DA SILVA, P.R. F.; BORTOLINI, C.G. et al. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 158-167, 2001b.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.
- ARREGUI, L.M.; LASA, B.; LAFARGA, A. et al., Evaluation of chlorophyll meters as tools for N fertilization in winter wheat under humid Mediterranean conditions. **European Journal of Agronomy**, v. 24, p. 140-148, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. 1990. **Official Methods of Analysis**. Kenneth Helrich. Fifteenth edition. Arlington, Virginia. v.2. 1298p.
- BAESSO, M. M.; PINTO, F.A.C.; QUEIROZ, D. M. et al. Determinação do “status” nutricional de nitrogênio no feijoeiro utilizando imagens digitais coloridas. **Engenharia Agrícola**, v.27 p.520-528. 2007.
- BARBOSA FILHO, M.P.; COBUCCI, T.; FAGERIA, N.K. et al. Determinação da necessidade de adubação nitrogenada de cobertura no feijoeiro irrigado com auxílio do clorofilômetro portátil. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1843- 1848, 2008.
- BARET, F.; HOULÈS, V.; GUÉRIF, M. Quantification of plant stress using remote sensing observations and crop models: the case of nitrogen management. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 869–880, 2007.
- BARNES, J.D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E. et al. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 32, p. 85-100, 1992.
- BLACKBURN, G.A. Hyperspectral remote sensing of plant pigments. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 855–867, 2007.
- BLACKMER, T.M.; SCHEPERS, J.S. Techniques for monitoring crop nitrogen status in corn. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v. 25, p. 1791–1800, 1995.
- BURTON, G. W., GATES, R. N., HILL, G. M. Registration of Tifton 85 bermudagrass. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 3, p. 644-645, May/June 1993.

CARTER, G.A.; KNAPP, A.K. Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. **American Journal of Botany**, v.88, p. 677-684, 2001.

CHAMBERS, J.M.; CLEVELAND, W.S.; KLIENER, B. et al. **Graphical methods for data analysis**. Florence: Wadsworth Publishing, 1983. 395 p.

CHEN, Q.; WANG, L.F.; SU, N. et al. Photosystem 2 photochemistry and pigment composition of a yellow mutant of rice (*Oryza sativa* L.) under different irradiances. **Photosynthetica**, v. 46, p. 35-39, 2008.

CIGANDA, V., GITELSON, A.; SCHEPERS, J. Vertical profile and temporal variation of chlorophyll in maize canopy: quantitative “crop vigor” indicator by means of reflectance-based techniques. **Agronomy Journal**, v. 100, p. 1409-1417, 2008.

DA CRUZ, A.C.F.; SANTOS, R.P.; IAREMA, L. et al. Métodos comparativos na extração de pigmentos foliares de três híbridos de *Bixa orellana* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl. 2, p. 777-779, 2007.

DA SILVA, S.C.; CUNHA, W.F. Métodos indiretos para estimar a massa de forragem em pastos de *Cynodon* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 38, n. 8, p. 981-989, 2003.

DAUGHTRY, C. S. T.; WALTHALL, C. L.; KIM, M. S. et al. Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. **Remote Sensing of Environment**, v. 74, p. 229–239, 2000.

DEREGIBUS, V.A., SANCHEZ, R.A., CASAL, J.J. Effects of light quality on tiller production in *Lolium* spp. **Plant Physiology**, v.72, p.900-912, 1983.

EICHELMANN, H.; OJA, V.; RASULOV, B. et al. Adjustment of leaf photosynthesis to shade in a natural canopy: reallocation of nitrogen. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, p. 389-401, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, 2006. 306p.

ENGELS, C.; MARSCHNER, H. **Plant uptake and utilization of nitrogen**. In: P.E, Bacon. (Ed). Nitrogen fertilization in the environment. New York: Marcel Dekker, Inc. 1995. p. 41-81.

EVANS, J.R. Photosynthetic acclimation and nitrogen partitioning within a lucerne canopy. II. Stability through time and comparison with a theoretical optimum. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 20, p. 69–82, 1993.

FAGUNDES, J.L.; DA SILVA, S.C.; PEDREIRA, C.G.S. et al. Índice de área foliar, coeficiente de extinção luminosa e acúmulo de forragem em pastagens de *Cynodon* spp. sob lotação contínua. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 187-195, jan. 2001.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA Ltda. Manual do medidor eletrônico de teor clorofila (ClorofiLOG / CFL 1030). Porto Alegre, Falker Automação Agrícola. Rev. B. 2008. 33p.

FERNANDES, M. S., ROSSIELLO, R. O. P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, p.111-148, 1995.

FERNANDES, M. S., ROSSIELLO, R. O. P., BENDIX, M. E. S. Effects of N-source, light intensity and temperature on nitrogen metabolism of bahiagrass. **Journal of Plant Nutrition**, v. 8, p. 945 – 963, 1985.

FRANÇA, M.G.C.; ROSSIELLO, R.O.P.; ZONTA, E. et al. Desenvolvimento Radicular e Influxo de Nitrogênio Em Duas Cultivares de Arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1845-1853, 1999.

GALZERANO, L. **Estabelecimento de pastagens de tifton 85 sob doses de adubação nitrogenada**. 2008. 38 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

GASTAL, F.; LEMAIRE, G. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 789-799, 2002.

GOVINDJEE, D.; WHITMARSH, J. **Photosynthesis: Energy Conversion by Plants and Bacteria**; GOVINDJEE, D., Ed.; Academic Press: New York 1982.

GUIMARÃES, T.G.; FONTES, P.C.R.; PEREIRA, P.R.G. et al. 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**, v. 58, p. 209-216, 1999.

HARIPRIYA ANAND, M.; BYJU, G. Chlorophyll meter and leaf colour chart to estimate chlorophyll content, leaf colour, and yield of cassava. **Photosynthetica**, v. 46, p. 511-516, 2008.

HATFIELD, J.L.; GITELSON, A.A. ; SCHEPERS, J. S. et al. Application of spectral remote sensing for agronomic decisions. **Agronomy Journal**, v.100 (Supplement): p. 117-131, 2008.

HEBER, U.; AZARKOVICH, M.; SHUVALOV, V. Activation of mechanisms of photoprotection by desiccation and by light: poikilohydric photoautotrophs. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2745–2759, 2007.

HIMSTEDT, M.; FRICKE, T.; WACHENDORF, M. Image analysis as a tool to evaluate legume proportions in legume-grass mixtures. In: A. HELLGADOTTIR e E.M. POTSCHE (Eds.), **Quality legume-based forage systems for contrasting environments**. Gumpenstein Proceedings. Austria: Wallig - Ennstaler Druckerei & Verlag GmbH, p. 165-168, 2006.

HONG, S-D., SCHEPERS, J.S.; FRANCIS, D.D. et al. Comparison of ground-based remote sensors for evaluation of corn biomass affected by nitrogen stress. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** . v. 38, p. 2209-2226, 2007.

JEUFFROY, M.H.; NEY, B.; OURRY, A. Integrated physiological and agronomic modeling of N capture and use within the plant. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 809-823, 2002.

KULL, O. Acclimation of photosynthesis in canopies: models and limitations. **Oecologia**, v. 133, p. 267–279, 2002.

LAVRES JUNIOR, J.; MONTEIRO, F.A. Diagnose nutricional de nitrogênio no capim-aruana em condições controladas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30 p.829-837, 2006.

LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v.89, p.871-885, 2002.

LEMAIRE, G., VAN OOSTEROM, E., SHEEHY, J. et al. Is crop nitrogen demand more closely related to dry matter accumulation or leaf area expansion during vegetative growth? **Field Crops Research**, v. 100, p. 91–106, 2007.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer, L.; DOUCE, R. Eds. **Methods in Enzymology**. Academic Press, London, UK, v. 148, 1987, p. 350-381.

LOPES, B. A. **Crescimento e qualidade do capim coactcross (*Cynodon dactylon* L. pers. cv. coactcross-1) sob doses de adubação nitrogenada**. 2003. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

LOPEZ-CANTARERO, I.; LORENTE, F. A.; ROMERO, L. Are chlorophylls good indicators of nitrogen and phosphorus levels? **Journal of Plant Nutrition**, v. 17, p. 979 – 990, 1994.

MARKWELL, J.; OSTERMAN, J.C.; MITCHELL, J.L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**, v. 46, p. 467– 472, 1995.

MARTÍN, I; ALONSO, N.; LÓPEZ, M.C. et al. Estimation of leaf, root, and sap nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter for ornamental shrubs. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 38, p.1785-1803, 2007.

MATHWORKS, I. Image Processing Toolbox for use with MATLAB Release. 12. Image Processing Toolbox User's Guide Revised for Version 2.2.2. MATHWORKS, Inc., 2000.

MILAN, J.R.; SILVA, R.P.; GALZERANO, L. et al. Efeitos do nitrogênio e potássio sobre o perfilhamento e produção foliar em Tifton 85 In: Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Zootecnia. **Anais...** João Pessoa: UFPB/ABZ, 2008. CD ROM.

MILLS, A.; MOOT, D.J.; JAMIESON, P.D. Quantifying the effect of nitrogen on productivity of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) pastures. **European Journal of Agronomy**, v. 30, 63-69, 2009.

MORAN, R. (1982) Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N'-dimethylformamide. **Plant Physiology**, v. 69, p.1376-1381.

NABINGER, C.; PONTES, L.S. Morfogênese de plantas forrageiras e estrutura do pasto. In: MATTOS, W.R.S. et al. (Ed.). A produção animal na visão dos brasileiros. Piracicaba, SP: Ed. FEALQ, Brasil, 2001. p. 755–771.

NASCIMENTO JUNIOR, D.; GARCEZ NETO, A. F.; BARBOSA, R.A. et al. Fundamentos para o manejo de pastagens: evolução e atualidade. In: *Simpósio Sobre Manejo Estratégico da Pastagem*. Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 149-196.

NIINEMETS, U. Photosynthesis and resource distribution through plant canopies. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, p.1052–1071, 2007.

OLIVEIRA, A.P.P. **Crescimento e composição químico-bromatológica do capim Tifton 85 (*Cynodon* spp.) sob doses de nitrogênio**. 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em

Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica RJ, 2008. 84 p.

ORTUZAR-IRAGORRI, M.A., ALONSO, A., CASTELLÓN, A., et al. N-Tester use in soft winter wheat: evaluation of nitrogen status and grain yield prediction. **Agronomy Journal**, v. 97, p. 1380–1389, 2005.

PAULINO, V.T.; SCHUNKE, R.; CANTARELLA, H. Avaliação do nível de nitrogênio em quatro cultivares de *Panicum maximum* Jacq através da medida indireta de clorofila In: REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35. 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. v.2. p.427-429, 1998.

PEDREIRA, B.C.; PEDREIRA, C.G.S. Fotossíntese foliar do capim-xaraés [*Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf. cv. Xaraés] e modelagem da assimilação potencial de dosséis sob estratégias de pastejo rotativo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 773-779, 2007.

PEDREIRA, C.G.S.; MELLO, A.C.L.; OTANI, L. O processo de produção de forragem em pastagens. In: MATTOS, W.R.S. et al. (Ed.). **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba, SP: Ed. FEALQ, Brasil, 2001, p. 772 – 807.

PORRA, R.J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. **Photosynthesis Research**, v. 73, p. 149-156, 2002.

PORRA, R.J., THOMPSON, W.A., KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.975, p. 384-394, 1989.

RAJCAN, I.; DWYER, L.M.; TOLLENAAR, M. Note on relationship between leaf soluble carbohydrate and chlorophyll concentrations in maize during leaf senescence. **Field Crops Research**, v. 63, p.13-17, 1999.

RAMBO, L.; SILVA, P.R.F.; ARGENTA, G. et al. Parâmetros de planta para aprimorar o manejo da adubação nitrogenada de cobertura de milho. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1637-1645, 2004.

RAMOS, P.D.; CASTRO, A.F.; CAMARGO, M.N. Levantamento detalhado de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 8, p. 1-27, 1973.

RIBEIRO, R.C., ROSSIELLO, R.O.P.; VARELLA, C.A.A et al. Comparação de métodos de introdução de leguminosas em pastagens de braquiária: cobertura vegetal e produção de matéria seca. In: XXVII Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. **Anais**. Rio Bonito, MS: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006, CD ROM.

RITCHIE, R.J. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. **Photosynthetica**, v. 46, p. 115-126, 2008.

SBRISSIA, A.F.; DA SILVA, S.C. Comparação de três métodos para estimativa do índice de área foliar em pastos de capim-marandu sob lotação contínua. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p. 212-220, 2008.

SENGE, M.O; WIEHE, A.; RYPPA, C. Synthesis, reactivity and structure of chlorophylls. In: GRUMM, B.; PORRA, R.J.; RÜDGER, W.; SCHEER, H. (Eds.) Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications. Dordrecht: Springer Science, 2006. p. 27-37.

SHADCHINA, T. M.; DMITRIEVA, V. V. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. **Journal of Plant Nutrition**, v. 18, p. 1427 – 1437, 1995.

SILVA, R.P. ROSSIELLO, R.O.P.; NASCIMENTO, F.C.; et al. Perfilamento e produção de massa seca do capim Tifton 85, sob doses de sulfato de amônio. IN: XVIII Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Anais...Seropédica RJ: UFRRJ**, 2008, CD ROM.

SINCLAIR, T.R.; HORIE, T. Leaf nitrogen, photosynthesis and crop radiation use efficiency: a review. **Crop Science**. v.29:90-98. 1989.

STEWART, A.M.; EDMISTEN, K.L.; WELLS, R.; COLLINS, G.D. Measuring canopy coverage with digital imaging. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 38, p. 895-902, 2007.

STREIT, M.N.; CANTERLE, L.P., CANTO, M.W. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, p. 748-755, 2005.

SUNAGA, Y.; HARADA, H.; KAWACHI, T. et al. Simple technique for estimating nitrate nitrogen concentration of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) at the heading stage using a chlorophyll meter. **Grassland Science**, v. 52, p. 133–140, 2006.

TAIT, M.A.; HIK, D.S. Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions? **Photosynthesis Research**, v. 78, p. 87-91, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TEIXEIRA, F.V.; CAMPOS, O. F.; COSER, A.C. Uso dos índices altura de planta e cobertura do solo e da associação dessas variáveis para a estimativa da forragem disponível em pastagem de capim-elefante. **Revista Universidade Rural, Série Ciência da Vida**, v. 22, p. 15-22, 2003.

TERASHIMA, I., MIYAZAWA, S.; HANBA, Y.T. Why are sun leaves thicker than shade leaves? - Consideration based on analyses of CO₂ diffusion in the leaf. **Journal of Plant Research**, v. 114, p. 93-105, 2001.

TORRES NETTO, A; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J.C. et al. Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14 p.203-210, 2002.

VAN KEULEN, H., GOUDRIAAN, J.; SELIGMAN, N.G. Modelling the effects of nitrogen on canopy development and crop growth. In: RUSSEL, G; MARSHALL, B.; JARVIS, P.G.(Ed.) **Plant canopies: their growth, form and function**. Cambridge: University Press. 1989. p. 83-104.

VAN VUUREN, M.M.I; ROBINSON, D; GRIFTITHS, B. S. Nutrient inflow and root proliferation during the exploitation of a temporally and spatially discrete source of nitrogen in soil. **Plant and Soil**, v.178, p. 185-192, 1996.

VARELLA, C.A.A.; PINTO, F.A.C.; QUEIROZ, D.M. et al. Determinação da cobertura do solo por análise de imagens e redes neurais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, p. 1-13, 2002.

VETEC, Química fina, http://www.vetcquimica.com.br/busca_1/produto1b.asp?reg=113. Acesso em 01/02/2009.

WATSON, D.J. Comparative physiological studies on the growth of field crops: I. Variation in net assimilation rate and leaf area between species and varieties, and within and between years. **Annals of Botany**, v. 41, p. 41–76, 1947.

WERKER, A.R; JAGGARD, K.W. Modelling asymmetrical growth curves that rise and then fall : applications to foliage dynamics of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). **Annals of Botany**, v. 79, p. 657- 665, 1997.

WINTERMANS, J.F.G.M.; DE MOTTS, A. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll and their pheophytins in ethanol. **Biochimica et Biophysica Acta** 109:448-453, 1965.

XIONG, X.; BELL, G. E.; SOLIE, J. B. Bermudagrass seasonal responses to nitrogen fertilization and irrigation detected using optical sensing. **Crop Science**, v. 47, p. 1603- 1610, 2007.

ZHANG, H.; RONG, H.; PILBEAM, D. Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2329–2338, 2007.

ZHANG, J.; BLACKMER, A.M.; ELLSWORTH, J.W. et al. Luxury production of leaf chlorophyll and mid-season recovery from nitrogen deficiencies in corn. **Agronomy Journal**, v. 100, p. 658-664, 2008.

ZHAO, D.; REDDY, K.R.; KAKANI, V.G. et al. Selection of Optimum Reflectance Ratios for Estimating Leaf Nitrogen and Chlorophyll Concentrations of Field-Grown Cotton. **Agronomy Journal**, v. 97, p. 89-98. 2005.

ZOTARELLI, L., CARDOSO, E.G., PICCININ, J.L. et al. Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1117-1122, 2003.