

Brza procena obezbeđenosti biljaka azotom: mogućnost korišćenja SPAD hlorofilmetra

- Originalan naučni rad -

Dragana BOŽIĆ, Aleksandar SIMIĆ, Mirjana KRESOVIĆ,
Sava VRBNIČANIN i Savo VUČKOVIĆ
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Zemun- Beograd

Izvod: U ovom radu ispitivana je mogućnost korišćenja ručnog prenosnog SPAD (Spectral Plant Analysis Diagnostic) hlorofilmetra (SPAD-502) za brzo merenje sadržaja azota u usevu *Lolium italicum* L. i korovskoj vrsti *Galium aparine* L. Na osnovu korelacione analize utvrđeno je da postoji jaka do vrlo jaka pozitivna zavisnost (od $0,75 < R_{xy} \leq 0,90$ do $0,90 < R_{xy} \leq 0,99$) između sadržaja azota u biljkama određenog standardnom hemijskom (Kjeldahlovom) metodom i procene njegovog sadržaja dobijenog na osnovu SPAD očitavanja. Dobijeni rezultati ukazuju da je metoda zasnovana na korišćenju SPAD hlorofilmetra podesna za brzu procenu obezbeđenosti biljaka azotom.

Ključne reči: Azot, biljka, hlorofil, Minolta SPAD-502.

Uvod

Nedestruktivna metoda za određivanje sadržaja hlorofila *in situ* zasnovana je na upotrebi prenosivog instrumenta Minolta SPAD-502, pomoću koga se kod intaktnih biljaka određuje relativni sadržaj hlorofila u listu na osnovu izmerene transmitovane svetlosti crvenog i infracrvenog dela spektra, **Gratani**, 1992. Dobijena numerička SPAD vrednost predstavlja relativni sadržaj hlorofila, a za izračunavanje apsolutnih vrednosti koristi se najbolje prilagođena prava dobijena na osnovu spektrofotometrijskog određivanja koncentracije hlorofila nekim od rastvarača (metanol, aceton). Ova nedestruktivna metoda za analizu sadržaja hlorofila je i do sada korišćena za dijagnostiku deficita azota i gvožđa u različitim biljkama, **Griffith i sar.**, 1998, **Samdur i sar.**, 2000, **Sexton i Carroll**, 2002, **Westcott i Wraith**, 1995, **Nikolic i Römhald**, 2003. Dok je između sadržaja azota i hlorofila u listu utvrđeno

postojanje pozitivne korelacije, *Nageswara Rao i sar.*, 2001, koncentracije gvožđa i hlorofila često nisu u pozitivnoj korelaciji i moguće je čak da hlorotični listovi pokažu sličnu koncentraciju gvožđa kao u zelenim listovima što su *Nikolic i Römheld*, 2007, opisali kao "paradoks hloroze".

Prilikom merenja neophodno je da se štipaljkom SPAD-metra, zahvati list, tako da senzor bude ravno naslonjen na njegov epidermis, pri čemu mesto merenja treba da bude između glavnog nerva i ruba lista. Ako se merenja ponavljaju u vremenu uvek treba da se meri isti list i na istom mestu. Osim toga, preporučuje se da se meri na najmlađem potpuno razvijenom listu za koji se predpostavlja da je fiziološki najaktivniji. Neophodno je očitati najmanje 20 SPAD vrednosti i uprosečiti, *Peterson i sar.*, 1993.

Prednosti upotrebe SPAD-metra za procenu relativnog sadržaja azota u biljci su te što je ova metoda brza i jednostavna. Može da se koristi u poljskim i kontrolisanim uslovima. Ne troši se vreme na sakupljanje uzoraka i slanje u laboratoriju za analizu, a rezultati su dostupni neposredno u polju i bez destrukcije listova.

S obzirom na značaj azota u ishrani biljaka, cilj istraživanja u ovom radu je bio da se ispita mogućnost primene nedestruktivne metode za brzu procenu njegovog sadržaja u listovima italijanskog ljujla (*Lolium italicum* L.) i korovske vrste lepljive broćike (*Galium aparine* L.), kako bi se dalje koristila za praćenje kompetitivnih odnosa između ovih vrsta za pristupačni azot u zemljištu.

Materijal i metode

U poljskom ogledu postavljenom po slučajnom blok sistemu u tri ponavljanja, zasnovan je usev tetraploidnog italijanskog ljujla (*Lolium italicum* L., sorta Tetraflorum). Lepljiva broćika (*Galium aparine* L.) koja se kao korovska vrsta spontano javlja u usevu italijanskog ljujla, podsejana je u proleće naredne godine. Veličina elementarne parcelice je iznosila 10 m². Trofaktorijelni ogled je zasnovan na dve količine semena za setvu (5 i 20 kg ha⁻¹) i dva međuredna rastojanja (20 i 60 cm): A-5kg ha⁻¹/60cm; B-5kg ha⁻¹/20cm; C-20 kg ha⁻¹/60cm, D-20kg ha⁻¹/20cm. Na svim varijantama ogleda u prolećnoj prihrani primenjene su četiri doze azota (0, 50, 100 i 150 kg ha⁻¹), upotrebom KAN-a (27% N). Merenja (40 ponavljanja po tretmanu) su obavljena četiri puta (od faze vlatanja do početka formiranja zrna italijanskog ljujla, u dvonedeljnim intervalima) u toku vegetacije, pri čemu su očitavane SPAD vrednosti, pomoću ručnog prenosnog SPAD hlorofilmetra (SPAD-502, Minolta Corp., Ramsey, NJ) i sa istih biljaka uzimani su uzorci za koje je utvrđen sadržaj azota Kjeldahlovom metodom, *Musinger i McKinney*, 1982.

Na osnovu međusobnog odnosa sadržaja azota utvrđenog standardnom (Kjeldahlovom) metodom i SPAD vrednosti očitanih na istim uzorcima dobijene su najbolje prilagođene prave na osnovu kojih su relativne SPAD vrednosti preračunate u stvarni sadržaj azota. Nivo korelacione zavisnosti između sadržaja azota u biljnom materijalu koji je dobijen na osnovu SPAD očitavanja i njegovog sadržaja dobijenog

standardnom hemijskom metodom utvrđen je obradom podataka u softverskom paketu STATISTICA® 6.0.

Rezultati i diskusija

Analizom rezultata (Tabele 1 i 2) dobijenih primenom različitih metoda za određivanje sadržaja azota u ovom radu utvrđeno je da je u svim ispitivanim tretmanima sa porastom količine primenjenog azotnog đubriva rastao sadržaj azota u analiziranom biljnom materijalu.

Tabela 1. Srednje vrednosti \pm SD sadržaja azota (%) u biljkama *L. italicum* i *G. aparine* dobijene metodom po Kjeldahlu: A-D (A-5kg semena ha^{-1} /međuredno rastojanje 60cm; B-5kg semena ha^{-1} /međuredno rastojanje 20cm; C-20 kg semena ha^{-1} /međuredno rastojanje 60cm, D-20kg semena ha^{-1} /međuredno rastojanje 20cm)
Means \pm SD of the Nitrogen Content (%) in plants of *L. italicum* and *G. aparine* Obtained by Kjeldahl Method: A-D (A-5kg seed ha^{-1} /60-cm row spacing; B-5kg seed ha^{-1} /20-cm row spacing; C-20 kg seed ha^{-1} /60-cm row spacing, D-20kg seed ha^{-1} /20-cm row spacing)

Vrsta Species	Merenje Measuring	Đubrenje (kg N/ha) Fertilisation	Varijante gustine <i>L. italicum</i> <i>L. italicum</i> density variants			
			A	B	C	D
<i>L. italicum</i>	I	0	2,82 \pm 0,51	2,44 \pm 0,12	2,59 \pm 0,23	2,17 \pm 0,23
		50	4,48 \pm 0,33	4,03 \pm 0,32	3,91 \pm 0,12	3,18 \pm 0,21
		100	4,93 \pm 0,28	4,07 \pm 0,54	3,93 \pm 0,18	4,28 \pm 0,35
		150	5,04 \pm 0,14	4,77 \pm 0,28	4,20 \pm 0,34	4,40 \pm 0,37
	II	0	2,22 \pm 0,19	1,68 \pm 0,19	1,52 \pm 0,16	1,62 \pm 0,26
		50	1,94 \pm 0,45	1,55 \pm 0,43	1,68 \pm 0,19	1,73 \pm 0,12
		100	2,05 \pm 0,36	2,00 \pm 0,13	2,26 \pm 0,34	1,91 \pm 0,10
		150	2,23 \pm 0,23	2,22 \pm 0,23	2,00 \pm 0,32	1,79 \pm 0,21
	III	0	1,72 \pm 0,21	2,13 \pm 0,34	1,64 \pm 0,23	1,39 \pm 0,32
		50	1,84 \pm 0,34	1,24 \pm 0,45	1,76 \pm 0,35	1,07 \pm 0,20
		100	2,19 \pm 0,45	1,53 \pm 0,26	1,62 \pm 0,09	1,56 \pm 0,18
		150	1,75 \pm 0,11	1,80 \pm 0,17	1,77 \pm 0,12	1,54 \pm 0,32
	IV	0	2,60 \pm 0,17	2,11 \pm 0,11	2,34 \pm 0,21	1,37 \pm 0,29
		50	1,22 \pm 0,22	2,52 \pm 0,09	2,51 \pm 0,32	2,41 \pm 0,37
		100	2,78 \pm 0,16	3,00 \pm 0,61	1,96 \pm 0,29	2,18 \pm 0,31
		150	3,76 \pm 0,45	3,50 \pm 0,23	1,79 \pm 0,17	3,06 \pm 0,43
<i>G. aparine</i>	I	0	1,36 \pm 0,44	1,32 \pm 0,43	1,24 \pm 0,16	1,49 \pm 0,23
		50	3,11 \pm 0,27	2,31 \pm 0,21	2,29 \pm 0,25	2,07 \pm 0,30
		100	3,29 \pm 0,24	3,52 \pm 0,22	3,89 \pm 0,22	3,07 \pm 0,54
		150	3,60 \pm 0,33	3,36 \pm 0,34	3,17 \pm 0,36	3,24 \pm 0,23
	II	0	1,31 \pm 0,23	1,48 \pm 0,33	1,35 \pm 0,31	1,00 \pm 0,09
		50	1,50 \pm 0,54	1,88 \pm 0,15	1,37 \pm 0,19	1,22 \pm 0,11
		100	2,15 \pm 0,51	2,09 \pm 0,12	2,02 \pm 0,29	1,63 \pm 0,18
		150	2,19 \pm 0,25	2,13 \pm 0,18	1,82 \pm 0,13	2,37 \pm 0,33

Nastavak Tabele 1

Vrsta Species	Merenje Measuring	Đubrenje (kg N/ha) Fertilisation	Varijante gustine <i>L. italicum</i> <i>L. italicum</i> density variants			
			A	B	C	D
III	III	0	1,25±0,23	1,45±0,23	1,35±0,18	1,17±0,21
		50	1,24±0,28	1,43±0,24	1,39±0,24	1,10±0,18
		100	1,82±0,29	1,38±0,23	2,17±0,22	1,89±0,12
		150	1,82±0,23	1,70±0,33	1,79±0,21	2,44±0,27
	IV	0	1,57±0,21	1,83±0,36	1,65±0,23	1,27±0,10
		50	2,65±0,28	2,41±0,18	1,60±0,20	1,62±0,14
		100	2,88±0,34	1,82±0,32	2,92±0,11	3,22±0,43
		150	3,01±0,35	3,19±0,44	2,65±0,36	3,40±0,30

Tabela 2. Srednje vrednosti ± SD sadržaja azota (%) u biljkama *L. italicum* i *G. aparine* dobijene na osnovu SPAD očitavanja: A-D (A-5kg semena ha⁻¹/međuredno rastojanje 60cm; B-5kg semena ha⁻¹/međuredno rastojanje 20cm; C-20 kg semena ha⁻¹/međuredno rastojanje 60cm, D-20kg semena ha⁻¹/međuredno rastojanje 20cm) Means±SD of the Nitrogen Content (%) in plants of *L. italicum* and *G. aparine* Obtained by SPAD Readings: A-D (A-5kg seed ha⁻¹/60-cm row spacing; B-5kg seed ha⁻¹/20-cm row spacing; C-20 kg seed ha⁻¹/60-cm row spacing, D-20kg seed ha⁻¹/20-cm row spacing)

Vrsta Species	Merenje Measuring	Đubrenje (kg N/ha) Fertilisation	Varijante gustine <i>L. italicum</i> <i>L. italicum</i> density variants			
			A	B	C	D
<i>L. italicum</i>	I	0	2,86±0,85	2,89±0,99	2,89±0,52	2,99±0,75
		50	4,50±0,89	4,28±1,24	3,96±0,62	3,96±1,35
		100	4,69±0,90	4,83±1,90	3,96±0,62	4,28±1,12
		150	5,28±0,87	4,86±1,78	4,50±0,60	4,37±0,94
	II	0	1,88±0,28	1,65±0,04	1,68±0,17	1,63±0,06
		50	1,72±0,33	1,93±0,16	1,86±0,14	1,79±0,21
		100	1,96±0,40	2,05±0,15	2,00±0,18	1,91±0,10
		150	2,00±0,31	2,10±0,13	2,08±0,19	1,91±0,08
	III	0	1,85±0,03	1,12±0,47	1,66±0,02	1,35±0,02
		50	1,87±0,07	1,22±0,39	1,69±0,02	1,39±0,02
		100	1,89±0,04	1,89±0,60	1,71±0,02	1,41±0,02
		150	1,91±0,04	1,92±0,71	1,72±0,02	1,42±0,16
	IV	0	3,39±0,41	4,73±1,18	1,71±0,03	1,27±0,54
		50	3,36±0,35	5,71±0,97	1,73±0,02	2,19±0,80
		100	3,73±0,24	5,68±1,56	1,71±0,03	2,15±0,90
		150	3,79±0,30	5,91±1,08	1,70±0,02	2,93±0,83
<i>G. aparine</i>	I	0	1,56±0,66	1,40±0,76	1,44±0,51	1,43±0,81
		50	3,92±0,72	2,72±1,85	2,98±0,63	2,28±1,41
		100	3,33±0,99	3,82±2,61	3,16±0,53	2,67±1,21
		150	3,70±0,92	3,86±2,48	3,48±0,59	2,86±1,21

Nastavak Tabele 2

Vrsta Species	Merenje Measuring	Đubrenje (kg N/ha) Fertilisation	Varijante gustine <i>L. italicum</i> <i>L. italicum</i> density variants			
			A	B	C	D
<i>G. aparine</i>	II	0	1,06±0,30	1,61±0,21	1,35±0,19	1,24±0,21
		50	1,66±0,58	1,76±0,39	1,57±0,29	1,71±0,31
		100	1,93±0,49	2,14±0,54	2,00±0,30	1,69±0,33
		150	2,24±0,57	2,08±0,49	1,94±0,22	1,82±0,29
	III	0	1,85±0,36	1,44±0,05	1,24±0,28	1,19±1,43
		50	1,89±0,49	1,46±0,09	1,50±0,31	1,73±1,22
		100	1,93±0,68	1,48±0,06	2,01±0,24	2,62±1,24
		150	1,88±0,65	1,54±0,49	1,96±0,02	3,02±0,02
	IV	0	2,20±0,27	2,21±0,63	1,15±0,21	1,59±0,95
		50	2,24±0,32	2,39±0,62	1,29±0,24	2,22±1,49
		100	2,79±0,24	2,29±0,04	1,95±0,30	3,39±1,44
		150	2,89±0,37	2,40±1,08	1,86±0,33	3,98±1,44

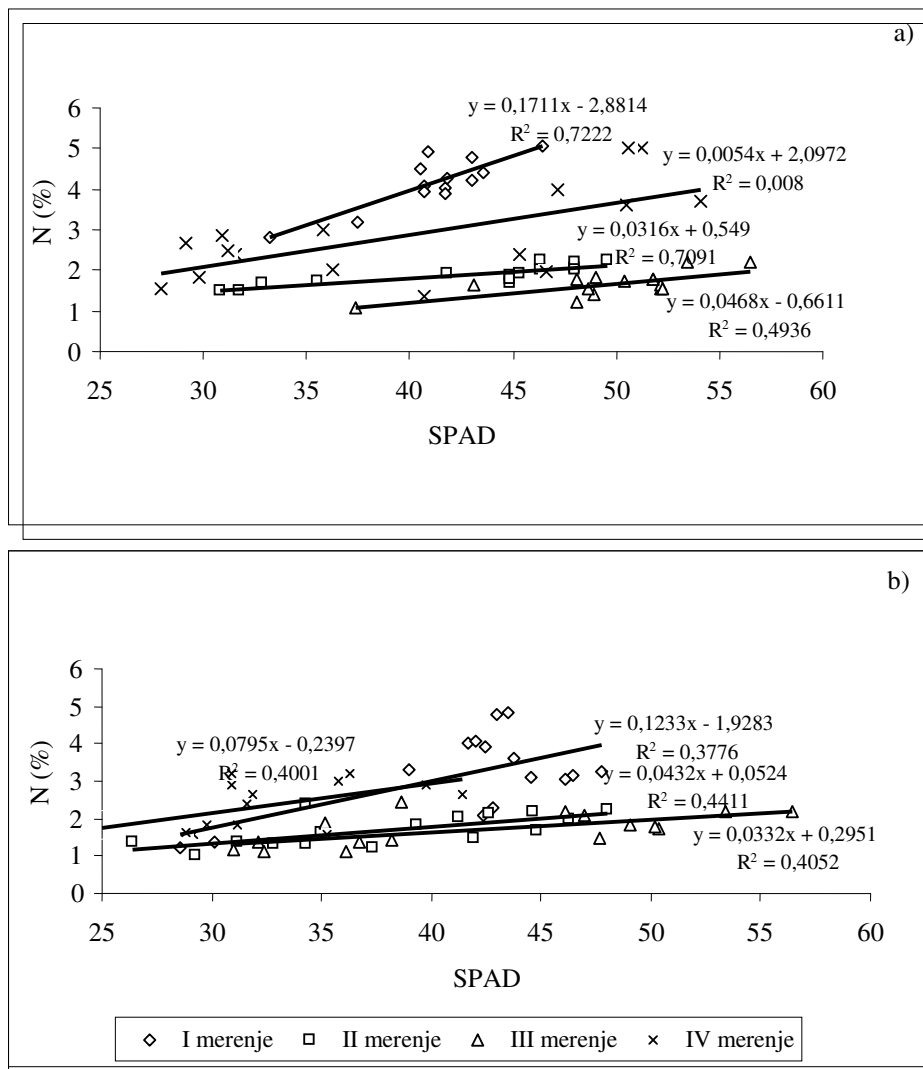
Linearna zavisnost između SPAD očitavanja i realnih vrednosti sadržaja azota (Grafikon 1) u biljnom materijalu dobijenih standardnom metodom razlikovala se pri različitim vremenima očitavanja, što je i razumljivo, s obzirom da očitana SPAD vrednost, tj. koncentracija hlороfila, može da varira u zavisnosti od godine, lokacije, biljne vrste ili sorte i svojstava zemljišta, *Spaner i sar.*, 2005.

Na osnovu korelacione analize utvrđeno je da u nekim varijantama postoji jaka ($0,75 < R_{xy} \leq 0,90$), a u nekim vrlo jaka ($0,90 < R_{xy} \leq 0,99$) pozitivna zavisnost između sadržaja azota u biljkama *L. italicum* i *G. aparine* određenog standardnim metodama i sadržaja azota dobijenog na osnovu SPAD očitavanja u svim ispitivanim varijantama (Tabela 3). Slične rezultate dobili su *Griffüh i sar.*, 1998, za koncentraciju azota i prinos semena engleskog lјulja, kao i *Sunaga i sar.*, 2006, za italijanski lјulj. Osim toga, potvrđena je pozitivna korelaciona zavisnost između koncentracije azota i SPAD očitavanja za pitomu nanu, *Westcott i Wraith*, 1995, kikiriki, *Nageswara Rao i sar.*, 2001, šećernu repu, *Sexton i Carroll*, 2002, pšenicu

Tabela 3. Koeficijenti korelacije sadržaja azota dobijenog različitim metodama
Correlation Coefficients of the Nitrogen Content Measured by Different Methods

Vrsta Species	Tretman Treatment	Merenje - Measuring			
		I	II	III	IV
<i>L. italicum</i>	A	0,98**	0,76*	0,94**	0,82*
	B	0,96**	0,76*	0,89*	0,84*
	C	0,98**	0,85**	0,90*	0,86*
	D	0,96**	0,91**	0,93**	0,99**
<i>G. aparine</i>	A	0,94**	0,92**	0,82*	0,77*
	B	0,96**	0,93**	0,83*	0,83*
	C	0,94**	0,95**	0,91*	0,98**
	D	0,87*	0,76*	0,94**	0,98**

i ječam, *Spaner i sar.*, 2005. Pozitivna korelacija između sadržaja azota u biljkama i SPAD očitavanja, posledica je toga što najveći deo azota u listovima ulazi u sastav hlorofila, tako da hlorofil metar koji je prvenstveno namenjen za utvrđivanje sadržaja hlorofila omogućava indirektno merenje sadržaja azota, *Moran i sar.*, 2000.



Grafikon 1. Linearna zavisnost između SPAD očitavanja i sadržaja azota u listovima *L. italicum* (a) *G. aparine* (b)
 The linear dependence between SPAD readings and the nitrogen content in leaves of *L. italicum* (a) *G. aparine* (b)

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja mogu da se izvedu sledeći zaključci:

Sadržaj azota u ispitivanim vrstama dobijen posredno SPAD očitavanjem u pozitivnoj je korelaciji sa rezultatima standardne hemijske (Kjeldahlove) metode.

Nedestruktivna metoda zasnovana na korišćenju ručnog prenosnog SPAD hlorofilmetra (SPAD-502) podesna je za brzu procenu statusa azota u usevu italijanskog ljulja zakorovljenog lepljivom broćikom.

Literatura

- Gratani, L.** (1992): A non-destructive method to determine chlorophyll content of leaves. *Photosynthetica* 26: 469-473.
- Griffith, S.M., T.W. Thoms** and **J.S. Owen** (1998): Soil and Perennial Ryegrass Seed Crop N Status and N Management Considerations for Western Oregon. In: *Seed Production Research*, ed. W. Young, III, Oregon State University Extension and USDA-ARS, Corvallis, Oregon, USA, pp. 30-34
- Moran, J.A., A.K. Mitchell, G. Goodmanson** and **K.A. Stockburger** (2000): Differentiation among effects of nitrogen fertilization treatments on conifer seedlings by foliar reflectance: a comparison of methods. *Tree Physiology* 20: 1113-1120.
- Musinger, R.A.** and **R. McKinney** (1982): Modern Kjeldahl systems. *Am. Lab.* 14: 76-79.
- Nageswara Rao, R.C., H.S. Talwar** and **G.C. Wright** (2001): Rapid assessment of specific leaf area and leaf nitrogen in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using a chlorophyll meter. *J. Agron. Crop Sci.* **186** (3): 175-182.
- Nikolic, M** and **V. Römheld** (2003): Nitrate does not result in iron inactivation in the apoplast of sunflower leaves. *Plant Physiol.* **132** (3): 1303-1314.
- Nikolic, M** and **V. Römheld** (2007): The dynamics of iron in the leaf apoplast. In: *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions*, B. Sattelmacher and W.J. Horst (Eds.), Springer, Heidelberg, pp. 353-371.
- Peterson, T. A., T. M. Blackmer, D. D. Francis** and **J. S. Schepers** (1993): *NebGuide: Using a Chlorophyll Meter to Improve N Management*, ed. Cooperative Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln. No. G93-1171-A.
- Samdur, M.Y., A.L. Singh, R.K. Mathur, P. Manivel, B.M. Chikani, H.K. Gor** and **M.A. Khan** (2000): Field evaluation of chlorophyll meter for screening groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes tolerant to iron-deficiency chlorosis. *Current Sci.* 79: 211-214.

- Sexton, P.** and **J. Carroll** (2002): Comparison of SPAD chlorophyll meter readings vs. petiole nitrate concentration in sugar beet. *J. Plant Nutr.* **25** (9): 1975-1986.
- Spaner, D., A.G. Todd, A. Navabi, D.B. McKenzie** and **L.A. Goonewardene** (2005): Can leaf chlorophyll measures at differing growth stages be used as an indicator of winter wheat and spring barley nitrogen requirements in eastern Canada? *J. Agron. Crop Sci.* **191** (5): 393-399.
- Sunaga, Y., H. Harada, T. Kawachi, T. Hatanaka** and **M. Ebato** (2006): Simple technique for estimating nitrate nitrogen concentration of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) at the heading stage using a chlorophyll meter. *Grassland Sci.* **52** (3): 133-140.
- Westcott, M.P.** and **J.M. Wraith** (1995): Correlation of leaf chlorophyll readings and stem nitrate concentrations in peppermint. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* **26**: 1481-1490.

Primljeno: 06.11.2007.

Odobreno: 01.04.2008.

* *
*

The Method for the Fast Estimation of a Plant Nitrogen Status: Possibility to Use SPAD Chlorophyll Meter

- Original scientific paper -

Dragana BOŽIĆ, Aleksandar SIMIĆ, Mirjana KRESOVIĆ,
Sava VRBNIČANIN and Savo VUČKOVIĆ
University of Belgrade Faculty of Agriculture, Belgrade-Zemun

Summary

The main objective of this study was to test the possibility to use the SPAD-meter as an appropriate tool for the fast estimation of a nitrogen status in both, Italian ryegrass (*Lolium italicum* L.) and catchweed (*Galium aparine* L.) that occurred as a predominate Italian ryegrass weed species. The measurements of the SPAD-units were conducted four times (from the stage of the Italian ryegrass stem elongation to the seed ripening stage, in two-week intervals) during the growing season, followed by the chemical analyses of nitrogen in the same leaf material. The high correlation between the leaf nitrogen content (expressed as a percentage per dry weight basis) and SPAD-units, were found in all treatments (varying from $0.75 < R_{xy} \leq 0.90$ to $0.90 < R_{xy} \leq 0.99$). Obtained results showed that method based upon using a SPAD chlorophyll meter was suitable for a quick estimation of the nitrogen status in plants.

Received: 06/11/2007

Accepted: 01/04/2008

Adresa autora:

Dragana BOŽIĆ

Poljoprivredni fakultet

Nemanjina 6

11080 Beograd-Zemun

Srbija

E-mail: dbozic@agrifaculty.bg.ac.yu