

RELACIÓN ENTRE UN MÉTODO NO DESTRUCTIVO Y UNO DE EXTRACCIÓN DESTRUCTIVO, PARA MEDIR EL CONTENIDO DE CLOROFILA EN HOJAS DE PLÁNTULA DE ALBAHACA (*Ocimum basilicum* L)

Relationship between a non-destructive method and a destructive extraction method, for measuring the chlorophyll content in basil seedling leaves (*Ocimum basilicum* L)

L Fenech-Larios ✉, E Troyo-Diéguez, M Trasviña-Castro, F Ruiz-Espinoza, A Beltrán-Morales, B Murillo-Amador, J García-Hernández, S Zamora-Salgado

(LFL) (FRE) (ABM) (SZS) Universidad Autónoma de Baja California Sur. Apartado postal 19-B. La Paz, Baja California Sur 23080, México. lfenech@uabcs.mx

(ETD) (MTC) (BMA) (JGA) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), México

Nota científica recibida: 1 de octubre de 2008, aceptada: 28 de noviembre de 2008

RESUMEN. La medición de la clorofila de la hoja por método de la extracción es un proceso lento costoso y destructivo. El objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración de la clorofila total en albahaca en etapa de plántula para el trasplante, con un medidor portátil de clorofila SPAD-502 y el método propuesto por Moran, correlacionando ambos datos. El uso del SPAD-502 permitió la determinación confiable de la clorofila, dado que su correlación con el método destructivo generó una ecuación con una R^2 de 99.9%.

Palabras clave: SPAD-502, *Ocimum basilicum* L., clorofila, clorofila total.

ABSTRACT. Measuring chlorophyll in leaves using the extraction method is a slow, costly and destructive process. The objective of this study was to determine the concentration of total chlorophyll in basil seedlings to be transplanted, using a SPAD-502 portable chlorophyll recorder and the method proposed by Moran, and correlating both types of data. The use of the SPAD-502 made it possible to obtain a reliable chlorophyll reading, as its correlation with the destructive method generated an equation with an R^2 of 99.9%.

Key words: SPAD-502, *Ocimum basilicum* L., chlorophyll, total chlorophyll.

INTRODUCCIÓN

La clorofila es importante en la planta para realizar la fotosíntesis. Existen tres tipos de clorofila y revisten la mayor relevancia dado que se utilizan para la síntesis de glucosa a partir de CO_2 y H_2O , con liberación de O_2 y en etapa de plántula es fundamental dada la alta demanda de carbohidratos para el crecimiento y desarrollo de la planta completa (Bidwell RGS 2002. Fisiología vegetal. AGT Editor SA). La medición de la clorofila de la hoja por método de la extracción es un proceso lento, costoso, incómodo y laborioso, que dificulta tomar decisiones inmediatas, además de ser destructivo, lo cual es importante principalmente cuando se trata de especies cultivadas que requieren, en la primera etapa, ser iniciadas en almácigos o en cajas ger-

minadoras para su posterior trasplante, como es el cultivo hortícola de la albahaca (*Ocimum basilicum* L.). Lo anterior limita el uso del método destructivo como herramienta de diagnóstico en la investigación de especies vegetales en busca de un contenido mayor de clorofila (Murillo-Amador B, Ávila-Serrano NY, García-Hernández JL, López-Aguilar R, Troyo-Diéguez E, Kaya C 2004. J. Plant Nutr. Soil Sci. 167: 1-2).

La capacidad para predecir el contenido de la clorofila en la hoja, con base en lecturas de fluorescencia o de reacción instantánea a un haz de luz, ha sido demostrada para diferentes especies vegetales, incluyendo *Ficus benjamina* L. and *Populus deltoides* Marsh (Loh F, Grabosky J, Bassuk N 2000. HortScience 35: 423-424), pasto San Agustín (Rodríguez IR, Miller GL 2000. HortSci. 35: 751-754)

y sorgo (Yamamoto A, Nakamura T, Adu-Gyamfi JJ, Saigusa M 2002. *J. Plant Nutr.* 25(10): 2295-2301). Sin embargo, la utilidad del medidor de la clorofila SPAD-502 para la determinación rápida de la clorofila no ha sido explorada en albahaca. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue calibrar la aplicación del medidor portátil de clorofila SPAD-502 para determinar la concentración de la clorofila total en albahaca, en etapa de plántula para el trasplante.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento fue conducido bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa en el invernadero del laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., ubicado en La Paz, Baja California Sur, México (24° 08' N, 110° 24' W). La especie utilizada fue albahaca (*Ocimum basilicum* L.) variedad Nuffar. Se utilizaron veinticuatro placas germinadoras de poliestireno de 288 cavidades cada una, las cuales fueron previamente desinfectadas con solución acuosa de hipoclorito de sodio (7 %) y enjuagadas con agua destilada.

Con la finalidad de probar que el uso del SPAD-502 es válido y efectivo para determinar la clorofila total en hojas de manera indirecta y sin destruirlas, se muestrearon 180 plantas. Las plantas fueron sometidas a dos factores de condición química del sustrato con seis niveles cada uno (seis niveles de salinidad 'CE' (0, 2, 4, 6, 8 y 10 dS · m⁻¹) y seis dosis de ácido húmico 'AH' (0, 50, 100, 150, 200 y 250 mg · L⁻¹). Para ambos factores se incluyó el testigo o control (sin salinidad y sin AH). Se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio y cinco repeticiones (cada planta se consideró como una repetición). Tres hojas sanas y completamente desarrolladas se recolectaron de cada planta, lo que sumó un total de 540 hojas, cuyas lecturas y determinaciones se dividieron en tres fechas (180 por fecha).

Las semillas fueron sembradas en un sustrato comercial inerte de vermiculita al mismo tiempo y bajo condiciones similares de manejo. Las placas con las semillas se irrigaron con una solución Hoa-

gland (Castellanos JZ, Uvalle-Bueno JX, Aguilar-Santelises A 2000. Manual de Interpretación de Análisis de Suelos y Aguas. INCAPA. U. A. Chapingo). Tres muestreos-mediciones se realizaron a los 25, 30 y 35 días después de emergida las plántulas, tiempo usual para el trasplante, hasta completar las 540 lecturas con el SPAD-502 y el mismo número de determinaciones con espectrofotómetro. La superficie de cada hoja fue higienizada antes de cada medición. Las lecturas de respuesta de la clorofila se realizaron con seis equipos de medición tipo SPAD portátil (SPAD-502, Minolta Camera Co., LTD Osaka, Japón), con los cuales se midieron y registraron lecturas puntuales e instantáneas. Posteriormente, los discos-muestra de hojas sanas fueron extraídos, los cuales se depositaron en bolsas estériles de polietileno y éstas a su vez en cajas de poliuretano con hielo para su traslado y manejo en laboratorio. Las lecturas y las muestras de la hoja utilizada para la determinación de la clorofila de la sección útil de las placas germinadoras (excluyendo líneas de orilla y barreras) fueron medidas entre 08:00 y 10:00 am. Los discos de 1.3 cm de diámetro por hoja fueron seccionados con un horador, homogeneizado en frío, en 20 mL de acetona acuosa al 80 % (Moran R 1982. *Plant Physiology* 69:1376-1381) y fueron transportados en hielera portátil al laboratorio. Las suspensiones de la clorofila fueron mantenidas en oscuridad hasta su lectura con un espectrofotómetro (Unicon, Cambrige Spectronic, UK). La absorbancia fue medida entre 645 y 663 nanómetros. El contenido de clorofila total fue determinado por el método de Arnon (Arnon DJ 1949. *Plant Physiology* 24:1-15) y fue comparado con las lecturas de SPAD.

Un análisis de regresión fue aplicado con el método de mínimos cuadrados de Pearson para determinar la relación numérica-funcional entre las variables 'reactancia de la clorofila' o 'Spad' como la variable independiente 'x' y el contenido de clorofila total por el método destructivo como la variable dependiente 'y'. Por su parte, el análisis de correlación se realizó para determinar el grado de asociación entre las mencionadas variables (Daniel WW 2004. *Bioestadística*. Limusa Wiley). El análisis de regresión lineal fue realizado empleando el programa

Tabla 1. Análisis de varianza y contraste de medias (CE) para clorofila total, según la variación experimental de la salinidad (CE, en dS m^{-1}). (Variable dependiente: clorofila total; factor de variación: CE; número de observaciones = 540; número de niveles de CE = 6).

Table 1. Analysis of variance and contrast of averages (CE) for total chlorophyll, according to the experimental variation of salinity (EC, in dS m^{-1}). (Dependent variable: total chlorophyll; variation factor: CE; number of observations = 540; number of CE levels = 6).

Fuente	Sumas de Cuadrados	gl	Cuadrados Medios	F	p
Entre grupos	493.09	5	98.61	927.64	0.0001
Intra grupos	56.77	534	0.106		
Total (Corregido)	549.86	539			
CE	Observaciones	Medias	Grupos homogéneos		
10	90	1.851	a		
8	90	2.23	b		
6	90	2.56	c		
4	90	2.93	d		
0	90	3.6	e		
2	90	4.73	f		

Statistica v. 6 (Anónimo 2006. Statistica. StatSoft, Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto principal sobre la clorofila total fue causado por CE (Figura 1); en virtud de que AH no ejerció efectos estadísticamente significativos, dicho factor fue descartado de análisis posteriores. La relación del contenido extraíble de la clorofila de la hoja, entre las lecturas de SPAD y los datos de clorofila obtenidos en laboratorio fue cuadrática (Tabla 1). Los resultados obtenidos son comparables a los reportados por otros autores (Dwyer LM, Tollenaar M, Houwing L 1991. Can. J. Plant Sci. 71: 505-509-, Himelrick DG, Wood CW, Dozier Jr WA 1992. Adv. Strawberry Res. 11: 59-61; Murillo-Amador B, Ávila-Serrano NY, García-Hernández JL, López-Aguilar R, Troyo-Dieguez E, Kaya C 2004. J. Plant Nutr. Soil Sci. 167:1-2). La medida *in situ* del contenido de clorofila de la hoja en albahaca con el medidor SPAD-502 mostró una alta correlación con la obtenida mediante el procedimiento del espectrómetro. Por lo anterior, este método puede considerarse confiable y recomendable, principalmente cuando debe evaluarse un alto número de muestras, debido a su rapidez, bajo costo y escasa o nula destrucción de hojas de la plántula, además de hacer viable la toma de decisiones inmediatas sobre el estado de sanidad y nutrición de la plántula antes

del trasplante.

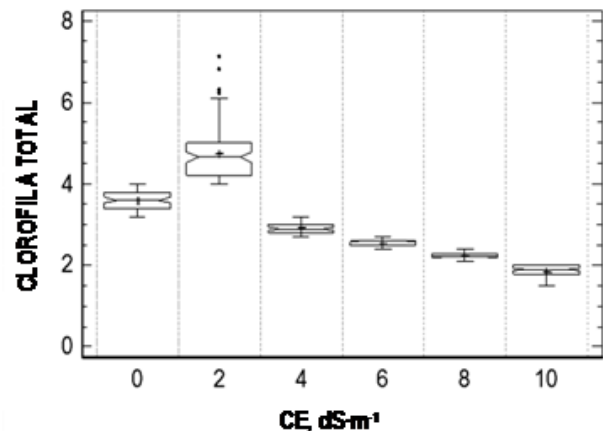


Figura 1. Respuesta de la clorofila total de plántulas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) var. Nuffar, a seis niveles de salinidad expresada como CE (dS m^{-1}).

Figure 1. Response of total chlorophyll in basil seedlings (*Ocimum basilicum* L.) var. Nuffar, at six levels of salinity expressed as EC (dS m^{-1}).

Lo anterior se infirió independientemente del tipo de tratamiento al que esté sujeta la plántula, lo cual se derivó a partir de la serie de ensayos realizados en el presente trabajo, toda vez que se analizaron plántulas sometidas a diversos niveles de salinidad y dosis de ácido húmico en el sustrato, se tomaron en cuenta las unidades experimentales testigo (solamente con agua con solución nutritiva estándar).

Tabla 2. Resultados del análisis de varianza de la regresión y correlación. ($R^2 = 99.854\%$; R^2 (ajustado para gl) = 99.85% ; error estándar de los estimados = 0.038 ; error absoluto medio = 0.029).

Table 2. Results of the analysis of variance for regression and correlation. ($R^2 = 99.854\%$; R^2 (adjusted for df) = 99.85% ; standard error of estimates = 0.038 ; mean absolute error = 0.029).

Fuente	Sumas de Cuadrados	gl	Cuadrados Medios	F	p
Modelo	536.59	2	268.3	178863.3	0
Residuo	0.79	537	0		
Total (Corregido)	537.38	539			

Los efectos de la salinidad fueron significativos sobre la clorofila total ($F = 927.64$; $p < 0.001$) (Tabla 1). Al contrastar las diferencias entre medias con la DMS de Fisher (Daniel WW 2004. Bioestadística. Limusa Wiley) se aceptó 1% de riesgo de error al considerar cada par de medias como significativamente diferentes.

Para el uso del medidor SPAD-502 con la finalidad de determinar el contenido de clorofila de plántulas de albahaca variedad Nuffar, fue necesario contar con una curva de calibración como la expuesta (Figura 2) o bien la correspondiente ecuación generada:

$$\text{Clorofila Total} = 1.70 - 0.065 \text{ SPAD} + 0.005 \text{ SPAD}^2$$

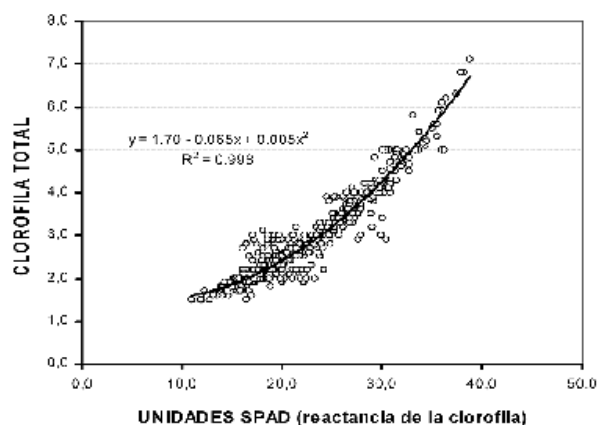


Figura 2. Predicción de clorofila total de plántulas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) var. Nuffar, determinada con lecturas del SPAD-502 y calibrada por extracción y análisis en espectrofotómetro. Línea continua: modelo de regresión cuadrática con $R^2_{ajust.} = 0.998$ para IC=99%. Puntos: valores observados. y: clorofila total; x: unidades SPAD.

Figure 2. Prediction of total chlorophyll in basil seedlings (*Ocimum basilicum* L.) var. Nuffar, determined through SPAD-502 readings and calibrated by spectrophotometric extraction and analysis. Continuous line: quadratic regression model with $R^2_{adj.} = 0.998$ for IC = 99%. Points: observed values. y: total chlorophyll; x: SPAD units.

Los resultados mostraron alta correlación entre el método destructivo y el no destructivo (análisis de regresión y correlación; $r = 0.999$; $p < 0.001$), lo cual se observa en el concentrado de datos del análisis de varianza de la regresión y correlación (Tabla 2). El estudio confirmó la utilidad y conveniencia de usar la técnica de SPAD para la determinación no destructiva del contenido de la clorofila en la hoja de albahaca, principalmente cuando una alta cantidad de muestras o una población considerable debe ser analizada.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (Programa de Agricultura de Zonas Áridas), la Universidad Autónoma de Baja California Sur (Programa Promep) y la Fundación Produce Baja California Sur, A.C. Los autores agradecen a los técnicos del Laboratorio de Fisiología Vegetal del CIBNOR, Carmen Mercado y Lidia Hiraes, por las facilidades brindadas.