

利用葉綠素計量測菊花葉片之老化¹

許謙信²、Jeff G. Atherton³, Peter G. Alderson³

摘 要

本試驗之目的在建立以葉綠素計推估菊花葉綠素含量之方法，以應用於觀測切花老化過程中葉片黃化現象，並作為篩選品種之工具。葉綠素計量測之SPAD值與可萃取葉綠素含量之間，不論以葉面積或鮮重計算均有顯著相關。菊花在25°C黑暗中誘導不同老化階段之葉片，其SPAD值與比色定量分析法之葉綠素含量為線性迴歸。以葉面積計算，其決定係數 $R^2=0.820$ ，以葉鮮重計算，其決定係數 $R^2=0.660$ 。以具有不同深淺綠色葉片之18個品種，SPAD讀值及葉綠素含量之線性迴歸分析，以葉面積及鮮重計算，其決定係數 R^2 分別為0.795及0.635。觀察三個菊花品種葉圓片在黑暗中，6個不同溫度下之SPAD值變化，溫度愈高，SPAD下降之速度愈快。測試了18個品種在25°C黑暗中SPAD值變化。其SPAD初始值分別自42.0至60.8之間，培養8天後，SPAD下降速度最快者為‘青心黃’，迴歸係數為-6.51，下降速度最慢者為‘阿來粉’，迴歸係數為-2.13。高葉綠素含量之品種到達黃化(約為SPAD=30)之日數較長(相關係數 $r=0.662$)。同時，葉片之黃化亦與葉綠素崩解之速率有關(相關係數 $r=0.718$)。在育種上，葉片葉綠素含量與其喪失速率二者均應做為選拔品種之指標。

關鍵字：菊花、葉片老化、SPAD、葉綠素崩解。

前 言

葉綠素的變化用於觀察很多的生理現象。然而破壞性的定量分析方法不利於連續性的觀察⁽¹⁾。非破壞性的葉綠素計之量測值因其與葉綠素含量的高度相關，可作為田間之量測儀器，用於觀察葉綠素之變化^(19,20,33)，特別是用來估計氮素的營養狀態^(5,17,28,29)、栽培環境之影響^(3,12,13)、葉片之老化^(4,7,26)、及品種比較^(17,29,33)，已廣泛應用於試驗及實際栽培。

溫度常為菊花葉片老化之致命因子^(6,21,25)。葉片之老化為切花壽命長短判別之指標之一，其早期徵兆多為葉片之黃化，即葉綠素之喪失⁽¹⁵⁾。溫室栽培之菊花，若在高溫30°C以上，會發生下部葉枯死之現象⁽²¹⁾。菊花切花在20°C及25°C下3週，尚無明顯之老化現象，而在30°C下，葉片則迅速老化⁽⁶⁾。營養生長的盆菊在20°C黑暗中儲藏二天，其葉片品質即降低⁽²⁵⁾。本試驗亦探討溫度對菊花葉片老化之影響。

¹臺中區農業改良場研究報告第 0598 號。

²臺中區農業改良場助理研究員。

³英國諾丁漢大學農業及環境科學系教授、講師。

SPAD葉綠素計已廣泛利用於農藝作物^(7,13,17,32)，蔬菜及水果^(8,12,29,30)之葉片葉綠素含量推估，然而尚鮮少應用於花卉作物上。本試驗之目的在建立以葉綠素計推估菊花葉片葉綠素含量之方法，以其應用於觀測切花老化過程中葉片黃化現象⁽¹⁵⁾，並作為篩選品種之工具。

材料與方法

一、試驗材料

菊花之扦插及幼苗種植於1999年一月至六月於英國諾丁漢大學溫室，於下午5:00至夜間11:00間及清晨5:00至8:00間，進行夜間電照，電照之最低光度為50 lux。溫室內控制於日溫25℃，夜間20℃。幼苗摘心後，留下一新枝條以備試驗。摘心後植株經營養生長3週後，開始採取展開葉，葉序為第11至16片，進行試驗。

二、葉綠素計

葉綠素計(SPAD-502 Chlorophyll meter, Minota Co. Ltd., Japan)使用二個波長用於量測綠色及估算葉綠素含量變化，儀器使用二個LED，一為波峰於650 nm，另一為紅外光940 nm⁽²⁰⁾。

三、葉綠素定量分析

一或二片葉片鮮重約0.5 g，稱重後以光投射葉面積儀量測其葉面積。以液態氮於研鉢中粉碎組織，加入10 ml 80%丙酮研磨均質，萃取色素後，溶液倒入試管中，以3000 rpm離心15分鐘後收集上層液。以10 ml 80%丙酮再萃取一次，混合二次萃取液定量100 ml，以80%丙酮調整零點及滿點後，讀取A633及A645之吸光度⁽¹⁾。

代入公式求取葉綠素量

$$\text{每平方公尺葉綠素含量(mg)} = (20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}) \times (V(\text{ml}) / 1000 \times A(\text{m}^2))$$

A為葉片組織之葉面積，單位為m²。

V為葉綠素80%丙酮之抽出液體積，本試驗為100 ml。

$$\text{每克鮮重葉綠素含量(mg)} = (20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}) \times (V(\text{ml}) / 1000 \times W(\text{g}))$$

W為葉片組織之鮮重，單位為g。

四、葉片老化過程葉綠素喪失之SPAD量測值與葉綠素含量之迴歸分析：

採取菊花品種'Reagan'之葉片，分別於第3、6、9、12天將葉片採下，每次4重覆，共16個樣品，每樣品二片葉片，葉柄置於有水之試管中，保持葉片水分，置於25℃黑暗之培養箱，於第15天全部取出量測葉片SPAD值，同時進行葉綠素定量分析。SPAD之量測，每片葉片讀取3次，每重覆讀取二片葉片，6個觀測值平均為一重覆。進行葉綠素定量分析前，事先量測葉片之鮮重及葉面積，並分別以重量及葉面積計算葉綠素含量，並與SPAD量測值做迴歸分析。

五、不同品種之SPAD量測值與葉綠素含量之迴歸分析

18個菊花品種之葉片，每品種採取一至二葉片，稱重約0.5 g，量測葉面積，依上述方法量測SPAD值，進行葉綠素定量分析，每品種二重覆，共36個樣品，計算不同品種SPAD量測值與葉綠素含量之迴歸分析。

六、溫度對葉片老化之影響

採取菊花‘黑小菊’、‘黑心黃’、‘紅哈雷’等三品種展開葉，以蒸餾水清洗後以9 mm打孔器，切取葉圓片，葉圓片置於培養皿中，葉面向上，墊以濾紙每日加些許蒸餾水，維持葉片水分，放於不同溫度下，每日量測SPAD讀值。試驗使用3個品種，每個培養皿放入18個圓片，分為6小區，每小區3個圓片，試驗共6個溫度，分別為12、15、19、23、28、33℃，每個溫度放置3個培養皿，每個品種共6個重覆。觀察SPAD之日變化，並以SPAD對日數作迴歸分析，以推估SPAD減少之日變化曲線。

七、不同品種之葉綠素含量及老化過程中葉綠素之喪失

18個菊花品種，如上述試驗，切取9 mm葉圓片，置於25℃黑暗下培養，量測其SPAD初始值及每日SPAD變化至第8天，每個培養皿放置18個圓片，分為6小區，每區3個圓片，每3個圓片之SPAD平均值為一重覆，每品種6重覆。以SPAD對日數作迴歸線，以推估SPAD減少之日變化曲線，比較不同品種SPAD值減少之趨勢。

八、含莖段葉片對葉片老化之影響

採取菊花‘Reagan’品種之帶葉柄葉片或含葉片之單節莖段，插於裝水之試管中，保持葉片水分，置於25℃，黑暗或1500 lux日光燈下，試驗包括二種植物材料(帶莖段及不帶莖段之葉片)及二種環境(黑暗及照明)，共四個處理，每處理5重複。每日量測SPAD讀值，方法如上述試驗。觀察各處理之葉片黃化過程。

結 果

一、葉片老化過程葉綠素喪失之SPAD量測值與葉綠素含量之迴歸分析

菊花之離體葉片在25℃黑暗下放置3至12天後，其SPAD值於31.4至55.3之間，隨著黑暗培養之時間延長，SPAD值漸次下降，可以得到不同SPAD值之葉片樣品，以SPAD值與比色定量分析法之葉綠素含量做線性迴歸分析，結果如下：

以葉面積為含量計算基礎，其迴歸方程式為(圖一)：

$$\text{葉綠素含量(mg/m}^2\text{)}=12.5 \times \text{SPAD值}-68.0, \text{ 決定係數}R^2=0.820 (P<0.001)$$

以鮮重為含量計算基礎之結果，其迴歸方程式為：

$$\text{葉綠素含量(mg/g鮮重)}=0.0381 \times \text{SPAD值}+0.0666, \text{ 決定係數}R^2=0.660 (P<0.001)$$

以葉面積計算者其決定係數較以鮮重計算者為高。

二、不同品種之SPAD量測值與葉綠素含量之迴歸分析

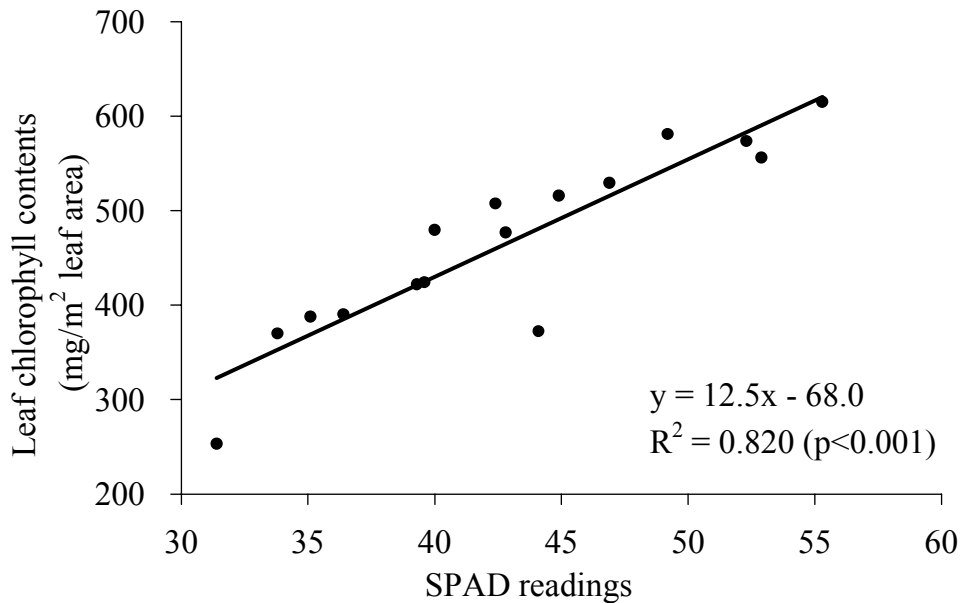
以具有不同深淺綠色葉片之18個品種，進行SPAD讀值及葉綠素含量之線性迴歸分析，結果如下：

以葉面積為含量計算基礎得到之迴歸方程式為(圖二)：

$$\text{葉綠素含量(mg/m}^2\text{)}=10.7 \times \text{SPAD值}-19.5, \text{ 決定係數}R^2=0.795 (P<0.001)$$

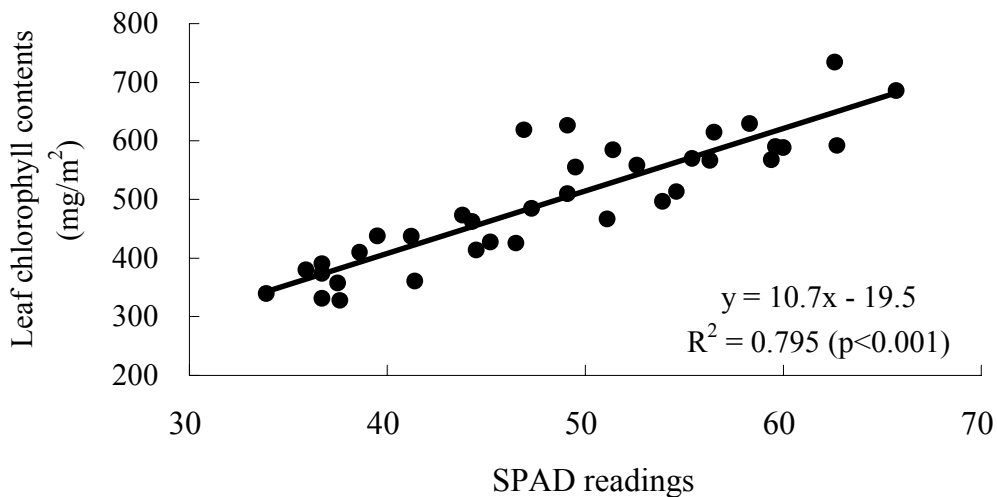
以鮮重為葉綠素含量計算基礎得到之迴歸方程式為：

$$\text{葉綠素含量(mg/g鮮重)}=0.0356 \times \text{SPAD值}+0.113, \text{ 決定係數}R^2=0.635 (P<0.001)$$



圖一、菊花‘Reagan’品種葉片於 25°C 黑暗老化過程中葉綠素計 SPAD 讀值與葉綠素定量分析之迴歸分析。

Fig. 1. Linear regression relationship between the chlorophyll meter readings and extracted chlorophyll determined by spectrophotometry for leaf senescence of ‘Reagan’ chrysanthemum induced in 25 °C in the dark.

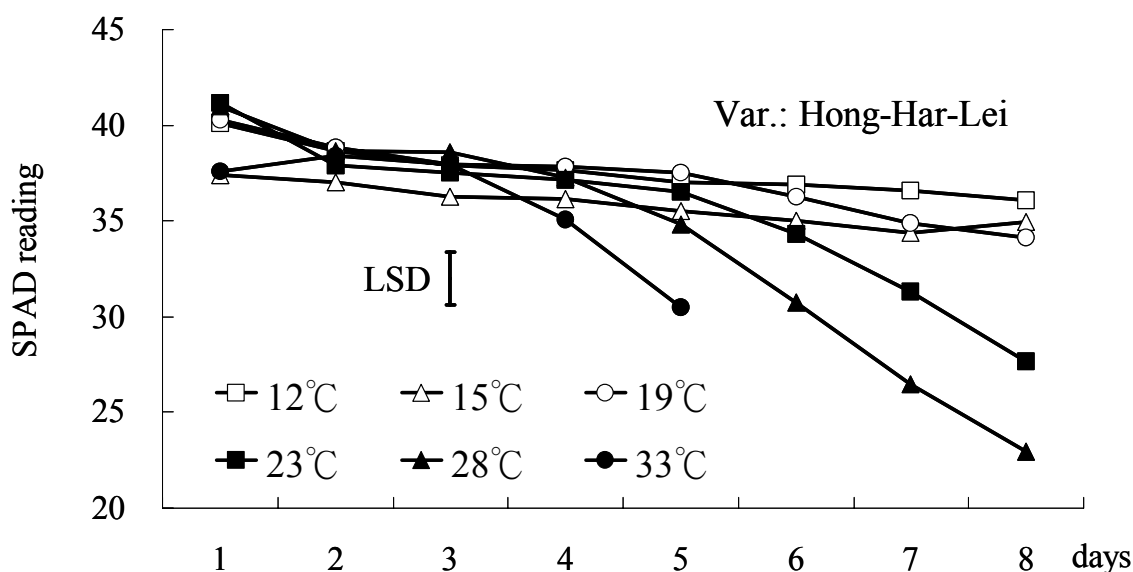


圖二、菊花 18 個品種葉片葉綠素計 SPAD 讀值與葉綠素定量分析之迴歸分析。

Fig. 2. Linear regression relationship between the reading of SPAD-502 chlorophyll meter and extracted chlorophyll determined by spectrophotometry for 18 chrysanthemums.

三、溫度對葉片老化之影響

觀察三個菊花品種葉圓片在黑暗中，6個不同溫度下之SPAD值變化，其中‘紅哈雷’品種之結果如圖三。以33°C下，SPAD值下降最快，至第5天已至30以下，而後因組織潰爛，無法再進行量測，28°C及23°C之處理，SPAD值隨培養日數增加而漸次下降，溫度愈高，下降之速度愈快。12°C、15°C及19°C等三個處理，培養8天，SPAD下降10~20%，葉圓片仍能維持綠色，內眼無法辨視與剛培養時之差別。其餘二品種亦有類似趨勢。



圖三、菊花紅哈雷品種葉片於黑暗中六個溫度下 SPAD 讀值之日變化

Fig. 3. Daily changes of SPAD readings of 'Hong-Har-Lei' chrysanthemum leaves incubated in 6 temperatures in the dark.

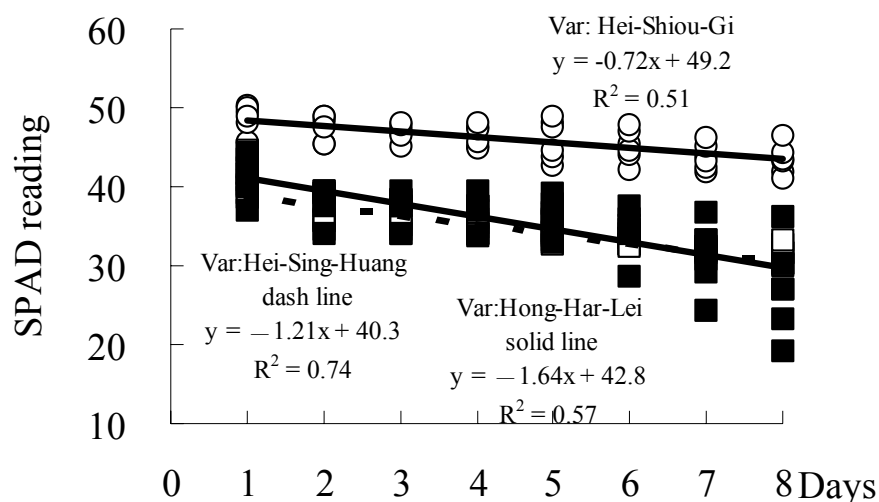
圖四為‘黑小菊’、‘黑心黃’及‘紅哈雷’三個品種於28°C黑暗中SPAD之日變化對培養日數做迴歸分析，三個品種SPAD之下降趨勢大致上為直線關係。其中以黑小菊之初始SPAD值最高，而SPAD減少之斜率，即迴歸係數，為-2.08，為最低。其他二品種之SPAD初始值與迴歸係數均很接近，但其SPAD初始值較‘黑小菊’低，而下降速率較高。不同品種之SPAD初始值與日變化有差異。

表一列出三個品種在19、23、28、33°C等四個溫度下之SPAD減少之迴歸方程式，愈低之溫度其迴歸係數愈小，即SPAD下降斜率愈小。不論在任何溫度下，以‘黑小菊’之葉綠素崩解速率最小。

四、不同品種之葉綠素含量及老化過程中葉綠素之喪失

為了進一步了解品種間對葉綠素崩解之差異，本試驗測試了18個品種。其SPAD初始值分別自42.0至60.8之間，在25°C黑暗中培養8天後，各品種之SPAD值對培養日數之迴歸方程式如表二。SPAD下降速度最快者為‘青心黃’，迴歸係數為-6.51，下降速度最慢者為‘阿來粉’，

迴歸係數為-2.13。根據迴歸方程式推算出各品種SPAD下降至30所需日數(肉眼可辨視黃化)，最快者為小乒乓，可維持2.6天，最慢者為‘阿來粉’，可維持10.7天。



圖四、菊花 3 個品種葉片於 28°C 黑暗中每日 SPAD 讀值迴歸分析。

Fig. 4. Linear regression relationship for daily SPAD reading of 3 chrysanthemums in 28°C in the dark.

表一、菊花 3 個品種葉片於不同溫度黑暗中每日 SPAD 讀值之線性迴歸分析

Table 1. Linear regression relationship for daily SPAD changes of 3 chrysanthemums in 4 temperatures in the dark

Variety	Temperature treatment	Regression equation Y = r.e. X days +	R-squarac	P value
Hei-Shiou-Gi	19°C	Y = - 0.65x + 49.7	0.46	p<0.001
	23°C	Y = - 0.72x + 49.2	0.51	p<0.001
	28°C	Y = - 2.08x + 54.8	0.64	p<0.001
	33°C	Y = - 2.14x + 53.0	0.63	p<0.001
Hei-Sing-Huang	19°C	Y = - 0.75x + 39.4	0.49	p<0.001
	23°C	Y = - 1.21x + 40.3	0.74	p<0.001
	28°C	Y = - 2.40x + 44.6	0.84	p<0.001
	33°C	Y = - 3.15x + 46.5	0.84	p<0.001
Hong-Har-Lei	19°C	Y = - 0.81x + 40.9	0.46	p<0.001
	23°C	Y = - 1.64x + 42.8	0.57	p<0.001
	28°C	Y = - 2.53x + 45.2	0.75	p<0.001
	33°C	Y = - 2.25x + 43.2	0.68	p<0.001

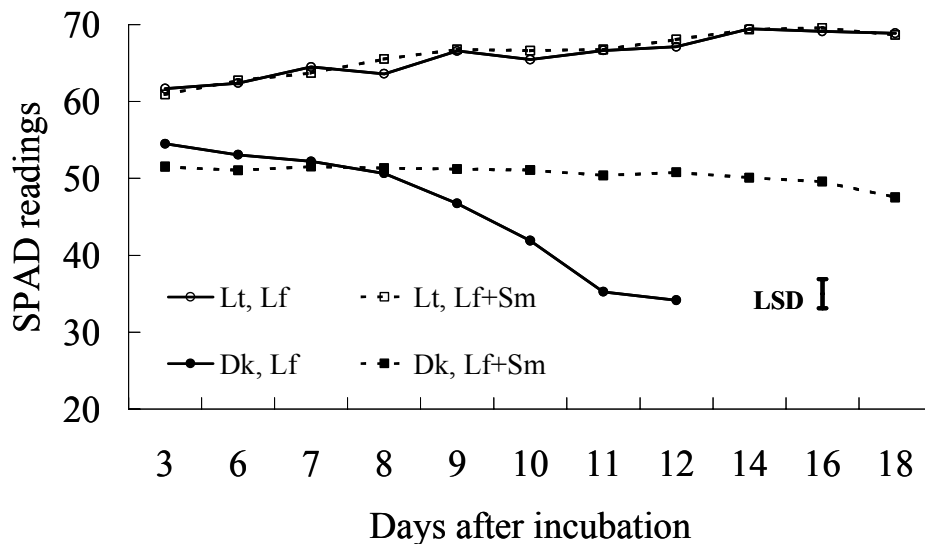
表二、菊花 18 個品種葉片於 25°C 黑暗中 SPAD 初始值、每日 SPAD 讀值迴歸分析及預測葉片黃化日數

Table 2. Initial SPAD, regression equation of daily SPAD, and estimated days to SPAD 30 of 18 chrysanthemums.

Variety	Initial SPAD reading	Regression equation	R-square	p value	Estimated days to SPAD 30
Ho-Lan-Bai 316	60.8±0.7	Y = -3.55x + 60.8	0.70	p<0.001	8.7
Chau-Din-Yu 324	58.1±1.9	Y = -4.67x + 58.4	0.83	p<0.001	6.1
Cho-Lin 148	57.5±1.5	Y = -3.33x + 58.0	0.79	p<0.001	8.4
Chun-Ze-Wan 33	56.9±1.3	Y = -2.81x + 57.8	0.74	p<0.001	9.9
Huang-Gin-Ye 335	55.0±1.1	Y = -6.21x + 56.2	0.86	p<0.001	4.2
Tao-Gi 318	53.1±1.8	Y = -3.49x + 53.6	0.86	p<0.001	6.8
Gin-Fon-Cher 322	53.1±1.3	Y = -2.53x + 55.0	0.73	p<0.001	9.9
Ar-Lai-Feng 331	52.8±2.2	Y = -2.13x + 52.8	0.77	p<0.001	10.7
Chin-Sing-Huang 319	52.5±2.3	Y = -6.51x + 54.4	0.89	p<0.001	3.7
Gi-Siang-Feng 287	52.0±0.8	Y = -3.58x + 52.7	0.78	p<0.001	6.3
Hong-Kon-Chei 282	51.7±1.7	Y = -3.42x + 51.5	0.81	p<0.001	6.3
Hong-Mei-Reng 332	50.3±1.5	Y = -2.68x + 49.7	0.79	p<0.001	7.4
Hei-Siou-Gi 232	49.3±2.3	Y = -3.58x + 50.7	0.88	p<0.001	5.8
Hua-Se-Gie 377	48.5±1.6	Y = -2.77x + 46.2	0.62	p<0.001	5.8
Hon-Fon-Cher 326	45.7±2.1	Y = -3.31x + 44.4	0.73	p<0.001	4.4
Chai-Hon 334	45.5±1.1	Y = -3.83x + 45.7	0.83	p<0.001	4.1
Siou-Pin-Pang 261	43.0±1.8	Y = -4.92x + 43.0	0.85	p<0.001	2.6
Hong-Har-Lei 328	42.0±1.4	Y = -4.51x + 43.8	0.89	p<0.001	3.1

五、含莖段葉片對葉片老化之影響

為減少創傷對黑暗中誘導葉片老化時之影響，利用整片葉片進行觀察，同時了解莖段對黑暗中葉片老化之影響，其結果如圖五。於黑暗中之葉片，培養至第8天後，SPAD值迅速下降，至第12天，全葉黃化，然而在有莖段上之葉片則維持至第18天。葉片仍維持綠色，莖內之貯藏物質會延緩葉片之老化。在有1500 lux光線的情況下，至第18天，不論含有莖段與否，葉片仍維持綠色，SPAD值會上升。



圖五、菊花 Reagan 品種含莖段葉片或切離葉片在 25°C 黑暗或光照下之 SPAD 日變化。
Fig. 5. Daily SPAD changes of leaf attached on one node or single detached leaf of 'Reagan' chrysanthemum in 25°C in the dark or light.

Lt: incubation in the light, 1500 lux. Dk: incubation in the dark.

Lf: detached single leaf. Lf + Sm: one leaf on single node stem.

討 論

本試驗使用葉綠素計來量測葉色，以便觀察菊花葉片老化時葉綠素崩解之連續過程。葉片 SPAD 讀值及葉綠素含量二者之關係，以黑暗中葉片老化過程，及品種間葉綠素含量差異等二個試驗，來測試其關聯性。結果如諸多研究之建議^(19,20,33)，SPAD 讀值可用來推估葉片之葉綠素含量，作為簡便之量測工具。

定量分析之葉綠素含量有以葉面積及鮮重為基礎之兩種計算方法，本試驗之 R^2 值在老化試驗分別為 0.820 (圖一) 及 0.660，在品種試驗分別為 0.795 (圖二) 及 0.635，以葉面積計算在迴歸分析之決定係數較以鮮重計算者高，此與 Azia 及 Stewart 所作之結果相似⁽⁸⁾。其次，在諸多不同試驗間決定係數之高低差異，可能之影響原因有樣品之基因型歧異度^(19,29,30,33)、栽培之環境^(3,12,32)、葉脈之多寡⁽²⁰⁾、光的穿透、分佈及散光等⁽²⁰⁾。本試驗以 18 個品種作迴歸分析，因不同基因型之葉片組織及葉綠素分佈可能有差異，而影響決定係數之大小。於老化之試驗中，在黑暗之環境中適應不同天數，環境之改變可能亦會對迴歸分析之結果有影響。另外在統計上，自變數 (SPAD 值) 之區間會影響決定係數之大小，較窄範圍之自變數其決定係數可能較小⁽²⁾，本試驗之 SPAD 區間較諸多試驗為小^(5,19,20)，此與 Wu 等分別於棉花不同生長時期，葉綠素含量變化區間小之情況下所得之結果類似⁽³²⁾。

葉片之老化受溫度之影響，菊花切花枝之花及葉在30°C下快速老化，但在較低的溫度下，老化之速度較慢⁽⁶⁾。菊花盆花的品質亦受貯藏時之高溫所影響，高溫縮短觀賞壽命⁽²⁵⁾。本試驗之結果顯示在黑暗中，溫度對菊花葉圓片老化現象之影響，與植株上之反應類似，高溫加速了老化之速率(圖三)。同時，品種間對不同溫度下老化之速率差異甚大(表一)。利用本試驗之方法，以簡便集約的方式在實驗室大量篩選品種，為育種選拔上可以考慮的工具。

切離植物體之葉圓片用來觀察很多種植物之老化，葉綠素變化為其中之一項指標^(14,23,27)。然而離體之葉圓片，割傷可能是一個主要誘導老化之因子，創傷引起的乙烯扮演加速老化的過程⁽²³⁾。本試驗除了觀察葉圓片外，亦進行整片葉片之離體觀察，以減少割傷引起之影響(圖五)。

在黑暗引起的老化基因研究上有二個假說：在阿拉伯芥，於離體或附體之葉片上，有一個黑暗誘導之老化基因，在自然老化之葉片上亦有很強之表現⁽²²⁾；亦有研究顯示，有另一個離體葉片於黑暗誘發之老化基因，於附體葉片之自然老化上僅有些微之mRNA改變⁽⁹⁾。目前沒有菊花葉片在黑暗中誘導老化之資料，必須進一步了解菊花葉片黑暗下誘導之老化及植株上自然老化之關係，以建立更可靠之研究及應用工具。

對於菊花葉片葉綠素崩解之量化觀測與瓶插壽命間之關係，目前尚無資料可供參考。然而，具有高葉綠素含量及維持力的聖誕紅品種，經證實在弱光下之室內觀賞壽命較長⁽¹⁴⁾。本試驗之結果可以看出參試品種之葉片老化時，葉綠素之喪失速率與葉片原有之葉綠素含量無關(相關係數 $r=0.068$)。然而高葉綠素含量之品種到達黃化(約為SPAD=30)之日數仍較長(相關係數 $r=0.662$)。同時，葉片之黃化亦與葉綠素崩解之速率有關(相關係數 $r=0.718$)。在育種上，葉片葉綠素含量與其喪失速率二者均應做為選拔品種之指標。

菊花插穗之儲藏後品質與品種含有之碳水化合物多寡有關，含量高者儲藏後品質較佳⁽²⁴⁾。切花或盆花含有之碳水化合物為採收後維持生理作用之能量來源^(6,31)，外加蔗糖常能延長切花之瓶插壽命⁽¹⁶⁾。玉米之葉片老化時，葉綠素含量與葉片含有之可溶性碳水化合物成正相關⁽²⁶⁾。然而，在菊花不同品種之比較上，是否亦存在此一關係則尚不明瞭。低葉綠素崩解速率之品種，是否因其含有之碳水化合物高，呼吸作用低，或其他生理作用所影響，需要進一步之試驗了解。

另一方面，在含有莖段之葉片，其葉片黃化比單獨葉片為遲，莖段可延緩老化現象(圖五)。在小麥及玉米，遭逢逆境時，莖段之儲藏物質作為補償葉片光合作用能力降低後之生長能量，同時減低可能發生之提早老化現象^(10,11,34)。莖段之碳水化合物供源，有延緩葉片老化之重要角色。然而，在有花、莖、葉的切花枝上，各器官間之供源積儲(source-sink)關係，則需要更進一步之探討。

菊花葉片之黃化為瓶插壽命之重要指標⁽¹⁵⁾，然而菊花葉片之老化現象尚未獲得育種家足夠之重視⁽¹⁸⁾。根據本試驗之結果，葉綠素計之SPAD值可用來觀測菊花葉片老化過程中的葉綠素崩解，這個方法可用於實驗室之離體葉片、葉圓片，將來並可以應用於了解環境因素及

栽培技術對田間作物或切花葉片老化之影響，同時，可應用於育種時，篩選葉綠素含量高及其崩解速度慢之品種。

誌 謝

本文稿之完成承楊嘉凌先生提供迴歸分析統計程式及黃素青小姐之打字協助，特此致謝。

參考文獻

1. 王月雲、陳是瑩、童武夫 1990 葉綠素的吸收光譜與定量測量 植物生理學實驗(再版) p.93-95. 藝軒圖書出版社 臺北。
2. 沈明來 1997 簡單直線迴歸與簡單相關 生物統計學入門(二版) p.253-302. 九州圖書 臺北。
3. 吳俊偉 2003 環境綠化植物耐陰性指標之研究 國立臺灣大學園藝研究所碩士論文 p.91。
4. 紀銘坤 2003 茉莉酸甲酯與乙烯對芥藍苗切離葉片黃化之影響 國立臺灣大學園藝研究所碩士論文 p.86。
5. 鍾翊爛、張育森 2003 氮肥施用對地毯草生育之影響與應用葉綠素計於氮素狀態診測之探討 中國園藝 49:361-374。
6. Adachi, M., S. Kawabata and R. Sakiyama. 1999. Changes in carbohydrate content in cut chrysanthemum [*Dendranthema X grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] 'Shuho-no-chikara' stems kept at different temperatures during anthesis and senescence. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 68:505-512.
7. Adamsen, F. J., P. J. Jr. Pinter, E. M. Barnes, R. L. LaMorte, G. W. Wall, S. W. Leavitt and B. A. Kimball. 1999. Measuring wheat senescence with a digital camera. *Crop Science.* 39:719-724.
8. Azia, F. and K. A. Stewart. 2001. Relationships between extractable chlorophyll and SPAD values in muskmelon leaves. *J. Plant Nutrition.* 24:961-966.
9. Becker, W. and K. Apel. 1993. Differences in green-expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta* 189:74-79.
10. Blum, A. 1998. Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica* 100:77-83.
11. Blum, A., B. Sinmena, J. Mayer, G. Golan and L. Shpiler. 1994. Stem reserve mobilization supports wheat-grain filling under heat stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 21:771-781.
12. Campbell, R. J., K. Mobley, R. Marini and D. Pfeiffer. 1990. Growing condition alter the relationship between SPAD-501 values and apple leaf chlorophyll. *HortSci.* 25:330-331.
13. Earl, H. J. and M. Tollenaar. 1997. Maize leaf absorbance of photosynthetically active radiation and its estimation using a chlorophyll meter. *Crop Sci.* 37:436-440.

14. Embry, J. L. and E. A. Nothnagel. 1994. Leaf senescence of postproduction poinsettias in low-light stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:1006-1013.
15. Halevy, A. H. and S. Mayak. 1979. Senescence of postharvest physiology of cut flower, part 1. *Hort. Rev.* 1:204-236.
16. Kofranek, A. M. and A. H. Halevy. 1972. Conditions for opening cut chrysanthemum flower buds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97:578-584.
17. Ladha, J. K., A. Tirol-Padre, G. C. Punzalan, E. Castillo, U. Singh and C. K. Reddy. 1998. Nondestructive estimation of shoot nitrogen in different rice genotypes. *Agronomy J.* 90:33-40
18. Langton, F. A. and K. E. Cockshull. 1976. An ideotype of chrysanthemum (*C. Morifolium* Ramat.). *Acta Hort.* 63:165-175.
19. Marquard, R. D. and J. L. Tipton. 1987. Relationship between extractable chlorophyll and an in situ method to estimate leaf greenness. *HortSci.* 22:1327.
20. Monje, O. A. and B. Bugbee. 1992. Inherent limitation of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. *HortSci.* 27:69-71.
21. Nishio, J. and M. Fukuda. 1984. Effects of high day temperatures before and after flower bud initiation on the growth and flowering of chrysanthemums grown with artificial lighting. *Research Bulletin Aichi Ken Agricultural Research Centre* 16:173-177.
22. Oh, S. A., S. Y. Lee, I. K. Chung, C. H. Lee and H. G. Nam. 1996. A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Mol. Bio.* 30:739-754.
23. Philosophhadas, S., S. Meir and N. Aharoni. 1991. Effect of wounding on ethylene biosynthesis and senescence of detached spinach leaves. *Physio. Plant.* 83:241-246.
24. Rajapakse, N. C., W. M. Miller and J. W. Kelly. 1996. Low-temperature storage of rooted chrysanthemum cuttings: relationship to carbohydrate status of cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:740-745.
25. Rajapakse, N. C., D. W. Reed and J. W. Kelly. 1991. Storage-temperature and duration affect quality and post-storage recovery of vegetative *Dendranthema X gandiflorum* *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116:73-76.
26. Rajcan, I. M., L. M. Dwyer and M. Tollenaar. 1999. Note on relationship between leaf soluble carbohydrate and chlorophyll concentration in maize during leaf senescence. *Field Crop Research* 63:13-17.
27. Rodoni, S., M. Schellenberg and P. Matile. 1998. Chlorophyll breakdown in senescing barley leaves as correlated with phaeophorbide a oxygenase activity. *J. Plant Physio.* 152:139-144.

28. Rodriguez, I. R. and G. L. Miller. 2000. Using a chlorophyll meter to determine the chlorophyll concentration, nitrogen concentration, and visual quality of St. Augustinegrass. HortSci. 35: 751-754.
29. Sandoval-Villa, M., E. A. Guertal and C. W. Wood. 2000. Tomato leaf chlorophyll meter readings as affected by variety, nitrogen form, and nighttime nutrient solution strength. J. Plant Nutrition. 23: 649-661.
30. Schaper, H. and E. K. Chacko. 1991. Relation between extractable chlorophyll and portable chlorophyll meter readings in leaves of eight tropical and sub-tropical fruit-tree species. J. Plant Physio. 138:674-677.
31. Trusty, S. E. and W. B. Miller. 1991. Postproduction carbohydrate levels in pot chrysanthemum. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116:1013-1018.
32. Wu, F., L. Wu and F. Xu. 1998. Chlorophyll meter to predict nitrogen sidedress requirements for short-season cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Field Crops Research 56:309-314.
33. Yadava, U. L. 1986. A rapid and nondestructive method to determine chlorophyll in intact leaves. HortSci. 21:1449-1450.
34. Zinselmeier, C., M. J. Lauer and J. S. Boyer. 1995. Reversing drought-induced losses in grain yield: sucrose maintains embryo growth in maize. Crop Sci. 35:1390-1400.

Using Chlorophyll Meter to Investigate the Leaf Senescence of Chrysanthemum¹

Chian-Shinn Sheu², Jeff G. Atherton³ and Peter G. Alderson³

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the relationship between extractable chlorophyll and SPAD readings in chrysanthemum leaves. Chlorophyll breakdown during leaf senescence was measured by chlorophyll meter, SPAD-502, and diversity of chlorophyll declination was evaluated among varieties.

SPAD readings were significantly related to extracted chlorophyll of chrysanthemum leaves both on a fresh weight and leaf area basis. The linear regression relationship between the SPAD readings of leaves in different stage of senescence induced in 25°C in the dark and chlorophyll contents analysed by spectrophotometry was described. The R² value for total chlorophyll on a leaf area basis was 0.820, while on a fresh weight basis was 0.660. The SPAD readings of 18 varieties with different greenness and their extractable chlorophyll contents were also correlated. The R² of linear regression equation on a leaf area basis was 0.795, while on a fresh weight basis was 0.635.

Senescence of leaf discs of three varieties in 6 temperatures in the dark was investigated. The higher the temperatures, the faster the SPAD readings declined. Initial SPAD of 18 chrysanthemums were between 42.0 and 60.8. The speeds of chlorophyll declination in 25°C in the dark among 18 varieties were calculated by regression analysis. The highest speed was SPAD -6.51 daily, and the lowest speed was -2.13. The estimated days to leaf yellowing of 18 varieties was correlated with the initial SPAD readings ($r=0.662$) and with declining speeds ($r=0.718$) of chlorophyll breakdown. It was suggested that chlorophyll content and its declination of leaf could be a selecting indicator of breeding program.

Key word: chrysanthemum, leaf senescence, SPAD, chlorophyll breakdown.

¹ Contribution No. 0598 of Taichung DARES, COA.

² Assistant Horticulturist of Taichung DARES, COA.

³ Former Reader and Lecturer of Division of Agriculture and Environment Science, University of Nottingham, UK.