

兩種速測法在果樹葉片葉綠素含量測定之應用¹

張致盛、張林仁²

摘 要

傳統的葉綠素測量方法較費工且過程複雜。為尋找簡易、非破壞性的果樹葉片葉綠素含量速測法，本試驗以色差儀(ZE 2000)及葉綠素計(SPAD-502)進行芒果、荔枝及梨葉片葉綠素之測量，並與利用丙酮萃取量比較。結果以色差儀及葉綠素計測值與丙酮萃取量分析比較，其迴歸方程式皆呈二次效應，決定係數都高於0.75，且葉綠素計測值決定係數都高於色差儀。色差儀(a*/b*)²值及葉綠素計讀值與丙酮萃取量比較，決定係數分別為芒果0.88及0.94、荔枝0.93及0.97和梨0.75及0.92。由本試驗之結果，利用葉綠素計及色差儀作為非破壞性估算葉片葉綠素含量時，應考量葉片情形，並以不同生長階段之葉片作檢量線以提高準確性。

關鍵字：葉綠素含量、色差儀、葉綠素計。

前 言

植物葉片葉綠素含量與其氮含量的狀態、RuBP羧化酵素(carboxylase)活性及光合成速率等有關⁽¹¹⁾。此外當植物受到逆境時會降低葉綠素含量⁽⁵⁾，Thompson等人調查'Zinfandel'葡萄受空氣污染傷害時，葉片葉綠素含量由48.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 降至28.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ⁽¹⁴⁾，因此葉片葉綠素含量亦可作為植物生理狀況之指標。

葉綠素含量之測量傳統都以研磨組織萃取或不經研磨僅以溶劑萃取^(2,4,9,14)，所利用的萃取溶液包括丙酮^(1,2)、乙醇⁽⁵⁾、DMF(*N,N*-dimethylformamide)⁽⁹⁾及DMSO(dimethyl sulphoxide)⁽⁴⁾等。由於許多果樹葉片為革質或葉表有絨毛，以溶劑萃取費工而且需較久的時間，通常約需1~3日^(4,5,9)，而因試驗取樣摘除葉片，可能改變植株的生長及發育，影響隨後調查的準確性。

近來被用以進行非破壞性葉綠素含量速測法之儀器有葉綠素計(chlorophyll meter)及色差儀(color meter)。Yadava以葉綠素計(SPAD-501)測量22種植物的葉綠素含量，與以丙酮萃取研磨比較得到之相關係數為0.692⁽¹⁵⁾；Singha及Townsend以可攜帶式色差儀(tristimulus colormeter)測量蘋果、葡萄及桃葉片色彩(chromaticity)值(L*a*b*)，與利用DMF萃取24小時比較，決定係數(R²)分別高達0.9、0.96及0.88⁽¹³⁾。顯然葉片未經研磨及溶劑萃取，利用非破壞性測量，亦可估算其葉綠素含量，但相同的測量會因儀器⁽⁶⁾、季節⁽¹²⁾及作物種類^(12,13,14)而有很大的差異。本試驗分別利用色差儀(ZE 2000型)與葉綠素計(SPAD-502)測量，探討其測量芒果、荔枝及梨等果樹葉片葉綠素含量，並與丙酮萃取法比較其間之關係。

¹ 台灣省台中區農業改良場研究報告第 0464 號。

² 台中區農業改良場助理研究員。

材料及方法

材料及調查方法

採取台農一號芒果、黑葉荔枝及橫山梨完整無病蟲害的葉片，包括正展開嫩葉(folding leaf)、剛發育完整葉片(newly well-developed leaf)及成熟葉(matured leaf)等三種發育階段的葉片各20片，分別以色差儀(color meter, Nippon Denshoku Industries Co., LTD. Toyko, Japan, 產品型號ZE 2000, 以儀器所附黑板及標準值 $X=94.34$ 、 $Y=92.35$ 、 $Z=110.89$ 之白板校正)測量葉上固定區域4點之 a^* 、 b^* 值之平均為該葉片之觀測值，隨後再以可攜帶式葉綠素計(portable chlorophyll meter, Minolta Corp., 型號SPAD-502, Ramsry, N. J.)測量與色差儀測量相同4點之讀值。

將上述葉片，使用直徑6 mm之圓孔打孔器取下色差儀及葉綠素計測量相同位置之葉圓片12片，面積共 3.39 cm^2 ，加入80%丙酮3 ml，在冰浴下研磨至殘渣無綠色為止，稀釋後再經Whatman No.1濾紙過濾後，定量至10 ml，以分光儀(spectrophotometer, HITACHI U-3000型)測量663nm及645nm之吸光值。

計算及統計方法

利用色差儀求得同一葉片4點之 a^* 、 b^* 值平均得一葉片之觀測值後，參考Marquard及Tipton所提出之方法，求得 $(a^*/b^*)^2$ 之值⁽⁷⁾。以丙酮為溶劑研磨方法之葉綠素含量計算係參考Argon⁽²⁾及王等⁽¹⁾所述，葉綠素總量(mg) = $(20.2A_{645} + 8.02A_{663}) \times 10 \text{ ml} / 1000 \times A$ (面積)公式，求得葉綠素含量，所得結果再換算為 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之量。

以色差儀測得值換算為 $(a^*/b^*)^2$ 值與葉綠素計讀值，求三種不同發育階段各20片葉與丙酮萃取葉綠素量間決定係數(coefficient of determination)，並以SAS(SAS Institute, Cary, N. C.)程式進行顯著性分析(PROC GLM, SAS Version 6.01)後，再以Sigma Plot程式(Version 3.0)計算三種果樹60片葉片之迴歸方程式並繪圖。

結 果

不同生育階段各20片葉片丙酮萃取葉綠素含量與色差儀及葉綠素計讀值分析結果如表一。比較三種不同生育階段葉片丙酮萃取葉綠素含量與色差儀測得之 $(a^*/b^*)^2$ 值間決定係數，以荔枝成熟葉之0.79最高，其次為剛發育完整葉片之0.58。葉綠素計測值與丙酮萃取量之決定係數較高者亦為荔枝成熟葉之0.56，其他不同生育階段葉片，以丙酮萃取葉綠素量與兩種儀器測定值間決定係數都較低。

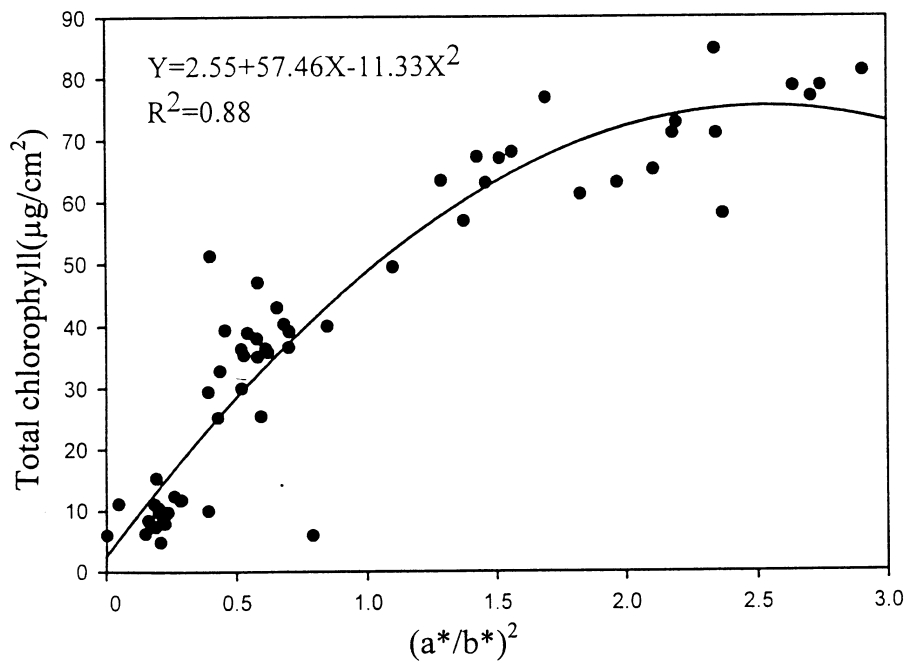
表一、果樹不同生育階段葉片以 80%丙酮研磨萃取葉綠素量與色差計(a*/b*)² 值及葉綠素計讀值間之決定係數

Table 1. R² between chlorophyll content extracted with 80% acetone to (a*/b*)² value and chlorophyll meter reading in different development stages of fruit leaves

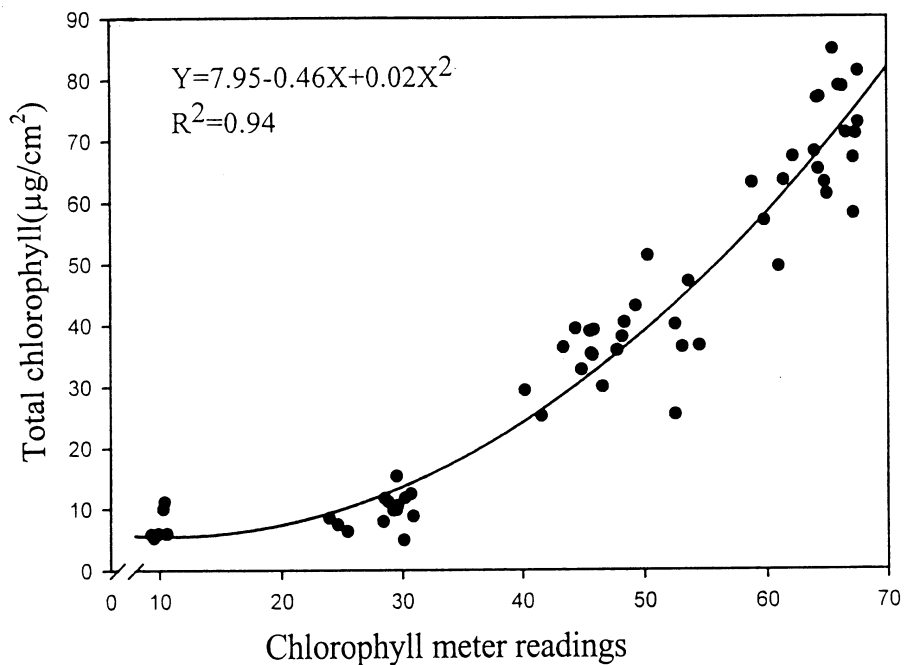
| | Leaf development stage | (a*/b*) ² | Chlorophyll meter reading |
|--------|------------------------|----------------------|---------------------------|
| Mango | Folding | 0.01 | 0.21 |
| | Newly well-developed | 0.05 | 0.17 |
| | Matured | 0.51 | 0.21 |
| Litchi | Folding | 0.10 | 0.10 |
| | Newly well-developed | 0.58 | 0.23 |
| | Matured | 0.79 | 0.56 |
| Pear | Folding | 0.11 | 0.41 |
| | Newly well-developed | 0.12 | 0.16 |
| | Matured | 0.01 | 0.34 |

各種果樹不同生育階段共60葉片以丙酮所萃取葉綠素含量與兩種儀器迴歸分析如圖一~圖六。芒果葉片以色差儀測得換算之(a*/b*)²值、葉綠素計讀值與丙酮萃取葉綠素量迴歸分析如圖一及圖二，迴歸方程式為 $Y(\text{葉綠素總量})=2.55+57.46X[(a*/b*)^2]-11.33X^2[(a*/b*)^2]^2$ 及 $Y(\text{葉綠素總量})=7.95-0.46X(\text{SPAD讀值})+0.02X^2(\text{SPAD讀值})$ ，決定係數為0.88及0.94，葉綠素含量約介於4-75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之間。荔枝葉片分析結果如圖三及圖四，色差儀及葉綠素計與丙酮萃取量之函數關係分別為 $Y=0.22+66.93X-16.22X^2$ 及 $Y=10.0-0.43X+0.02X^2$ ，決定係數為0.93及0.97，葉片葉綠素含量亦介於4-75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之間。梨葉片以色差儀(a*/b*)²值與丙酮萃取量迴歸分析如圖五，一次式與二次式皆達顯著水準，一次式之決定係數為0.53，二次函數關係為 $Y=-11.96+141.41X-16.72X^2$ ，決定係數為0.75；葉綠素計讀值與丙酮萃取葉綠素量分析如圖六，二次方程式 $Y=14.68-0.71X+0.04X^2$ ，決定係數為0.92。

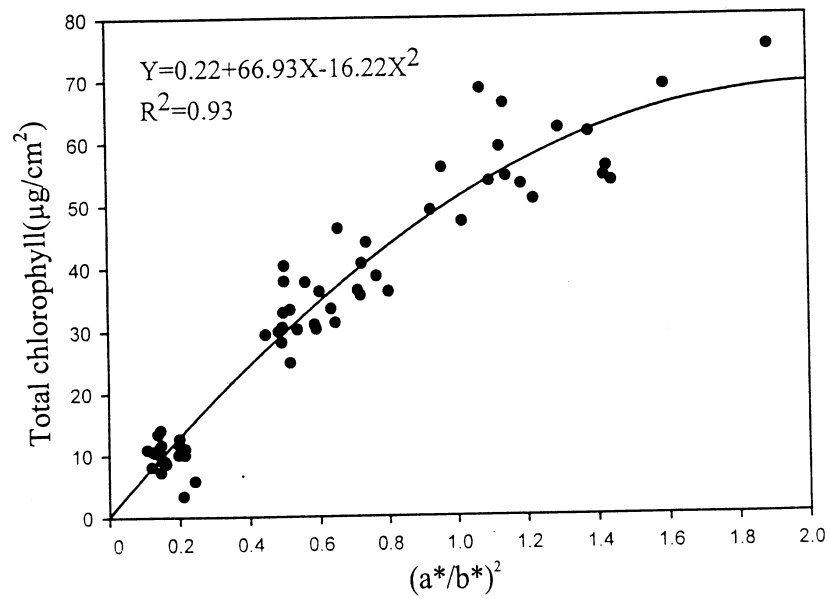
比較分析結果由圖一至圖六皆呈二次效應。由圖形分析，當隨葉綠素含量越高時，色差儀測得之色差值換算(a*/b*)²後增加值越大，而葉綠素計讀值則相反，當葉綠素含量較低時，葉綠素計讀值增加較多，當葉綠素含量越高時，則增加呈平緩趨勢。



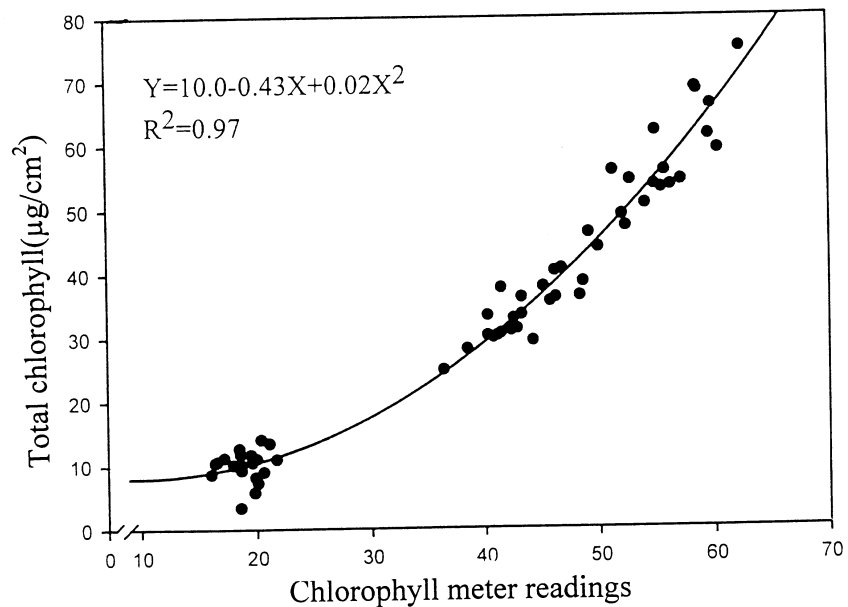
圖一、丙酮萃取芒果葉片葉綠素含量與色差儀測量(a*/b*)²值之相關圖。
Fig. 1. Relationship between acetone extractable chlorophyll and (a*/b*)² values measured from mango leaves.



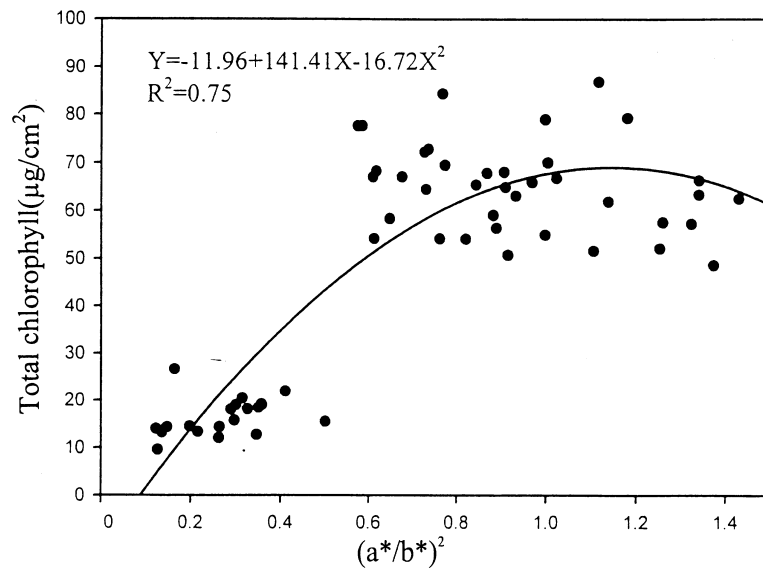
圖二、丙酮萃取芒果葉片葉綠素含量與葉綠素計(SPAD-502)讀值之相關圖。
Fig. 2. Relationship between acetone extractable chlorophyll and chlorophyll meter(SPAD-502) readings measured from mango leaves.



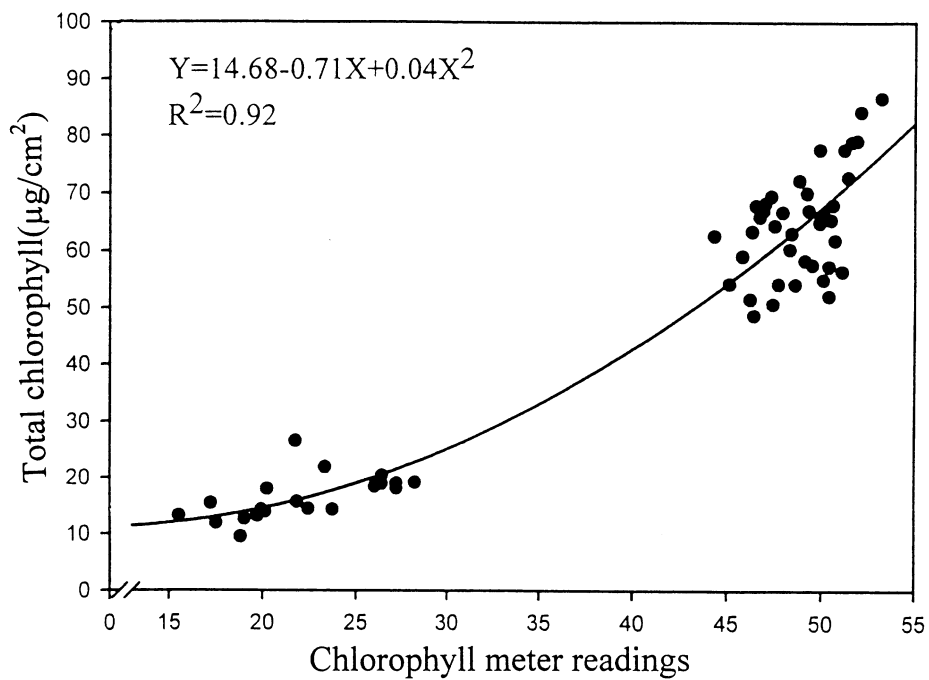
圖三、丙酮萃取荔枝葉片葉綠素含量與色差儀測量(a*/b*)²值之相關圖。
Fig. 3. Relationship between acetone extractable chlorophyll and (a*/b*)² values measured from litchi leaves.



圖四、丙酮萃取荔枝葉片葉綠素含量與葉綠素計(SPAD-502)讀值之相關圖。
Fig. 4. Relationship between acetone extractable chlorophyll and chlorophyll meter(SPAD-502) readings measured from litchi leaves.



圖五、丙酮萃取梨葉片葉綠素含量與色差儀測量 $(a^*/b^*)^2$ 值之相關圖。
Fig. 5. Relationship between acetone extractable chlorophyll and $(a^*/b^*)^2$ values measured from pear leaves.



圖六、丙酮萃取梨葉片葉綠素含量與葉綠素計(SPAD-502)讀值之相關圖。
Fig. 6. Relationship between acetone extractable chlorophyll and chlorophyll meter(SPAD-502) readings measured from pear leaves.

討 論

Fanizza等人以葉綠素計(SPAD-502)測量葡萄葉片在乾旱逆境處理後之讀值，與溶劑萃取所得之葉綠素含量呈線性相關⁽³⁾，因而認為葉綠素計可作為葡萄品種耐旱性選拔之工具。顯示非破壞性的葉綠素速測法適用於估算植物葉片之葉綠素含量。而Marquard及Tipton以二部同型之可攜帶式葉綠素計(SPAD-501)測相同之材料，所得讀值並不相同。在12種材料與用DMF萃取30小時後與二部葉綠素計讀值之比較，其 r^2 (linear relationship)介於0.827~0.969之間⁽⁷⁾，由此可知，進行非破壞性葉綠素速測法應考量作物及儀器所產生之誤差。

本試驗三種材料不同生育階段各20片葉片，以二種方法所得之值與丙酮萃取量比較分析，除荔枝成熟葉外，其他之比較決定係數都相當低(表一)，顯然利用速測法應以不同生長階段之葉片以得到較正確的檢量線(calibration curve)，否則可能影響所換算之葉綠素含量之值。Monje及Bugbee⁽⁶⁾以及Fanizza等人⁽³⁾認為葉脈或葉綠素分佈不平均，都會影響以光學儀器作非破壞性葉綠素速測法之準確性，雖然本試驗測量時已避開葉片主要葉脈，但可能嫩葉因葉綠素分佈較不均勻，因而受到的影響較大，以致在嫩葉速測法與丙酮萃取量間決定係數較低(表一)。

比較色差儀與葉綠素計之讀值，葉綠素計在三種果樹所得之讀值與丙酮萃取量分析結果決定係數均較色差儀高，而色差儀在芒果及荔枝與丙酮研磨萃取之比較分別達0.88與0.93，但梨僅有0.75。探討二種方法讀值與丙酮萃取量間決定係數差異之原因，葉綠素計係以紅光(650nm)穿透葉片⁽⁸⁾，除色素分佈不平均或光線穿透性影響準確度外^(3,6)，葉片厚度應不超過1.2mm⁽⁸⁾，由圖二、圖四及圖六上拋的二次函數線性模式，顯然隨芒果、荔枝及梨葉片葉綠素含量增加時(可能葉片變厚或組織間葉綠素累積)，影響紅光之穿透性，因而影響讀值。在Fanizza等人⁽³⁾、Marquard及Tipton⁽⁷⁾、Sibley等人⁽¹²⁾與Yadava⁽¹⁵⁾等利用葉綠素計所進行之試驗，都以一次函數關係說明，僅Monje及Bugbee⁽⁶⁾提出以二次函數關係可能較一次函數關係更適當，而本試驗結果說明葉綠素計讀值與丙酮萃取葉綠素量間應是呈二次效應的函數關係。

色差儀以光線反射之原理，因此葉片厚度、含水量及表面附著灰塵，都會影響其測定值^(6,13)，本試驗測量葉片顏色值，係以CIE (Commission International I'Eclairage) $L^*a^*b^*$ 公式計算⁽¹⁰⁾，根據公式原理當顏色偏綠時 b^* 值變大，因此葉綠素含量增加時 $(a^*/b^*)^2$ 之值變小，因此圖一、圖三及圖五皆呈二次函數關係，但在Singha及Townsend⁽¹³⁾之試驗，並未提出相同的看法。另在本試驗以色差儀色彩值與丙酮萃取葉綠素量間決定係數，芒果($R^2=0.88$)與荔枝($R^2=0.93$)較梨($R^2=0.75$)高，可能是芒果及荔枝葉片表面光滑，而梨葉脈之支脈較為明顯，表面較不規則等表面結構造成之影響。

綜合本試驗之結果，葉綠素計(SPAD-502)讀值及色差儀之 $(a^*/b^*)^2$ 值作葉綠素含量測定，應利用不同生育階段葉片作檢量線，可得到較正確的數值。而二種儀器之方法在測定芒果荔枝及梨之葉片時，所得到的迴歸方程式皆呈二次效應，但在某些狀況，如葉片厚度超過1.2mm、葉綠素含量較高、分佈不均勻或葉表結構不適合等，都會影響估算值之準確性。

參考文獻

- 1.王月雲、陳是瑩、童武夫 1994 葉綠素的吸收光譜與定量測量 In：植物生理學試驗 p:93~95 藝軒圖書出版社 台北。
- 2.Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24:1-15.
- 3.Fanizza, G., L. Ricciardi and C. Bagnulo. 1991. Leaf greenness measurements to evaluate water stressed genotypes in *Vitis vinifera*. Euphytica 55:27-31.
- 4.Hiscox, J. D. and G. F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Can. J. Bot. 57:1332-1334.
- 5.Knudson, L., T. W. Tibbitts and G. E. Edwards. 1977. Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. Plant Physiol. 60:606-608.
- 6.Manje, O. A. and B. Bugbbe. 1992. Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. HortScience 27(1):69-71.
- 7.Marquard, R. D. and J. L. Tipton. 1987. Relationship between extractable chlorophyll and an in situ method to estimate leaf greenness. HortScience 22(6):1327.
- 8.Minolta. 1989. Chlorophyll meter SPAD-502. Industrial meter division. Minolta Corp., Ramsry, N. J.
- 9.Moran, R. and D. Porath. 1980. Chlorophyll determination in intact tissues using *N*, *N*-dimethylformamide. Plant Physiol. 65:478-479.
- 10.Nippon Denshoku. 1994. ZE-2000 color meter user's manual. Nippon Denshoku Industries Co., LTD. Toyko, Japan.
- 11.Seemann, J. R., T. D. Sharkey, J. Wang and C. B. Osmond. 1987. Environmental effects on photosynthesis, nitrogen-use efficiency, and metabolite pools in leaves of sun and shade plants. Plant Physiol. 84:796-802.
- 12.Sibley, J. L., D. J. Eakes, C. H. Gilliam, G. J. Keever, W. A. Dozier, Jr. and D. G. Himelrick. 1996. Foliar SPAD-502 meter values, nitrogen levels, and extractable chlorophyll for red maple selections. HortScience 31(3):468-470.
- 13.Singha, S. and C. Townsend. 1989. Relationship between chromaticity values and chlorophyll concentration in apple, grape, and peach leaves. HortScience 24(6):1034.
- 14.Thompson, C. R., E. H. Hensel and G. Kats. 1969. Effect of photochemical air pollution on Zinfandel grapes. HortScience 4(3):222-224.
- 15.Yadava, U. L. 1986. A rapid and nondestructive method to determine chlorophyll in intact leaves. HortScience 24(6):1449-1550.

Two Rapid Determination Methods for Total Chlorophyll Content in Fruit Tree Leaves¹

Chih-Sheng Chang and Lin-Ren Chang²

ABSTRACTS

The objective of this study was to find a rapid and nondestructive method for determination of chlorophyll in fruit tree leaves using mango, litchi and pear as materials. Two nondestructive measure methods were compared with 80% acetone extraction method. The devices used for nondestructive measurement were color meter (model ZE 2000) and chlorophyll meter (model SPAD-502). The results indicated that the regression models express curve relationship, the chlorophyll meter readings correlated well with acetone extraction method. $R^2 > 0.92$ for mango, litchi and pear leaves. But less the linear relationship was obtained between chromaticity values with color meter and acetone extraction method for pear leaves ($R^2=0.75$). The color meter and chlorophyll meter can be used for the rapid and nondestructive estimation of leaf chlorophyll content *in situ* if the number of sampling leaf is enlarged and the distribution of chlorophyll in leaf is homogenous.

Key words: chlorophyll content, color meter, chlorophyll meter.

¹ Contribution No. 0464 from Taichung DAIS.

² Assitant Pomologist of Taichung DAIS.