

基于分光吸收特性的辣椒叶片叶绿素含量测量方法研究

郭宏亮^{1,2}, 黄 帅¹, 聂楚楚³, 张 悦³, 索玉祥³, 于合龙^{1,2}, 王剑锋^{3*}

(1. 吉林农业大学, 长春 130118; 2. 吉林省精准农业与大数据工程研究中心, 长春 130118; 3. 吉林省蔬菜花卉科学研究院, 长春 130118)

摘要:为了无损、简单、快速、准确估测辣椒叶片叶绿素含量和组成,提升作物的精细管理水平。本文基于辣椒叶片对光的吸收特性,利用光谱透过率通过计算得到叶片的吸光度,使用四阶导数法在640~690 nm波段找到与叶片中叶绿素a和叶绿素b的吸收波峰:649、668、681 nm。参照化学法检测植物叶绿素含量和组成的吸光度法,使用多元线性回归分别建立叶绿素a和叶绿素b含量的检测模型并对比。其中以649、668、681 nm处吸光度建立的模型检测叶绿素a含量的结果最好,测试结果的相对误差(RE)为8.86%,决定系数(R^2)为0.879;以649、681 nm处吸光度建立的模型检测叶绿素b含量的结果最好,测试结果的相对误差(RE)为9.84%,决定系数(R^2)为0.878。

关键词:辣椒;叶绿素检测;四阶导数;吸收光谱;

中图分类号:S641.3

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2021)05-0082-05

Measurement of Chlorophyll Content in Pepper Leaves Based on the Absorption Characteristics of Spectrum

GUO Hongliang^{1,2}, HUANG Shuai¹, NIE Chuchu³, ZHANG Yue³, SUO Yuxiang³, YU Helong^{1,2}, WANG Jianfeng^{3*}

(1. Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. Jilin Precision Agriculture and Big Data Engineering Research Center, Changchun 130118; 3. Jilin Academy of Vegetable and Flower Sciences, Changchun 130118, China)

Abstract: In order to estimate the chlorophyll content and composition of pepper leaves without damage, simply, quickly, accurately and improve the level of crop fine management. In this paper, the absorbance of pepper leaves was calculated by spectral transmittance, the absorption peaks of chlorophyll a and chlorophyll b content in leaves were found at 640~690 nm by fourth order derivative method (649, 668 and 681 nm). The detection models of chlorophyll a and chlorophyll b content were established and compared by using multiple linear regression. The model established by absorbance at 649, 668 and 681 nm had the best results in predicting the content of chlorophyll a. the relative error (RE) of the test results was 8.86%, and the determination coefficient (R^2) was 0.879. The model established by absorbance at 649 and 681 nm had the best results in predicting chlorophyll b content. The relative error (RE) of the test results was 9.84%, and the determination coefficient (R^2) was 0.878.

Key words: Pepper; Chlorophyll detection; Fourth derivative; Absorption spectrum;

叶绿素是绿色植物光合作用中最重要的有机分子和组成叶片叶绿体的重要成分,其含量和组成直接影响植物的生长发育和营养水平^[1],因此叶绿素可直接反映植物营养及生理状态^[2-3]。如

何快速、准确地获得植物叶绿素含量和组成,对于监测植物长势、指导生产等方面具有重要意义。采用化学分析法虽然可以准确检测植物叶绿素含量和组成,但检测过程不仅需要破坏叶片,而且费时繁琐,无法做到及时指导生产的需求。同时,叶绿素a和叶绿素b在活体植物叶片中是以蛋白复合物的形式捕获光能进行光合作用^[4]。在不破坏叶片原有结构的基础上,检测叶绿素含量和组成能够更为真实地反映植物的生理状态。光谱检测技术是植物叶绿素含量和组成快速检测的有效方法^[5-10]。在利用光谱技术检测植物的叶绿

收稿日期:2020-02-22

基金项目:吉林省科技发展规划项目(20190301024NY);国家现代农业产业技术体系-特色蔬菜产业技术体系(CARS-24);吉林省科技计划项目(201910193137)

作者简介:郭宏亮(1979-),男,副教授,硕士,主要从事农业信息化、农业物联网和大数据技术研究。

通讯作者:王剑锋,男,博士,副研究员,E-mail: hortwjf@163.com

素含量方面,丁永军等^[11-12]利用番茄叶片的反射光谱提取7个光谱特征参数,建立叶绿素含量预测模型;冀荣华等^[13]利用苹果叶片反射光谱选取敏感波段建立叶绿素和含水率的预测模型;马航^[14]利用东北粳稻的无人机高光谱遥感数据,提取对冠层叶片叶绿素含量的敏感波段建立定量模型;Padilla^[15]研究不同的施氮量对辣椒叶片叶绿素的影响;Timea等^[16]建立成熟期甜椒的总叶绿素和类胡萝卜素的估测模型。上述研究均利用植物反射和透过光谱,基于光谱的分析建立模型,在总叶绿素含量检测中取得良好的应用效果,但却难以实现叶绿素组分含量的直接测量。本研究基于植物叶绿素在640~690 nm波段对光的吸收特性^[17],参照化学法检测植物叶绿素含量和组成的吸光度法,利用透过光谱计算出植物叶片的吸光度,使用四阶导数法^[18]确定其与植物叶绿素含量直接相关的特征波段,基于特征波段处的吸光度进行回归模型的建立,并对回归模型进行了估测误差分析。从而对辣椒叶片叶绿素含量和组成进行无损、简单、快速、准确的检测,准确监控植物的生理状态。

1 材料与方 法

1.1 植物样本的培育

本研究使用辣椒(吉椒16)进行栽培试验,通过控制各试验区的营养液氮元素含量,从而培育出叶绿素含量不同的辣椒叶片作为样本^[19-20]。栽培试验于2019年4~8月在自然光照的环境控制温室进行。将培育好的辣椒苗移栽至温室内5个相同的栽培槽,每个栽培槽内种植16株,栽培基质采用椰糠和珍珠岩以3:1的比例混合均匀的人工基质。温室内的温度和光照用物联网设备进行实时监控并通过放风和遮阳幕进行自动的适度环境调控。

分别对栽培槽内的辣椒苗定期供给5个不同氮元素含量的营养配方,各配方的营养元素浓度见表1。营养液以日本园试配方中的氮元素水平作为标准液,并考虑硝态氮和铵态氮之间的平衡,在保证其他主要元素含量相同的情况下分别增加和减少50%和100%标准液营养液中氮元素含量,共设置 N_0 、 N_{50} 、 N_{100} 、 N_{150} 和 N_{200} 5个不同氮元素营养水平试验区。不同营养液中的各种微量元素含量按照通用配方进行配置,并将pH值调整在6.5~7.5之间。利用定时器和潜水泵自动定时灌溉营养液。

表1 各试验区主要营养元素浓度

元素	主要营养元素浓度(mmol/L)				
	N_0	N_{50}	N_{100}	N_{150}	N_{200}
N	0	3.5	7	10.5	14
P	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
K	3	3	3	3	3
Ca	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75
Mg	1	1	1	1	1

1.2 测量参数与方法

辣椒栽培中的苗期,在每个试验区各选取18片叶片共90个样本进行光谱特性采集,其中70个样本为样本集,20个样本为测试集。为了实验数据的准确性,防止叶片的衰老和含水量的降低对光谱数据的影响^[21],采集时选择性状优异的成熟叶片,并用浸湿的脱脂棉将其叶脉根部包裹,保证叶片的水分和叶绿素活性。光谱特性主要测量了叶片在500~800 nm的透过光谱,并采用化学法测量叶绿素含量和组成。

1.2.1 透过光谱的测量

透过光谱用AVANTES公司生产的光谱仪(型号为AvaSpec-ULS2048XL-EVO)测定,光纤接收端连接余弦校正器,将其固定在暗室内的操作台上保持水平。光源采用可调式标准钨灯光源并在与光纤相接处添加红外光线隔板,控制红外波段对光强的影响以及防止光照过强对叶片的灼伤。将光路垂直于余弦校正器正上方,保持光源与余弦校正器的距离不变,将叶片平铺并紧贴于余弦校正器正上方,使叶片将余弦校正器完全覆盖,测量时封闭暗室的操作窗口,保证暗室内不受其他光源所影响。

测量时,扣除暗光谱的噪音后,直接测量光源的原始光谱,并计算光源的光照强度,将光照强度调整到 $1\ 000\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,步长为1 nm,作为参考光谱并保存至Excel中记作 I_0 ,对待测辣椒叶片按实验设计的方法进行透过光谱测量,每个叶片进行4次测量。

1.2.2 叶绿素含量和组成的测量

称取0.2 g辣椒叶片,避开叶脉剪成细丝放进15 mL试管内,加入10 mL浓度为80%的丙酮溶液后放置于4℃冰箱内黑暗条件下浸提24 h。测量时将提取液摇匀,用80%丙酮溶液做空白,取上清液进行叶绿素含量的测量。叶绿素含量使用紫外分光光度计(METTLER TOLEDO UV5)测定645 nm和663 nm的吸光度后,使用Arnon法修正公式^[22]对叶绿素a和叶绿素b的含量进行计算。

1.3 数据处理及统计分析

70个样本数据代表不同营养状态的辣椒叶片透过光谱。将每个样本的4次测量数据保存到Excel中取平均值,作为该样本的透过光谱,记作I。样本的透过率光谱T计算公式为:

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

吸光度指的是光线通过溶液或某一物质前的入射光强度与该光线通过溶液或物质后的透射光强度比值的以10为底的对数,也就是透过率的以10为底的对数^[23]。本文检测辣椒叶片透过光谱的光路,检测器与叶片之间的距离为0 mm,因此,透过叶片的光可完全由检测器吸收,故使用吸光度计算公式得到的辣椒叶片的吸光度曲线A,可真实反映叶片对光的吸收情况:

$$A = -\lg T \dots\dots\dots (2)$$

每个试验区叶片的吸光度结果取其10个样本的均值,并分析叶绿素在叶片中的强烈吸收波段,使用四阶导数法从混合物光谱中分离被覆盖的波峰,得到叶绿素a和叶绿素b在叶片中的吸收峰位置作为特征波长。利用origin软件对叶片在特征波长的吸光度和其叶绿素a、叶绿素b含量进行相关性分析,并建立相关的线性回归模型。

2 结果与分析

2.1 辣椒叶片吸光度曲线的特征

不同施氮水平下,辣椒叶片在500~800 nm的吸光度曲线的变化趋势基本一致(图1)。叶片的吸光度在680 nm附近为波峰,在550 nm附近为波谷,叶绿素a和叶绿素b的强烈吸收波段在640~690 nm之间;在500~720 nm叶片的吸光度与叶绿素含量正相关。700~800 nm吸光度均在

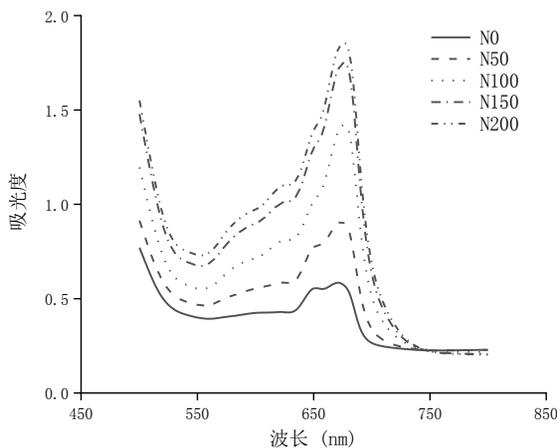


图1 各试验区的平均吸收光谱

0.2左右,且变化幅度较小。

辣椒叶片吸光度曲线特性主要是由叶片的叶绿体色素、蛋白质、水分、糖类、核酸等物质对光波的吸收、反射所引起的^[24]。在500~700 nm波段范围内,叶片的吸光度主要受叶绿体色素影响,叶绿体色素对绿色光的吸收较少,而对红色光有着强烈吸收,从而导致叶片的吸光度曲线在550 nm附近形成吸收波谷,而在680 nm附近形成吸收波峰。辣椒叶片的叶绿素含量随着施氮量的增加而增加,因而叶片对500~700 nm波段的光吸收能力更强,所以辣椒叶片在该波段的吸光度随着施氮量的增加而增加。在近红外波段,辣椒叶片的吸光度曲线特性主要受叶片内的组织和结构影响,叶绿素对其影响较小,叶片对该波段的吸收一般不足20%。

2.2 辣椒叶片吸光度曲线的导数

活体植物叶片中叶绿素a和叶绿素b以蛋白复合物形式存在,因此,吸光度在600~700 nm范围内仅有一个吸收峰存在^[25]。为分别确定叶绿素a和叶绿素b的吸收峰,本研究利用高阶导数法能将重叠的波峰进行分离,从混合物光谱中分离出被覆盖的吸收峰,并且导数光谱曲线仍然满足多元组分光谱之间的线性叠加性^[26]。与过去常用的二阶导数法相比^[27],四阶导数法对分离混合物的重叠峰有更高的分离度和灵敏度^[28]。为分离出叶绿素a和叶绿素b的吸收峰,本研究对辣椒叶片的吸光度曲线进行四阶导数计算,其四阶导数曲线的波峰对应于该波长下某色素分子的吸收峰。利用色素吸收峰作为特征波段可对色素进行初步的定性定量。

使用四阶导数法对叶绿素a和叶绿素b强烈吸收波段(640~690 nm)的吸光度曲线进行处理,分离叶绿素a和叶绿素b重叠的吸收峰,从而更准确地找到叶绿素a和叶绿素b在叶片中吸收光谱的特征波长。对各试验区平均吸收光谱进行四阶导数计算,并用Savitzky-Golay算法对导数光谱进行平滑处理,窗函数所包含的数据点个数为20,多项式回归次数为4(图2)。通过四阶导数法的处理,在640~690 nm波段分离出三个吸收峰:次峰R₁在650 nm附近,首峰R₂在680 nm附近,三峰R₃在670 nm附近。用四阶导数法对样本集70个样本的吸光度曲线进行处理并平均,得到平均四阶导数曲线,对其进行峰值分析,得到三个主要波峰的波长位置(图3),R₁、R₂和R₃的位置分别约为649 nm、681 nm和668 nm。

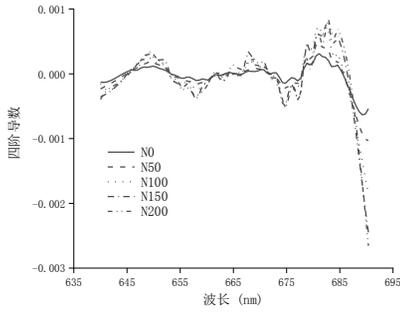


图2 各试验区吸收光谱的微分光谱

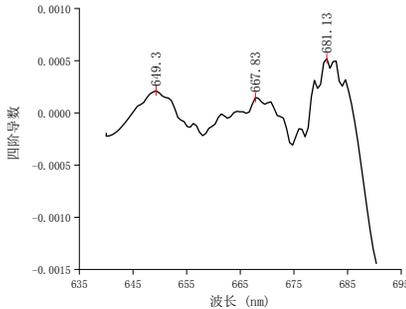


图3 平均导数光谱峰值分析

2.3 使用特征光谱吸光度与叶绿素 a、b 建立线性模型

确定 649、668、681 nm 作为吸光度曲线的特征波长,叶片样本在特征波长位置的吸光度记作 A_1 、 A_2 、 A_3 。利用 A_1 、 A_2 、 A_3 分别建立叶片叶绿素 a 和叶绿素 b 的线性回归估测模型,并用测试集对模型进行检验(表 2)。 A_1 与叶绿素 a 和叶绿素 b 含量模型的决定系数 R^2 为三个参数当中最高 0.875,残差平方和最小; A_2 与叶绿素 a 和叶绿素 b 含量模型的均方根误差最小,但决定系数 R^2 最低。使用测试集对模型进行检验,用测试集叶绿素 a 和叶绿素 b 含量的检测值与实测值进行相对误差的计算。基于 A_3 所建立的模型预测效果最好,相对误差最低。

叶绿素 a 和叶绿素 b 是叶片中最大吸收峰不同的两个组分,次峰 R_1 和首峰 R_2 分别为叶绿素 a 和叶绿素 b 的两个最大吸收峰,三峰 R_3 为受两种不同色素吸收影响的交叉点。使用样本集数据基于朗伯比尔定律的原理进行模型的建立:基于次峰 R_1 和首峰 R_2 所对应的吸光度 A_1 、 A_2 分别与叶绿素 a 和叶绿素 b 的浓度建立二元线性模型(表 3)。表中 C_a 和 C_b 分别为叶绿素 a 和叶绿素 b 的浓度,叶绿素 a 和叶绿素 b 的浓度模型的各项结果均优

表 2 基于 A_1 、 A_2 、 A_3 的叶绿素 a、b 含量线性回归模型结果

吸光度	叶绿素	均方根误差 RMSE	残差平方和 SSE	相对误差 RE (%)	决定系数 R^2	调整决定系数 Adj R^2	自由度 DF
A_1	叶绿素 a	0.634	4.636	12.07	0.875	0.874	70
	叶绿素 b	0.353	1.431	12.61	0.875	0.874	70
A_2	叶绿素 a	0.620	5.001	12.10	0.866	0.864	70
	叶绿素 b	0.344	1.544	12.24	0.866	0.864	70
A_3	叶绿素 a	0.625	4.714	11.39	0.873	0.872	70
	叶绿素 b	0.348	1.455	11.71	0.873	0.872	70

表 3 基于 A_1 、 A_2 、 A_3 的叶绿素 a、b 含量多元线性回归模型结果

模型	均方根误差 RMSE	残差平方和 SSE	相对误差 RE (%)	决定系数 R^2	调整决定系数 Adj R^2	自由度 DF
$C_a=1.39A_1+0.40A_2-0.89$	0.629	4.541	9.52	0.878	0.875	70
$C_b=0.77A_1+0.22A_2-0.49$	0.349	1.402	9.84	0.878	0.875	70
$C_a=2.46A_1+1.76A_2-2.20A_3-0.91$	0.633	4.510	8.86	0.879	0.874	70
$C_b=1.37A_1+0.98A_2-1.22A_3-0.50$	0.353	1.392	11.30	0.879	0.874	70

于基于一个特征光谱吸光度所建立的模型;使用测试集对基于 A_1 和 A_2 所建立的叶绿素 a、b 检测模型进行测试,检测值与实际值的相对误差在 10% 以内,结果优于基于一个特征光谱吸光度所建立的模型。

使用 R_1 、 R_2 和 R_3 三个吸收峰所对应的吸光度 A_1 、 A_2 和 A_3 与叶绿素 a 和叶绿素 b 的浓度建立三元线性模型(表 3);叶绿素 a 和叶绿素 b 的检测模型决定系数 R^2 均为 0.879,叶绿素 a 含量检测模型

的相对误差 RE 为 8.86%, 优于基于 A_1 、 A_2 所建立的叶绿素 a 含量检测模型。

3 结 论

本文以光谱信息获取及分析为主要手段,利用辣椒叶片的透过光谱检测叶绿素含量,该方法操作简单、实用性强、适合各种环境、有效地减少环境对光谱数据的影响。通过四阶导数法对

640 ~ 690 nm 波段辣椒叶片的吸光度曲线进行波峰分离,确定了叶绿素 a 和叶绿素 b 的吸收峰为特征波长。分别使用特征波长处的叶片吸光度建立叶绿素 a 和叶绿素 b 的检测模型,并对模型进行测试和对比:基于 649 nm 和 681 nm 处吸光度建立的二元回归模型在预测叶绿素 b 的结果最优,预测值的相对误差为 9.84%;基于 649、668、681 nm 处吸光度建立的三元回归模型在预测叶绿素 a 的结果最优,预测值的相对误差为 8.86%。两个模型可以为辣椒作物生理状态诊断提供理论依据。

参考文献:

- [1] Blackburn G A. Hyperspectral remote sensing of plant pigments [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(4): 855-867.
- [2] Moran J A, Mitchell A K, Goodmanson G, et al. Differentiation among effects of nitrogen fertilization treatments on conifer seedlings by foliar reflectance: a comparison of methods [J]. *Tree Physiol*, 2000, 20(16): 1113-1120.
- [3] Zhao D, Huang L, Li J, et al. A comparative analysis of broadband and narrowband derived vegetation indices in predicting LAI and CCD of a cotton canopy [J]. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 2007, 62(1): 25-33.
- [4] 潘业兴,王 帅.植物生理学[M].延吉:延边大学出版社, 2016:57-60.
- [5] A W Zulfa, K Norizah, O Hamdan, et al. Discriminating trees species from the relationship between spectral reflectance and chlorophyll contents of mangrove forest in Malaysia [J]. *Ecological Indicators*, 2020, 111: 106024.
- [6] 陈书琳,毕银丽,齐礼帅,等.接种菌根大豆叶绿素含量差异的光谱特征分析[J].*中国矿业大学学报*, 2014, 44(1): 170-175.
- [7] Main R, Cho M A, Mathieu R, et al. An investigation into robust spectral indices for leaf chlorophyll estimation [J]. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 2011, 66(6): 751-761.
- [8] 宋廷宇,何自涵,程 艳,等.菜心叶片 SPAD 值与叶绿素含量的相关性分析[J].*东北农业科学*, 2017, 42(1): 34-37.
- [9] 程 艳,吴春燕,张晓旭,等.薹菜叶片 SPAD 值与叶绿素含量的相关性分析[J].*东北农业科学*, 2018, 43(4): 44-47.
- [10] Yu K, Lenz-wiedemann V, Chen X, et al. Estimating leaf chlorophyll of barley at different growth stages using spectral indices to reduce soil background and canopy structure effects [J]. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 2014, 97: 58-77.
- [11] 丁永军,李民赞,安登奎,等.基于光谱特征参数的温室番茄叶片叶绿素含量预测[J].*农业工程学报*, 2011, 27(5): 244-247.
- [12] 丁永军,李民赞,郑立华,等.基于近红外光谱小波变换的温室番茄叶绿素含量预测[J].*光谱学与光谱分析*, 2011, 31(11): 2936-2939.
- [13] 冀荣华,郑丽华,邓小蕾,等.基于反射光谱的苹果叶片叶绿素和含水率预测模型[J].*农业机械学报*, 2014, 45(8): 269-275.
- [14] 马 航.基于无人机高光谱遥感东北梗稻叶绿素含量监测及建模研究[D].沈阳:沈阳农业大学, 2017.
- [15] Padilla Francisco M, de Souza Romina, Peña-Fleitas M Teresa, et al. Different Responses of Various Chlorophyll Meters to Increasing Nitrogen Supply in Sweet Pepper [J]. *Frontiers in plant science*, 2018, 9: 1752.
- [16] Timea Ignat, Zeev Schmilovitch, József Feföldi, et al. Nonlinear methods for estimation of maturity stage, total chlorophyll, and carotenoid content in intact bell peppers [J]. *Biosystems Engineering*, 2013, 114(4): 414-425.
- [17] Josep Peñuelas, Iolanda Filella. Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status [J]. *Trends in Plant Science*, 1998, 3(4): 151-156.
- [18] 王保宁.导数分光光度法[J].*分析化学*, 1983(2): 149-158.
- [19] 邵兴华,熊佳文,季天委.无土栽培常用营养液及应用综述[J].*东北农业科学*, 2018, 43(2): 40-43.
- [20] 马万征,姚发展,高 蓓,等.不同营养液浓度对温室黄瓜生长发育中氮分配规律的研究[J].*吉林农业科学*, 2015, 40(4): 94-97.
- [21] Rock B N, Hoshizaki T, Miller J R. Comparison of in situ and airborne spectral measurements of the blue shift associated with forest decline [J]. *Remote Sensing of Environment*, 1988, 24(1): 109-127.
- [22] Lichtenthaler H K, Wellbuen A R. Determinations of total carotenoids and chlorophyll a and b leaf extracts in different solvents [J]. *Biochemical Society Transactions*, 1983, 11(5): 591-592.
- [23] Abbas F M Alkarkhi, Wasin A A Alqaraghuli, Yusri Yusup, et al. Data on the absorbance of glucose during the acid hydrolysis of the sugarcane bagasse.[J]. *Data in brief*, 2019, 24: 103894.
- [24] Thomas J R, Oerther G F. Estimating nitrogen content of sweet pepper leaves by reflectance measurements [J]. *Agronomy Journal*, 1972, 64(1): 11-13.
- [25] Yakovlev Andrei, Taisova Alexandra, Arutyunyan Alexander, et al. Variability of aggregation extent of light-harvesting pigments in peripheral antenna of *Chloroflexus aurantiacus*[J]. *Photosynthesis research*, 2017, 133(1-3): 343-356.
- [26] Talsky G. *Derivative Spectrophotometry: Low and Higher Order* [M]. Weinheim: Verlagsgesellschaft, 1994: 10.
- [27] 樊 虎,盛良全,童红武,等.二阶导数同步荧光光谱测定卷烟主流烟气中的苯并(a)芘[J].*光谱学与光谱分析*, 2005, 25(10): 93-95.
- [28] 卢 璐,苏荣国,王修林,等.基于四阶导数的浮游植物叶绿素荧光激发光谱特征研究[J].*光谱学与光谱分析*, 2007, 27(11): 2307-2312.

(责任编辑:王 昱)