

近紅外線分光光度計應用於梨葉片營養診斷

李汪盛、阮素芬、王斐能

摘 要

利用化學方法做梨樹葉片分析之營養評量，可以做為施肥管理之參考。本研究研發之近紅外線分光光度計包括分光光度計（範圍 400–2498 nm）及電腦等設備，可應用於快速梨葉片營養診斷。經由二階差分及三階差分處理後之光譜，再利用部分最小平方法分析，結果顯示，梨葉片 N、P、K、Ca、Mg 校正線，交叉驗證之判定係數（ r^2_{cv} ）分別為 0.848、0.551、0.378、0.794 及 0.709，交叉證標均方根誤差（RMSECV）為 0.066、0.009、0.189、0.099 及 0.026 g/100g。

關鍵詞：近紅外線分光光度計、梨、葉片營養。

前 言

近年來，果樹之栽培技術雖已相當進步，惟農友對於肥培管理仍有不當之處，長期過量施用化學肥料，結果致使果園土壤日漸劣化，影響果實產量及品質甚鉅，且因雨水沖刷，導致河川之污染日益嚴重。國內外有關果樹之土壤與葉片營養診斷方面相關研究成果豐碩，可供運用於葉片及土壤營養診斷^(1-10,12-18)，目前大部分研究採用傳統分析方法，不僅費時、需要投入大量人力與資源且容易造成污染，至於快速檢測方法之開發，雖有簡易的田間快速呈色測氮法應用實例，可以在短時間內（約 5 秒）決定是否需要施用氮肥，惟簡易的田間快速呈色所使用之指示劑原料如二苯胺（Diphenylamine）等，為可燃性之固體，遇熱會釋放出氮氧化物之毒性氣體，為可疑致癌性之芳香胺類，很多國家管制其使用，應用上受到限制。另外，有關利用近紅外光技術應用於營養診斷方面，主要研究以土壤方面為主，至於葉片方面相關研究較少^(19,23-25)，國內外研究人員正積極投入研究，發展準確、即時提供農民葉片營養狀況做為施肥的參考之技術。本研究之目的在於利用近紅外線分光光度計，建立果樹葉片營養成分快速檢測方法，選定梨樹為初步研究之試驗材料，期能適時提供果農施肥之參考。

材料與方法

一、材料

2002 年三至四月於桃園縣新屋鄉 (本場) 所栽種橫山梨之當年生、未結果橫向生長枝的中段葉片為樣本，每株為一樣品，每株依東、南、西、北四個方位肩高處取樣，每株採取葉片 50 片，共計 72 個樣本。

二、分析方法

(一) 近紅外線光譜分析

1. 將梨葉片取回後，以濕巾擦拭去除灰塵及殘留藥劑後置入 70°C 熱風乾燥箱乾燥 48 小時後磨細置入標準容器內，以近紅外線分光光度計進行掃描，掃描波長範圍從 400 到 2498 nm，波長間隔為 2 nm。
2. 每照射二次樣本後，重新取陶瓷白板反射光譜之參考值，以減少基線飄移與溫度變化的誤差影響。
3. 二階差分及三階差分光譜處理：原始光譜利用 Savitsky-Golay 差分法，分別進行 7 點 Savitsky-Golay 二階差分，使用之迴歸多項式為 2 次曲線及 9 點 Savitsky-Golay 三階差分，使用之迴歸多項式為 3 次曲線等前處理，處理後之光譜再利用 PLSR 方法進行回歸分析，建立校正線。

(二) 植物體營養元素分析

梨葉片取回後，以二次蒸餾水濕巾擦拭去除灰塵及殘留藥劑後，置入 70°C 熱風乾燥箱，乾燥 48 小時後，磨細供測。以濃硫酸加硒粉催化劑分解，分解液以 Kjeldahl 法蒸餾測定葉片總氮素含量 (Nitrogen ; N)，以三酸 (硝酸、過氯酸、硫酸 = 4 : 1 : 1 v/v) 分解葉片，鉬黃法測磷 (Phosphorus ; P) 含量，鉀 (Potassium ; K) 用火焰分光光度計測定 (Rage, 1982)，鈣 (Calcium ; Ca)，鎂 (Magnesium ; Mg) 用原子吸光光度計 (AA) 測定⁽¹¹⁾。

(三) 建立梨葉片 N、P、K、Ca、Mg 非破壞檢測模式：將取得梨葉片之光譜與梨葉片化學分析所得到的 N、P、K、Ca、Mg 值，以部分最小平方法 (PLSR) 進行分析，建立近紅外線光譜校正線。其方法敘述如下：

1. 將化學分析值 (參考值) 輸入電腦後，配合已獲得的各波長吸收量值，配合光譜差分等前處理方法，建立校正線。

2. 校正線驗證方式採交叉驗證方式進行，將原校正樣本隨機分為 20 個組，進行交叉驗證，校正線選取的標準以 r 愈接近 1、交叉驗證標準差 (SECV) 之值愈小為主。
3. 若有驗證樣本之成分量測值落在校正範圍以外之值 (Outlier) 時，則將該樣本之量測值加入校正組，重覆以上步驟重新建立校正線。

三、試驗設備

本設備是由分光光度計、控制軟體、控制電腦及不斷電系統等設備組合而成，分述如下：

1. 分光光度計：Foss NIRSystems 6500 (Silver Spring, MD, USA)，波長範圍 400-2498 nm。波長間距 2 nm。
2. 控制軟體：美國 Foss NIRSystems 公司 Vision 軟體。
3. 統計分析軟體：Camo 公司 (Nedre Vollgate, OSLO, Norway) Unscrambler 7.6。
4. 控制電腦：P III 等級個人電腦。
5. 不斷電系統：台灣科風公司智能在線互動式 2000 VA 不斷電系統。

四、有關建立校正線之相關理論

有關建立校正線之基本相關理論如部分最小平方迴歸分析 (Partial Least-Squares Regression; PLSR) 及 PLSR 模式選擇最佳因子的方法，請參考 Marten 及 Naes⁽²²⁾研究，Haaland 及 Thomas⁽²⁰⁾研究。

五、有關性能評估的相關統計定義

下列有關性能評估的相關統計符號說明如下： Y 為校正組之實驗室化學成分分析值， $\hat{Y}$ 為校正線預測值， $\bar{Y}_c$ 為校正組之實驗室化學成分分析值之平均值， $\bar{Y}_p$ 為校正線預測值之平均值， n_{cal} 為校正樣本數目， A 為 PLSR 校正線使用之因子數目。

1. 校正標準偏差(SEC):

$$SEC = \left[\frac{\sum_{i=1}^{n_{cal}} (Y - \hat{Y})^2}{(n_{cal} - A - 1)} \right]^{1/2} \quad (1)$$

2. 交叉驗證標準偏差(SECV):

$$SECV = \left[\frac{\sum_{i=1}^{n_{cal}} (Y - \hat{Y})^2}{(n_{cal} - A - 1)} \right]^{1/2} \quad (2)$$

3. 交叉驗證相關係數(r_{cv}):

$$r = \left[\frac{\sum (\hat{Y} - \bar{Y}_p)^2}{\sum (Y - \bar{Y}_c)^2} \right]^{1/2} \quad (3)$$

4. 交叉驗證判定係數為 r_{cv}^2

5. 交叉驗證之均方根誤差(Root mean square error of cross-calibration ; RMSECV):

$$RMSECV = \left(\frac{\sum_{i=1}^{n_{cal}} (Y - \hat{Y})^2}{n_{cal}} \right)^{0.5} \quad (4)$$

6. 界外值之剔除:

$$(Y - \hat{Y}) > \left(3 \times RMSEC \times \sqrt{\frac{n_{cal} - 1 - A}{n_{cal}}} \right) \quad (5)$$

六、符號說明

1. $D_w(\text{left}, \text{right}, \text{polynomial})$:

D 表示差分法，w 表示差分法之階次，小括號內之 left 代表欲進行差分處理之點左邊使用之點數，right 代表欲進行差分處理之點右邊使用之點數，polynomial 代表使用之迴歸曲線次數，迴歸區間內參與迴歸之點數為 (left + right + 1) 點，如 $D_2(3,3,2)$ 表示為 7 點 Savitsky-Golay 二階差分，使用之迴歸多項式為 2 次曲線， $D_3(4,4,3)$ 表示為 9 點 Savitsky-Golay 三階差分，使用之迴歸多項式為 3 次曲線。

結果與討論

一、梨葉片養分含量分析

校正樣本梨葉片養分含量化學分析相關統計資料，如表 1。N 分佈範圍在 1.210–2.260 g/100g 之間，平均值為 1.921 g/100g，標準偏差為 0.182 g/100g，P 分佈範圍在 0.066–0.357 g/100g 之間，平均值為 0.201 g/100g，標準偏差為 0.042 g/100g，K 分佈範圍在 0.563–2.063 g/100g 之間，平均值為 1.549 g/100g，標準偏差為 0.275 g/100g，Ca 分佈範圍在 0.294–1.525 g/100g 之間，平均值為 0.643 g/100g，標準偏差為 0.230 g/100g，Mg 分佈範圍在 0.094–0.356 g/100g 之間，平均值為 0.239 g/100g，標準偏差為 0.046 g/100g，樣本數為 72 個。

表 1. 梨葉片養分含量

Table 1. Nutrient concentration of pear leaves.

	N (g/100g)	P (g/100g)	K (g/100g)	Ca (g/100g)	Mg (g/100g)
最小值 Minimum	1.210	0.066	0.563	0.294	0.094
最大值 Maximum	2.260	0.357	2.063	1.525	0.356
平均值 Mean	1.921	0.201	1.549	0.643	0.239
標準差 Standard deviation	0.182	0.042	0.275	0.230	0.046
樣本數 Sample size	72	72	72	72	72

二、梨葉片 N、P、K、Ca、Mg 校正線之建立

將近紅外線分光光度計所取得之光譜資料與化學分析資料，以部分最小平方迴歸法 (PLSR) 建立葉片各營養元素之校正線。同時為了節省化學分析所需時間與經費及增加校正樣本數目，驗證部分捨棄一般認為較佳之不同樣本之驗證方式而採用原校正樣本進行驗證，驗證方法為交叉驗證，將所有校正樣本以隨機方式分為 20 個群組，然後進行驗證。

梨葉片校正樣本平均光譜、最大光譜及最小光譜，如圖 1 所示，由圖中可發現波長 400–760 nm 可見光波段，因為葉片粉末顏色差異影響光譜吸收值，此現象主要用於顯示顏色差異而非葉片官能基能吸收值變化量，需捨棄以減低顏色差異所造成之誤差。因此，實際用於建立的梨葉片 N、P、K、Ca、Mg 校正線之光譜波長為 780–2492 nm。另外，由圖 1 中亦可發現，由於葉片粉末粒徑差異產生基線偏移現象，必須加以去除以增加預測性能。圖 2、圖 3、圖 4 分別為梨葉片校正樣本平均光譜之一階差分、二階差分、三階差分圖。由圖 2、圖 3、圖 4 中可發現藉由差分作用可以有效去除原始光譜之基線偏移現象，由圖 2、圖 3、圖 4 可發現可見光波段光譜變化相當不規則，應捨棄 400–778 nm 波段，減少顏色變化產生之影響以提高校正線性能。

梨葉片 N、P、K、Ca、Mg 校正線不同分析方法性能之相關統計資料，列於表 2。經過不同光譜處理，再利用部份最小迴歸分析結果顯示，原始光譜資料利用二階差分或三階差分可以有效克服儀器因為光程差異及表面粗糙度不同引起之基線偏移現象。原始光譜經由不同差分處理，再利用部分最小平方迴歸法分析，結果顯示，梨葉片 N、P、K、Ca、Mg 校正線，交叉驗證之判定係數 (r_{cv}^2) 分別為 0.848、0.551、0.378、0.794 及 0.709，交叉證標均方根誤差 (RMSECV) 為 0.066、0.009、0.189、0.099 及 0.026 g/100g。

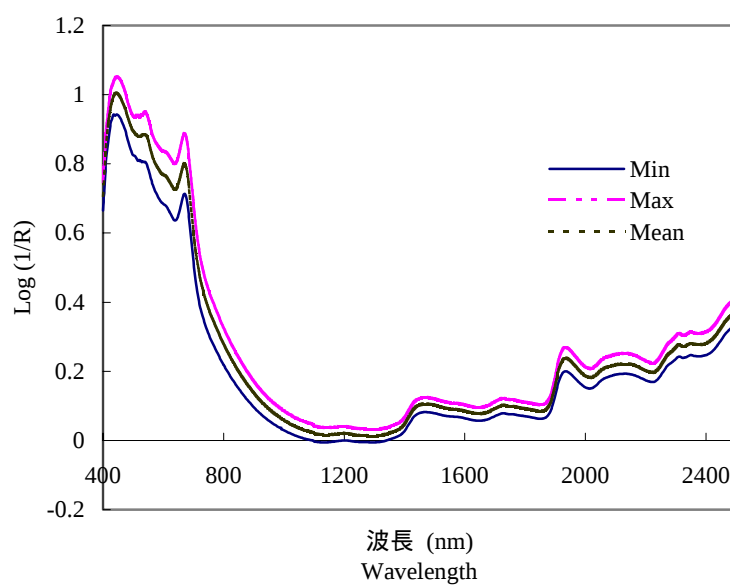


圖 1. 梨葉片平均光譜、最大光譜及最小光譜

Fig. 1. The average, maximum, and minimum spectrum of pear leaves.

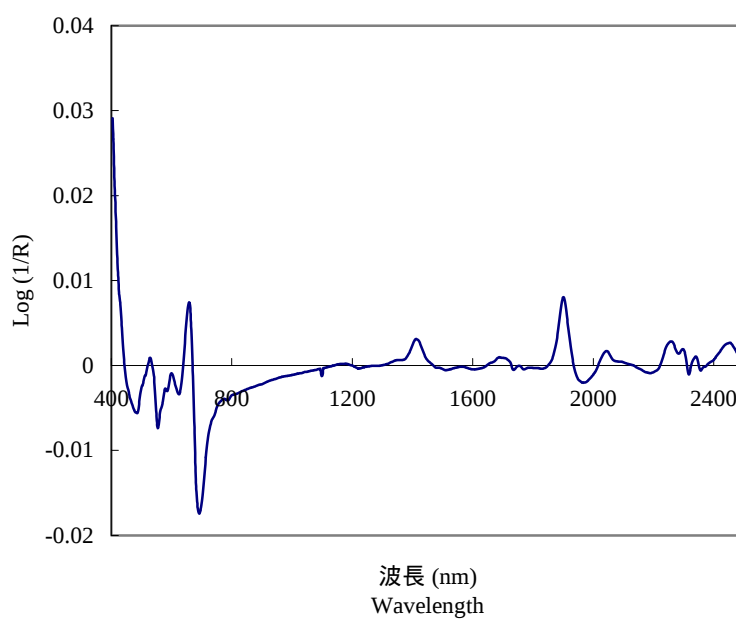


圖 2. 梨葉片平均光譜一階差分吸收光譜圖

Fig. 2. First derivative absorbance spectrum of mean spectrum for pear leaves.

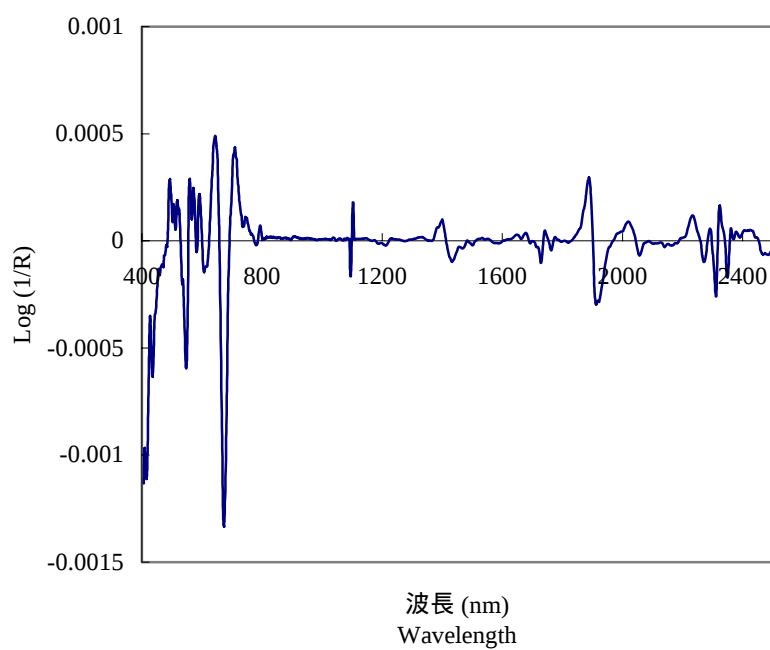


圖 3. 梨葉片平均光譜二階差分吸收光譜圖

Fig. 3. Second derivative absorbance spectrum of mean spectrum for pear leaves.

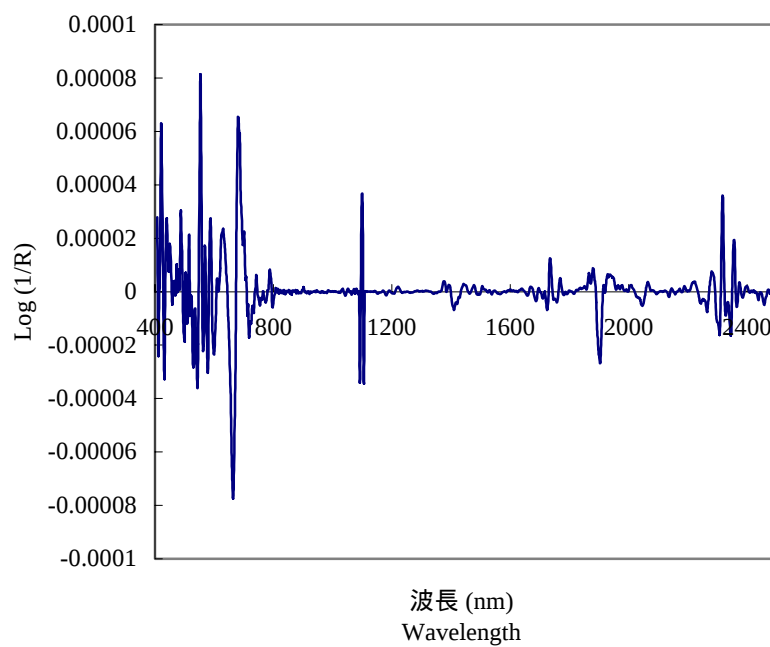


圖 4. 梨葉片平均光譜三階差分吸收光譜圖

Fig. 4. Third derivative absorbance spectrum of mean spectrum for pear leaves.

Malley 等⁽²¹⁾提出一項衡量近紅外光技術成功應用於農業土壤分析準則為 r^2 必須大於或等於 0.7 以上，當 $r^2 < 0.7$ 僅限用於篩選用途。另外，Malley 等歸納目前 NIRS 應用於農業土壤分析研究指出，有關總氮分析方面 r^2 介於 0.7–0.95 之間，P 及 K 分析方面則相當差，Ca 及 Mg 分析方面 r^2 介於 0.7–0.9 之間。本研究利用乾燥後梨葉片粉碎樣本進行光譜擷取與 NIRS 應用於農業土壤分析方法相似，本研究在 N、Ca 及 Mg 分析方面，其判定係數大於 0.7；但是 P 及 K 分析方面其判定係數則低於 0.7，與 Malley 等歸納之結論相似。本研究結果可應用於梨樹之 N、Ca、Mg 葉片養分含量診斷，做為農民施肥之參考，但 P 及 K 方面則受限於 NIRS 應用範圍限於有機物質，無機物質必須與有機物質鍵結方可應用因素，P 及 K 須更深入研究或與結合其他方法以提升其分析能力。

表 2. 近紅外線分光光度計之梨葉片營養診斷 PLSR 校正線之性能檢定

Table 2. PLSR model performances for pear leaf nutrient by a near-infrared spectrophotometer.

成分 Attribute	處理方法 Treatment	波長範圍 (nm)	樣本數 ^z Size	因子數 PCs	r_{cal}	r_{cal}^2	r_{cv}	r_{cv}^2	RMSECV
氮 N	0 ^y	780-2498	67	13	0.916	0.839	0.841	0.707	0.085
	0	780-2498	60	12	0.948	0.899	0.890	0.792	0.070
	0	780-2498	58	11	0.949	0.901	0.891	0.794	0.068
	0	780-2498	56	12	0.953	0.908	0.910	0.828	0.061
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	61	10	0.993	0.986	0.876	0.767	0.019
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	60	11	0.997	0.994	0.881	0.776	0.005
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	58	11	0.998	0.996	0.879	0.773	0.074
	D ₃ (4,4,3)	788-2490	62	9	0.993	0.986	0.860	0.740	0.082
	D ₃ (4,4,3)	788-2490	56	10	0.999	0.998	0.916	0.839	0.068
	D₃(4,4,3)	788-2490	53	10	1.000	1.000	0.921	0.848	0.066
磷 P	0	780-2498	56	2	0.670	0.449	0.611	0.373	0.019
	0	780-2498	54	2	0.694	0.482	0.637	0.406	0.015
	0	780-2498	53	2	0.685	0.469	0.623	0.388	0.014
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	50	3	0.673	0.453	0.476	0.227	0.015
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	46	7	0.959	0.920	0.708	0.501	0.011
	D₂(3,3,2)	786-2492	44	7	0.990	0.980	0.742	0.551	0.009
	D ₃ (4,4,3)	788-2490	51	3	0.617	0.381	0.307	0.094	0.017
	D ₃ (4,4,3)	788-2490	47	6	0.969	0.939	0.633	0.401	0.012
	D ₃ (4,4,3)	788-2490	45	6	0.974	0.949	0.691	0.477	0.011
鉀 K	0	780-2498	63	1	0.228	0.052	0.095	0.009	0.186
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	55	2	0.453	0.205	0.267	0.071	0.161
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	51	1	0.451	0.203	0.330	0.109	0.153
	D₃(4,4,3)	788-2490	63	12	0.999	0.998	0.615	0.378	0.189
	D ₃ (4,4,3)	788-2490	59	13	1.000	1.000	0.604	0.365	0.190
鈣 Ca	0	780-2498	58	12	0.923	0.852	0.788	0.621	0.135
	0	780-2498	54	12	0.955	0.912	0.876	0.767	0.105
	0	780-2498	53	12	0.960	0.922	0.891	0.794	0.099
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	58	11	0.994	0.988	0.718	0.516	0.143
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	55	11	0.997	0.994	0.746	0.557	0.137
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	53	10	0.995	0.990	0.735	0.540	0.140
	D ₃ (4,4,3)	788-2490	63	12	0.999	0.998	0.615	0.378	0.189
	D ₃ (4,4,3)	788-2490	59	13	1.000	1.000	0.604	0.365	0.190
鎂 Mg	0	780-2498	63	12	0.862	0.743	0.645	0.416	0.024
	0	780-2498	57	13	0.909	0.826	0.758	0.575	0.019
	0	780-2498	52	13	0.936	0.876	0.832	0.692	0.016
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	59	10	0.988	0.976	0.704	0.496	0.028
	D ₂ (3,3,2)	786-2492	54	10	0.996	0.992	0.823	0.677	0.022
	D ₃ (4,4,3)	788-2490	62	7	0.981	0.962	0.766	0.587	0.029
	D ₃ (4,4,3)	788-2490	57	12	1.000	1.000	0.834	0.696	0.026
	D₃(4,4,3)	788-2490	55	10	0.999	0.998	0.842	0.709	0.026
	D ₃ (4,4,3)	788-2490	51	11	0.999	0.998	0.752	0.566	0.029

^z The outliers had been deleted by equation five.

^y No pretreatment.

參考文獻

1. 邱再發、張淑賢。1983。柑桔缺硼症之診斷與防治方法研究。中華農業研究。32(2): 161–171。
2. 邱再發。1976。柑桔、梨及蘋果葉片營養診斷研究。中華農業研究。25(3): 214–226。
3. 邱再發、林森岷。1961。利用葉片分析診斷柑桔營養狀態之研究。中華農業研究。10(2): 25–33。
4. 林永鴻、許秋玫。2001。玉荷包荔枝營養診斷技術研究。高雄區農業改良場研究彙報。12(2): 25–36。
5. 林榮貴。1995。柿的營養診斷與施肥管理。農藥世界。146: 35–42。
6. 范念慈。1987。枇杷樹體營養與果實品質影響。農林學報。36(1): 31–34。
7. 陳富英、林娟如。1995。蓮霧葉片與土壤營養診斷在果園施肥改進應用。農藥世界。148: 15–17。
8. 郭魁士。1990。土壤學。中國出版社。pp.216–237。
9. 張忠賀。1988。蓮霧葉片分析採樣方法及營養狀態之研究。國立中興大學碩士論文。pp.57–62。
10. 張茂盛。1997。番荔枝果園土壤與葉片分析營養診斷。土壤肥料通訊。58: 4–7。
11. 張愛華。1981。本省現行土壤測定法。作物需肥診斷技術。台灣省農業試驗所特刊。13: 9–26。
12. 莊浚釗。1998。楊桃葉片營養診斷及肥培管理試驗。桃園區農業改良場研究報告。34: 15–26。
13. 蔡永嶧、鍾慶龍。1985。植體營養與氮肥用量對果實品質改進研究。74 年度土壤肥料試驗示範報告。pp.44–63。
14. 賴文龍、王錦堂。1997。中部柑桔果樹之營養診斷及應用現況調查。臺中區農業改良場研究彙報。54: 33–45。
15. 蘇德銓、林源盛。2000。柑桔營養診斷說明會及葉片與土壤採樣技術示範。臺東區農業專訊。34: 18–21。
16. 蘇德銓。2001。枇杷營養診斷與葉片及土壤採樣技術。臺東區農業專訊。38: 16–18。
17. Beverly R. B., J. C. Stark, J. C. Ojala and T. W. Embleton. 1984. Nutrient diagnosis of Valencia oranges by DRIS. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109(5): 654.
18. Chapman H. D. 1960. Leaf and soil analysis in citrus orchards. Univ. Calif. Agr. Sci. Ext. Serv. Manual 25: 53.
19. Dosi E., E. S. Tamburini, R. Tosi, D. Lunghi Casoni, and G. Vaccari, 1999. Utilisation of near infrared spectroscopy for determination of the nitrogen content in beet leaves. In: Proceedings of the 9th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, pp.599–602, Verona, Italy.
20. Haaland, D. M. and E. V. Thomas. 1988. Partial least-squares methods for spectral analyses. Anal. Chem. 60: 1193–1202
21. Malley, D. F. and P. D. Martin. 2002. Strengths and limitations of NIR in soil analysis. In: Proceedings of the workshop on NIR nondestructive quality evaluation of agricultural produces. p.c1–c5, Taipei, Taiwan.

22. Marten, H. and T. Naes. 1989. Methods for calibration. In: Multivariate calibration. New York: John Wiley & Sons.
23. Mary E. Martin and D. Aber. John 1994. Analyses of forest foliage III: Determining nitrogen, lignin and cellulose in fresh leaves using near infrared reflectance data. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2**: 25–32.
24. Meuret M., P. R. Biston Dardenne, and O. Poty. 1993. The use of NIR in predicting nutritive value of Mediterranean tree and shrub foliage. *J. Near Infrared Spectrosc.* **1**: 45–54.
25. Susan Ciavarella and D. Batten Graeme. 1998. Measuring potassium in plant tissues using near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* **6**: 63–66.

Leaf Nutrition Diagnosis of Pear by Near-infrared Spectrophotometer

Wang-Sheng Li, Su-Feng Roan and Fei-Neng Wang

Summary

Chemical analysis to assess the nutrient status of pear leaves can be used for fertilizer management of pear production. A near-infrared reflectance spectrophotometer system, including an optical fiber probe, a spectrophotometer in the region 400 to 2500 nm, and a computer were developed to fast diagnosis of leaf nutrient analysis. By second and third derivative pretreatment and then analyzed by PLSR algorithm, the results were showed that the coefficient of determination of cross-validation (r^2_{cv}) were 0.848 for N, 0.551 for P, 0.378 for K, 0.794 for Ca and 0.709 for Mg with root mean square error of cross-calibration (RMSECV) 0.066 for N, 0.009 for P, 0.189 for K, 0.099 for Ca and 0.026 (g/100g) for Mg, respectively.

Key words: near-infrared spectrophotometer, pear, leaf nutrient.