

國立臺灣大學生物資源暨農學院生物產業機電工程學系

博士論文

Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

以多通道螢光光譜影像系統與螢光指標

探討甘藍苗水份逆境之研究

The Development of Multi-Channel Fluorescence Spectral

Imaging System and Fluorescence Indices for Study of

Water Stress of Cabbage Seedlings

蕭世傑

Shih-Chieh Hsiao

指導教授：陳世銘 博士

Advisor: Suming Chen, Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

以多通道螢光光譜影像系統與螢光指標

探討甘藍苗水份逆境之研究

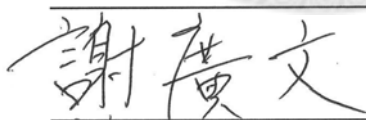
The Development of Multi-Channel Fluorescence
Spectral Imaging System and Fluorescence Indices for
Study of Water Stress of Cabbage Seedlings

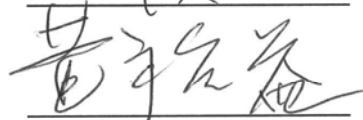
本論文係蕭世傑君（學號 D89631004）在國立臺灣大學生物產業機電工程學系、所完成之博士學位論文，於民國 100 年 07 月 07 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

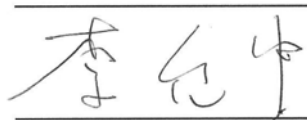
口試委員：

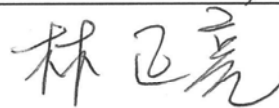


(指導教授) (簽名)

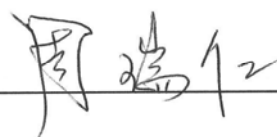








系主任、所長


_____ (簽名)

誌 謝

博士班求學期間，恩師 陳世銘教授，在教學方面循循善誘、在研究方面追根究底、在為人處事方面政通人和，視學生如己出般的悉心關懷與照料，各方面都樹立為人師表的最佳典範，成為我這位高職教師學習的標竿，有幸在恩師門下學習，使我獲益良多，雖致上十二萬分的謝意，也難表達我感激之情於萬分之一。

文稿初成，承蒙口試委員李允中教授、林正亮教授、黃裕益教授、謝廣文教授撥冗審閱，悉心斧正並提供許多寶貴意見，使本文得以去蕪存菁，更臻完善，特表由衷感謝之意。

漫長的研究期間除了要感激恩師 陳世銘教授如 7-11 般的隨時為研究遭遇的瓶頸排難解惑之外。還要感謝三位兩肋插刀，傾全力相挺的博士級好伙伴；研究初期，協助擘劃實驗流程，奠定研究根基的陳加增博士。研究中、後期，經常和我一起做實驗，討論到半夜，全力無私的協助，使研究得以撥雲見日，否極泰來的楊宜璋博士。研究末期，由以思路清晰、做事有條不紊，細心與耐心見長的蔡兆胤博士協助我做最後相關資料的彙整，為本研究畫上完美的句點。由於三位博士各擅勝場，在三個階段適時伸出援手，協助研究的進行，實在功不可沒，在此對三位博士表達感激之意。還有許多幕後英雄毓良、永坤、小蔡...等，都是由恩師陳世銘教授領導的 405 實驗室研究團隊成員，在我研究過程中感謝他們的支援，使實驗能順利進行，讓我感受到 405 實驗室是個同心協力、合作無間、充滿溫馨的大家庭，僅此謝謝 405 實驗室的每位成員並與大家分享我畢業的喜悅。

擔任教職的同時能順利進修，感謝花蓮農校古桂村、曾錦章前後兩位校長的支持與鼓勵，教務處高保齡主任與黃芳敏組長在排配課方面排除萬難全力配合及花蓮高農的同事們時時為我加油打氣，非常謝謝大家。

采芳吾妻在我進修期間為我打點家務，照顧五位兒女，照護年邁母親，任勞任怨，為我分憂解勞，讓我無後顧之憂，要是沒有妳在背後默默的支持，我將無法順利完成學業，老婆感謝有妳，今後將會有較多時間陪妳。妹妹美滿在我進修

期間經常為我加油打氣，多方面的協助家裡，美滿非常感激妳。弟弟富聰雖遠居台中，亦經常打電話關心我進修相關事宜，謝謝你富聰。進修期間，相當冗長、備極艱辛，所幸五個孩子善解人意，噓寒問暖，體貼入微，成為我進修期間動力的泉源。

感謝撫育我長大成人的雙親。天天引頸期盼我早日完成學業的母親，現在已如您所願，我畢業了。遺憾的是，父親已駕鶴西歸，不能親自分享我畢業的喜悅，願以此成果告慰父親在天之靈。

最後謹向所有曾經關心我進修的親朋好友，致上無比的謝意。



摘要

臺灣的蔬菜育苗主流為穴盤育苗，由於育苗期間的水份管理與移植後的成長息息相關。為了確保苗株的品質，提高苗株移植後的存活率及產量，對於穴盤苗株進行水份狀態的偵測有其必要。植物生長過程中，容易遭受包括水份等不同逆境的影響，導致生長受到干擾，使光合作用產生變化，造成植物螢光表現的變異。因為由植物葉綠素螢光之反應，能探討植物遭遇逆境的狀況，故可利用以偵測苗株之水份逆境，藉以管理蔬菜育苗時之水份供應。

本研究使用八組藍光 LED 之燈組作為螢光激發光源，四部攝影機組成之同步多通道影像擷取系統及以鋁擠型、黑色布幔製成之暗室設備，並利用 FXGPWIN、Visual C++、Matlab 等軟體撰寫系統之控制及分析程式，開發一套多通道螢光光譜影像檢測系統。系統選用 460 nm、690 nm、720 nm 及 740 nm 四個波長之濾光鏡，擷取於此四種波長下之不同水份逆境處理之甘藍苗株葉片的螢光影像，並量測葉片水份含量及水份潛勢，以探討其與螢光指標之關係。

研究所開發之多通道螢光光譜影像檢測系統，能有效量測苗株葉片之螢光影像，並建立葉綠素螢光淬息曲線，以求得最大螢光值 F_m 與穩態螢光值 F_s 。同時，本研究也建立一個動態螢光指標 (dynamic fluorescence index, DFI)，僅需 170 秒就能完成該指標的量測，大大縮短傳統上之量測時間。分析結果得知，使用 720 nm 波長之 DFI 螢光指標預測甘藍苗株葉片之水份潛勢更優於使用傳統之 Rfd 螢光指標，DFI 及 Rfd 對水份潛勢之相關係數 r 各為 0.944 及 0.795，標準誤差 SEE 各為 0.286 及 0.525 Mpa。在去除高水份逆境之樣本後，DFI 對水份潛勢之相關係數僅微微降低至 0.861，不同於 Rfd 的則降低許多，其 r 由 0.795 降至 0.416，可顯示 DFI 在植物遭遇較低水份逆境時仍具有高的預測能力，因此 DFI 對水份之逆境具有敏感性，且能應用於逆境尚未造成傷害時之檢測，可防範水份逆境於未然。

關鍵詞：螢光影像、螢光指標、水份逆境、苗株、光合作用

Abstract

Most of vegetable seedling nurseries in Taiwan adopt plug tray system for seedlings production. The proper water management during the seedling nursery is important to the growth after transplanting. In order to ensure the quality of the seedlings and to improve the production after transplanting, the water status of the plug seedlings is necessary to be monitored and detected. Several kinds of stresses such as water stress may affect the growth of plants due to the variation of photosynthesis and result in the changes of fluorescence reaction. The status of plants under water stress can be assessed according to the response of chlorophyll fluorescence. Therefore, the technology which can measure water stress of plants is needed for irrigation management during seedling growth.

In this study, a multi-channel fluorescence spectral imaging system was developed, which consisted of eight sets of blue-LED fluorescence inducing light, a multi-spectral imaging system with four CCD cameras, and a dark chamber. The control and analysis programs of the system were programmed by using FXGPWIN, Visual C++, and MATLAB. Filters with four wavelengths, 460 nm, 690 nm, 720 nm, and 740 nm were used to detect the fluorescence emission spectra of the leaves of cabbage seedlings under various water stresses. After measuring water contents and water potential of the leaves, the relationship among them and the indices of fluorescence can be found.

The multi-channel fluorescence spectral imaging system was proofed that can effectively detect fluorescence images of seedling leaves, and then get maximum fluorescence (F_m) and steady-state fluorescence (F_s) from the fluorescence quenching curve of them. Besides, a novel fluorescence index (dynamic fluorescence index, DFI) was developed in this study. With the proposed DFI, highly correlated data ($r = 0.944$) and low standard error of estimate ($SEE = 0.286$ MPa) to the water potential values can be obtained from a single channel around 720 nm and with shorter imaging times (170 seconds). The coefficient of correlation reduced to 0.861 after eliminating samples with high water stresses, indicating that DFI still has high predictability under condition of low water stress to plants.

Keywords: Fluorescence imaging, Fluorescence index, Water stress, Seedlings,

Photosynthesis

目 錄

口試委員會審定書	i
誌 謝	ii
摘 要	iv
Abstract.....	v
目 錄	vii
圖目錄	x
表目錄	xii
第一章 緒論	1
1.1 研究背景	1
1.2 研究目的	2
1.3 論文架構	2
第二章 同步多通道螢光光譜影像系統建立與測試	4
2.1 前言	4
2.2 多通道螢光光譜影像系統之建立	8
2.2.1 系統設計	8
2.2.1.1 暗室	9
2.2.1.2 螢光激發光源控制系統	9
2.2.1.3 同步多通道螢光光譜影像擷取系統	11
2.2.2 系統操作	12
2.3 螢光波段的選取及影像處理與分析	13
2.3.1 螢光波段的選取	13
2.3.2 CCD 感測光學特性	15
2.3.3 影像處理與分析	16
2.4 穴盤苗株螢光光譜影像量測	18
2.4.1 樣本準備	18
2.4.2 儀器設備	18
2.4.3 實驗方法	19

2.5 結果與討論	19
2.5.1 初秋甘藍苗株螢光影像分析	19
2.5.2 初秋甘藍苗株螢光淬息曲線圖分析	20
2.6 結論	21
第三章 利用傳統螢光指標探討甘藍穴盤苗株含水率之關係	22
3.1 前言	22
3.2 材料與方法	24
3.2.1 樣本準備	24
3.2.2 儀器設備	24
3.2.3 實驗方法	25
3.2.3.1 螢光光譜影像取像	25
3.2.3.2 螢光光譜影像處理	25
3.2.3.3 樣本含水率分析	25
3.3 結果與討論	26
3.3.1 缺水處理與含水率的比較	26
3.3.2 含水率與螢光強度的關係	27
3.3.3 含水率與傳統螢光指標之探討	28
3.4 結論	30
第四章 以藍光 LED 螢光影像系統之動態螢光指標評估植物苗株之水份逆境	31
4.1 前言	31
4.2 材料與方法	33
4.2.1 樣本準備	33
4.2.2 螢光影像系統	33
4.2.3 螢光影像擷取與分析	35
4.2.4 水份潛勢的量測	36
4.3 結果與討論	37
4.3.1 螢光影像波段的選取	37
4.3.2 取像和資料處理	38
4.3.3 植物逆境的水份潛勢和螢光淬熄	39
4.3.4 動態螢光指標 (DFI) 之建立	41
4.4 結論	45
第五章 總結與建議	46

5.1 總結	46
5.2 建議	47
參考文獻	48



圖目錄

圖 2-1 綠色植物進行光合作用能量傳遞示意圖.....	5
圖 2-2 同步多光譜螢光影像系統示意圖.....	9
圖 2-3 同步多光譜螢光影像系統.....	10
圖 2-4 多光譜螢光影像擷取流程圖.....	12
圖 2-5 光譜輻射分析儀.....	14
圖 2-6 不同葉綠素含量之甘藍苗螢光光譜.....	15
圖 2-7 光學攝影機之感測器響應強度分佈圖.....	16
圖 2-8 多光譜螢光影像計算分析流程圖.....	17
圖 2-9 二維影像中單葉之螢光強度分佈圖.....	18
圖 2-10 由螢光影像強度計算之螢光淬息曲線與時間關係圖.....	20
圖 2-11 同步多光譜螢光影像系統相同樣本不同波長螢光淬息曲線與時間關係圖.....	21
圖 3-1 各處理組之螢光影像平均強度時間關係圖及對應之影像.....	27
圖 3-2 螢光影像淬息曲線上 F_m 與 F_s 示意圖.....	29
圖 3-3 螢光指標 (F_m/F_s 及 Rfd) 與甘藍苗株含水率線性迴歸分析圖.....	30
圖 4-1 多通道螢光影像系統(MSFIS)示意圖.....	35
圖 4-2 甘藍葉片螢光影像和淬息曲線.....	36
圖 4-3 水份潛勢測試儀.....	37
圖 4-4 使用 C-52 樣品水份測試箱量測甘藍苗葉片樣本之水份潛勢.....	37
圖 4-5 實驗組 (EA, EB, EC, ED) 與對照組 (RF) 之螢光影像強度與時間關係圖 及相對應之 F_m 、 F_s 螢光影像.....	40
圖 4-6 不同處理組之螢光淬息曲線經過正規化後螢光強度與時間關係圖.....	41
圖 4-7 F_e 分別在第 100 秒及第 300 秒的動態螢光指標 (DFI) 示意圖.....	42
圖 4-8 動態螢光指標 (DFI) 在 170 秒示意圖.....	43
圖 4-9 三個不同波段之葉片水份潛勢與動態螢光指標 (DFI) 之關係.....	43

圖 4-10 甘藍苗株葉片水份潛勢與傳統指標 Rfd 及動態螢光指標 DFI 之關係圖 ..44



表目錄

表 3-1 甘藍穴盤苗生長管理與缺水處理日程表.....	24
表 3-2 不同實驗組與對照組之甘藍苗葉片平均水份含水率.....	26
表 4-1 苗株水份逆境處理後之水份潛勢數據.....	40
表 4-2 Rfd 和 DFI 指標之相關係數和預測標準差對照表.....	45



第一章 緒論

1.1 研究背景

穴盤育苗作業在台灣已成為蔬菜育苗的主流，由於穴盤使用之介質很少，保水程度較差，若於栽培時水份管理失當，很容易造成苗株缺水的情形。苗株一旦發生缺水時，植物行光合作用的能力將受影響，其營養生長會減緩，輕者；造成苗株發育不良，影響將來苗株移植後的生長，重者；可能導致苗株死亡造成損失。在不影響苗株生長情況下；也就是在不破壞、不侵入的條件下，發展可以隨時監控並掌握苗株成長時的水份狀況，建立早期苗株水份逆境檢測之技術確有其必要，可使苗株在栽培過程中都處於極佳的狀態，確保其生長品質並提高其產量。

植物在吸收光能進行光合作用時，對光會有吸收及反射的現象，另外還會發生葉綠素螢光（Chlorophyll Fluorescence）反應，把多餘沒被利用的能量，以螢光方式釋放出來。螢光是一種釋放能量的表現，不會對作物造成影響，因此螢光檢測可說是一種非破壞性的檢測方法。目前已有許多專家學者證實葉綠素螢光已被視為對水份、營養以及其它影響植物生長關鍵因素之敏感指標，利用葉綠素螢光反應的檢測方式，最大的優點在於不破壞生物組織，亦即在不影響作物生長的情況下，可以達到偵測作物生長之目的。因此利用葉綠素螢光反應的方法偵測植物逆境狀況，將可以滿足既不干擾植物生長且又可隨時監控其生理狀況的需求，是一種非常可行的方法。

傳統的葉綠素螢光量測限於設備，僅能量測單點位置的螢光反應，其結果不甚客觀，常因葉片部位螢光分佈不均，造成量測代表性的差異。因此，若能利用現代攝影與自動控制的技術，整合激發光源啟閉動作，配合多通道 CCD 攝影機之取像動作，將可以影像方式擷取整個葉片之螢光資訊，此種資料才具代表性。螢光光譜影像的量測具快速、完整與非侵入性之優點，已被廣泛的用於葉片組織本體資訊之量測，其激發光源大部分都使用 UV 或雷射光源，兩者都屬於高耗能設

備，而且也會對使用者造成暴露上的傷害，若將此設備用於偵測苗株水份逆境的狀況，在能源及安全考量上而言都不恰當。

1.2 研究目的

本研究乃針對甘藍苗栽培期間水份逆境的偵測與分析進行探討，擬研發一套具備時間與空間解析能力之快速且具同步多通道、非破壞性的螢光多光譜影像系統，於不同水份逆境之情況下，探討螢光影像資訊與植株葉片含水率、葉片水份潛勢之關係，並建立螢光光譜指標分析模式，可應用於育苗場穴盤苗栽培之水份管理。

1.3 論文架構

本論文撰寫方式之安排如下：第一章：緒論；先介紹本研究的相關背景，並說明研究之目的是要開發一套具備時間與空間解析能力之快速且具同步之螢光多光譜影像系統，以探討甘藍苗株水份逆境與螢光指標的關係。第二章：同步多通道螢光光譜影像系統建立與測試；主要敘說系統的建立，系統內部構造及控制流程均會詳細說明，最後則以初秋甘藍樣本做為測試對象，以測試系統之功能，其結果證實可同步取得苗株螢光影像並能建立螢光淬息曲線。本章開發之系統將用於後續研究當作量測工具。第三章：利用傳統螢光指標探討甘藍穴盤苗株含水率之關係；本章主要探討傳統之螢光指標 Rfd 與 F_m/F_s 對甘藍穴盤苗株含水率的關係，並建立葉片樣本含水率之檢測模式。第四章：以藍光 LED 螢光影像系統之動態螢光指標評估植物苗株之水份逆境；本章與第三章之研究性質類似，但討論主題則為學界所重視之水份潛勢。本章另一個研究主題則是建立動態螢光指標 (DFI)，以改進使用傳統指標之費時、敏感度不佳的缺點。研究證實 DFI 指標可提升檢測速度，並對水份逆境不嚴重的苗株具備較高的敏感度，可精準的評估蔬菜苗株之水份逆境，極適用於苗株栽培業者。最後一章則整理上述三大研究成果

做為本論文之總結論。本論文第二章及第三章之內容大部分節錄自作者發表之農業機械學刊論文（蕭等人，2010），另第四章之內容則節錄自作者發表之 *Computer and Electronics in Agriculture* 期刊論文（Hsiao *et al.*, 2010）。



第二章 同步多通道螢光光譜影像系統建立與測試

2.1 前言

高等作物或藻類能利用太陽光進行光合作用，吸收光能量以製造生物體內之有機質，這些吸收光能的色素稱為葉綠素 a 和葉綠素 b。光照射在綠色植物時，首先激發葉綠體內的光收穫葉綠素蛋白 (light harvesting chlorophyll protein; LHC protein)，隨後 LHC protein 會將截獲的能量轉移至光系統 I 或 II (Photosystem I or II; PS I or PS II)，光系統反應中心內含有氧化和還原電位可驅動電子的傳送。

LHC protein 傳送光能至光系統的過程中會有釋放的機制，其中葉綠素所吸收的光能在第一激發態時，大約有 3~9% 的光能轉為螢光，這個現象約在百年前 Muller (1874) 就利用彩色玻璃濾片發現，植物所釋放的螢光波長大約在 660~800nm 之間。

反應中心所釋放的螢光主要來自 PS II 反應中心，當葉片或葉綠體處於暗適應狀態 (dark-adapted) 時，電子傳遞路徑的氧化或還原中間代謝物將回到相同狀態，在該葉片上照射光源時，PS II 會使螢光迅速放射，1934 年德國學者 Kautsky and Hirsch (1931) 首先發現此種現象，因此稱為 Kautsky 效應。雖然此現象發現甚早，但是在許多年後才被廣泛利用，主要是因為葉綠素螢光非常微弱，其強度僅為太陽光的 10^{-9} 倍，不易被量測應用，但隨著量測技術與電腦科技日趨成熟，加速了螢光與作物生理兩者關係的相關研究，直到 Omasa (1990); Siebke and Weis (1995 a,b) 等人研究均證實，葉綠素螢光所誘發的動能就是著名的“Kautsky effect”。

Bolhar-Nordenkamp and Oquist, (1993), Corp *et al.*, (1996) 均指出，當光線照射在作物葉片時，會產生反射、吸收與透射的現象，作物吸收光能量後會進行光合作用，達到自營生長之目的。經由葉綠素吸收所得之輻射光能約有 80~90 % 用於光化學過程，5~15% 的能量則以熱能的方式散失，其餘約 3% 未被利用的光能，會以螢光或磷光輻射的方式釋放出來，如圖 2-1 所示。

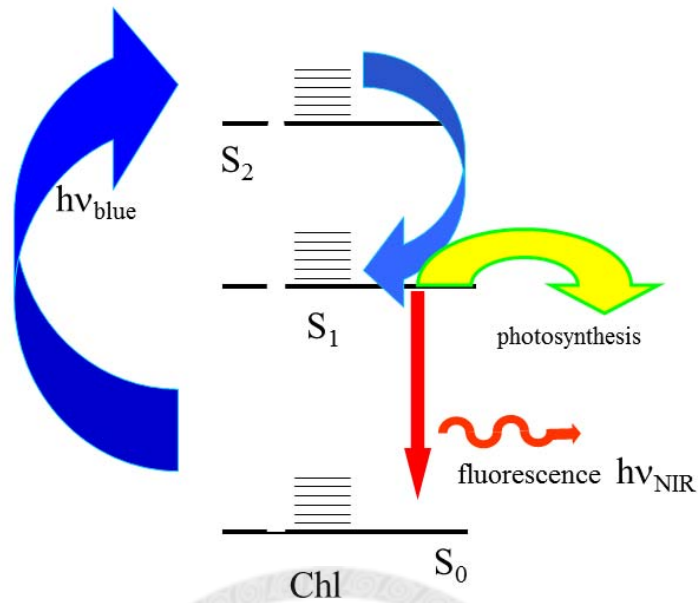


圖 2-1 綠色植物進行光合作用能量傳遞示意圖

易 (1999) 曾指出，植物吸收光能的波長較釋放出來的螢光輻射波長短。廖等人 (1999) 也指出，當葉綠素吸收光能後，會利用大部份的光能進行光合作用，把剩餘（沒有被利用）的光能以熱、光或光化學反應的方式釋放出來，由激發態分子發散出來的光稱為螢光（fluorescence）。由於螢光是把光合作用後剩餘的光能釋放出來，因此可以藉著偵測螢光的強弱來推知葉片光合作用的效率。

Chappelle *et al.*, (1985) 提及，在螢光放射的方式中依其作物種類與其生理狀態，會有不同波長的螢光光譜，利用葉綠素螢光反應來偵測作物生理狀態，是一種非破壞性的檢測方式。Chappelle *et al.*, (1984a); Lichtenthaler *et al.*, (1997); Subhash *et al.*, (1999); Flexas *et al.*, (2000); Corp *et al.*, (2000); Norikane and Kurata., (2001); Costa *et al.*, (2003) 等人均指出，藉由植株葉綠素螢光的偵測，可了解其光譜資訊與水份、光照、溫度或養份等因子間的關係，因此葉綠素螢光在植物生理表現上是一種非常重要的指標。

植物生長過程中，容易遭受到不同的逆境影響，如：溫度 (Chaerle and Straeten, 2000; Lang *et al.*, 1996)、日照量 (Lichtenthaler *et al.*, 2007)、水份 (Lichtenthaler and Babani, 2000)、二氧化碳 (Conroy *et al.*, 1986)、土壤的養份 (Subhash and Mohanan, 1997) 的影響，導致生長受到干擾，並使光合作用現象產生變化，也造成植物螢光表現的變異。因此量測植物之葉綠素螢光反應是一項探討植物生理重要的研究工作，然而目前大部分的商用系統設備僅能獲得葉片中單點的資訊 (Subhash *et al.*, 2004)，並無法代表整個葉片，且只對單一波長進行螢光資訊擷取，而無同時對數個波長做同步擷取，這將會在螢光資訊分析上無法同時進行相同狀態的比較，欠缺螢光資訊的完整性。因此發展一套多通道螢光光譜影像檢測系統，具有對活體植株及整個葉片進行螢光偵測，是有其必要性。

過去的數十年來對於葉綠素的量測方法均是一種“點數據”的量測，是以人工激發光源（較短波長的飽和光）照射在葉片上，葉綠素吸收光能後會有部份的光能以反射光的方式釋放出來，這些釋放出來的反射光經由濾光鏡過濾留存螢光波長的部份，再經由放大器把螢光訊號強化，並利用記錄器把螢光的量測值加以記錄起來。為了能激發出螢光，樣本必須具有輻射性，與迅速地吸收的特性，用來激發螢光的波長必須短於螢光波長。因此，藍和綠螢光只有能以 UV 輻射光來激發。對照之下，紅和遠紅葉綠素螢光則能被 UV 輻射光或可見光來激發。

目前常用以激發植物使產生葉綠素螢光的光源有雷射光源、UV 輻射光能、鹵素燈、氙氣燈等，都是以較高的能量，較短的波長，對由作物植株上取下的單一葉片進行照射、激發，使其產生葉綠素螢光，並擷取螢光資訊進行分析。

從單點區域的螢光訊號量測到螢光影像擷取系統發展中，Daley (1995) 曾經利用 660 nm 波長的發光二極體 (light emitting diodes, LEDs) 照射煙草葉片表面，再以 CCD 配合窄波光學濾鏡 (band pass filter) 擷取螢光影像，發現螢光影像的灰階值變化和傳統上用光感測器測得的螢光值呈高度正相關。

Krizek *et al.*, (2001) 曾利用波長 280 nm 和 380 nm 兩組不同波長之 UV 光作

為胡瓜葉片之螢光激發光源，以擷取 450 nm、550 nm、680 nm 和 740 nm 的螢光影像，並與市售之螢光量測設備所得之結果做比較。

螢光應用於植物生理的檢測及其系統的發展上近年來有許多的研究，Chappelle *et al.*, (1985) 研究指出，綠色植物在吸收可見光或 UV 輻射光後，葉片會發出螢光，且位於藍光及綠光之螢光的強度為一定值。在螢光設備發展上，Lichtenthaler and Babani (2000) 曾發展閃爍光系統 (flash-lamp system, FLS) 加上適當的濾鏡當成激發光源，而 Karlsruhe 之 FL-FIS (flash-lamp fluorescence imaging system, FL-FIS) 即為其應用例之一。

在葉綠素螢光檢測技術的發展上，具有空間解析能力之數位影像技術已成為必需採用之策略，Saito *et al.*, (1998) 指出即使同一葉片，在不同位置上量測其葉片螢光訊號時其所得到的螢光光譜也會有很大的差異。以致螢光訊號的量測方式已逐漸發展朝向螢光影像的擷取 (Kim *et al.*, 2001a; Corp *et al.*, 2002; Soukupová *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2003)。

二維螢光影像的量測方式對於植物生理研究而言，已成為一項趨勢，並在這幾年間持續發展，在過去的文獻研究中，其對於葉片的檢測往往需要將葉片摘除後進行 (Soukupová *et al.*, 2003)。另外，不同波長的影像常是利用濾鏡轉換機構來進行波長影像的轉換 (Lichtenthaler and Miehe, 1997)，因此無法取得同一時間下不同波長的影像，然而這是一個很重要的因素，因為不同時間下擷取螢光影像，其螢光強度與螢光的釋放，在不同時間點下，不容易用來說明與比較各不同波長影像的結果。再者，Kim *et al.* (2001b) 建置線掃描式 (line-scan) 螢光影像擷取系統，可以同步地擷取各波長影像，但是沒有辦法在同一時間取得整個二維面積的影像，因為這些系統是以線掃描的方式來進行影像的擷取與縫合，需要經由待測物與影像系統之相對運動來擷取並縫合成完整的螢光影像，因此各列的資訊時間都是非同步的狀態。在諸多影響因素之下，本研究建立一個可以同步擷取多通道的螢光影像系統，同一時間可以擷取各個螢光波段之影像，包含 460 nm、690 nm、

720 nm、740 nm，以分析各個通道對於時間之關係並進行比較。此外，本研究利用短波藍光 LED 來激發甘藍苗葉片之螢光影像，是以可見光為激發光源進行植物葉綠素螢光影像的激發，在此研究領域亦是一項新的嘗試，並且可以針對活體的植株進行分析。

本研究之目的為建立以短波藍光為激發光源之同步多通道螢光光譜影像系統，可以針對生長中植株進行螢光激發，並可以在同一時間點，擷取四個波長影像，建立時間軸關係以利後續研究之量測與分析。

2.2 多通道螢光光譜影像系統之建立

2.2.1 系統設計

本研究所開發的同步多通道螢光光譜影像系統如圖 2-2 所示，系統包含硬體組成與軟體程式兩大部分。其中硬體組成，包括：暗室、螢光激發光源控制系統、同步多通道螢光光譜影像擷取系統。本系統所使用之硬體設備都非商用品，而是以市售零組件整合組裝而成，軟體程式則由本實驗室研究團隊撰寫、開發而成。系統各部份說明如下：

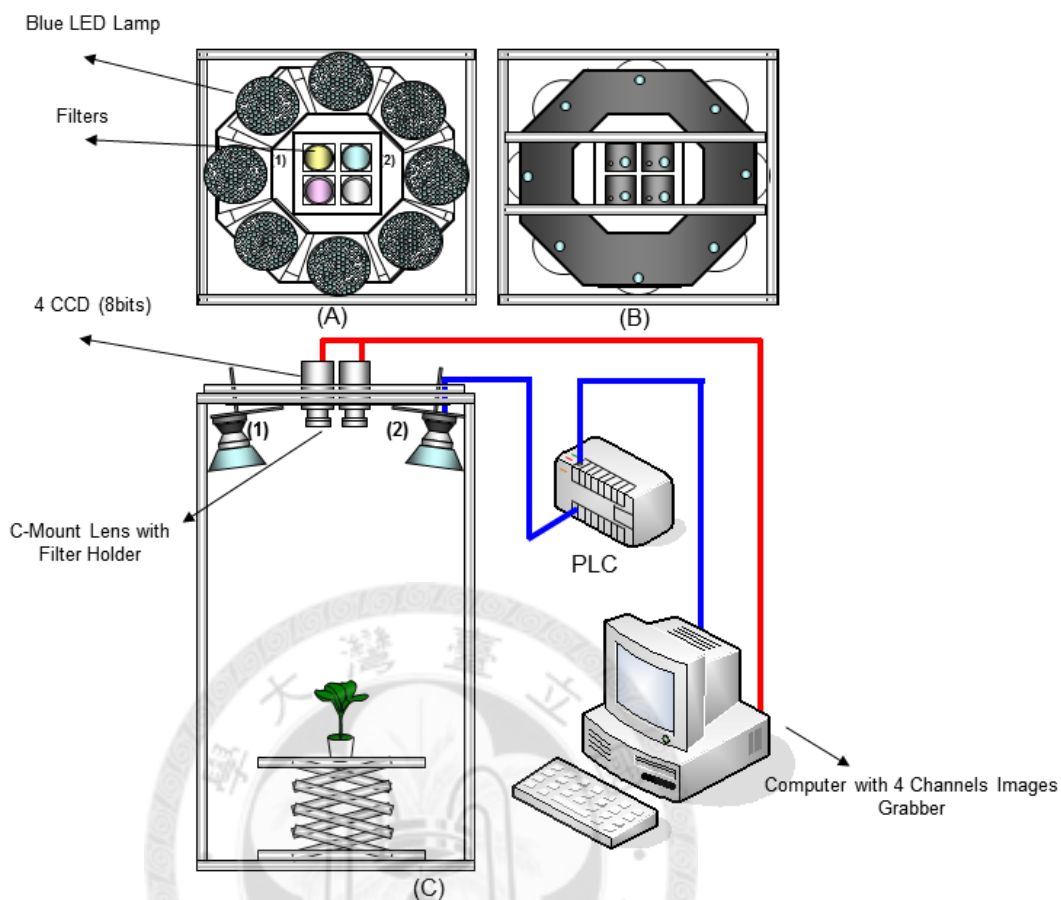


圖 2-2 同步多光譜螢光影像系統示意圖

(A) LED 燈具之仰視圖；(B) 系統俯視圖；(C) 系統架構圖

2.2.1.1 暗室

暗室是以鋁擠型為材料，架構成長、寬、高各為 $80 \times 80 \times 120$ cm 的空間，暗室不但可提供做樣本暗適應外，也可以當成螢光光譜影像取像室之用。為避免樣本在暗適應期間及擷取螢光光譜影像時受到外界光線干擾，暗室外圍包覆黑色布幔，使之形成不透光的封閉空間以利研究進行。

2.2.1.2 螢光激發光源控制系統

螢光激發光源之選定乃是依據作物之螢光特性，採用易被植物葉綠素吸收之

藍光 LED (high brightness light-emitting diode)，由於 LED 具備有冷光與窄波之特性，可避免螢光影像擷取時因光源溫度太高造成植株的溫度逆境，且可以不必使用光源濾鏡即可得到特定波長之光源。



圖 2-3 同步多光譜螢光影像系統

- (A) 暗室內 LED 開燈照射植株的情形；(B) 八組藍光 LED 置於可調式燈座上；(C) 四具 CCD 攝影機放置於環狀光源之中心位置；(D) LED 光源排列圖（開燈情況）。

螢光激發光源如圖 2-3 (D) 所示，由八組 LED 燈具提供，每組由 126 顆高亮度藍光 LED (30 nm FWHM；波長為 460 nm) 所組成的燈具。八組藍光 LED 置於可調式燈座上，組裝成環狀光源型態，使 CCD 攝影機可以放置於環狀光源之中心位置，以使照射平面光度達到一致的均勻度。光場均勻度之判斷係使用 CCD 攝

影機，配合藍光波段（460 nm）之光學濾鏡，拍攝激發光源照射在白紙上之影像，依據白紙上之藍光影像強度特性進行可調式燈座之調整，如圖 2-3（B）所示，使激發光源達成一定的均勻度。

本研究之光源控制系統係由可程式邏輯控制器（programmable logic controller, PLC; FX-2N 32MR, Mitsubishi Co. Ltd., Japan）於螢光光譜影像拍攝過程中，做為控制螢光激發光源的開啟與關閉之用。其階梯程式是利用 FXGPWIN 軟體所撰寫，以 CCD 攝影機拍攝張數做為可程式邏輯控制器的輸入條件，並同時輸出控制螢光激發光源的開啟與關閉的訊號。

2.2.1.3 同步多通道螢光光譜影像擷取系統

本研究螢光影像擷取需求，需要同時具備多波段與足夠的時間解析能力，達成同波段不同時間或不同波段同時間均可進行苗株螢光光譜影像之擷取的功能，因此建立之多通道螢光影像擷取系統各通道需要同步，可同時擷取影像資料。此系統包括：高感度 CCD 攝影機（CVM-50IR, JAI, Japan）四具，如圖 2-3（C）所示，做為擷取影像之用；搭配可變焦鏡頭（16VM612, TAMRON）及光學濾鏡（分別為 460 nm、690 nm、720 nm、740 nm）四個波段分別裝配於四具 CCD 的鏡頭前；並且應用具備同步四通道影像擷取功能之影像擷取卡（Viper-Quad, Coreco Inc., Canada），以執行同時擷取 4 具 CCD 攝影機拍攝的影像；以 Intel 個人電腦（內含 512MB RAM 與 80GB 硬碟）作為影像擷取、運算與儲存之用。

2.2.2 系統操作

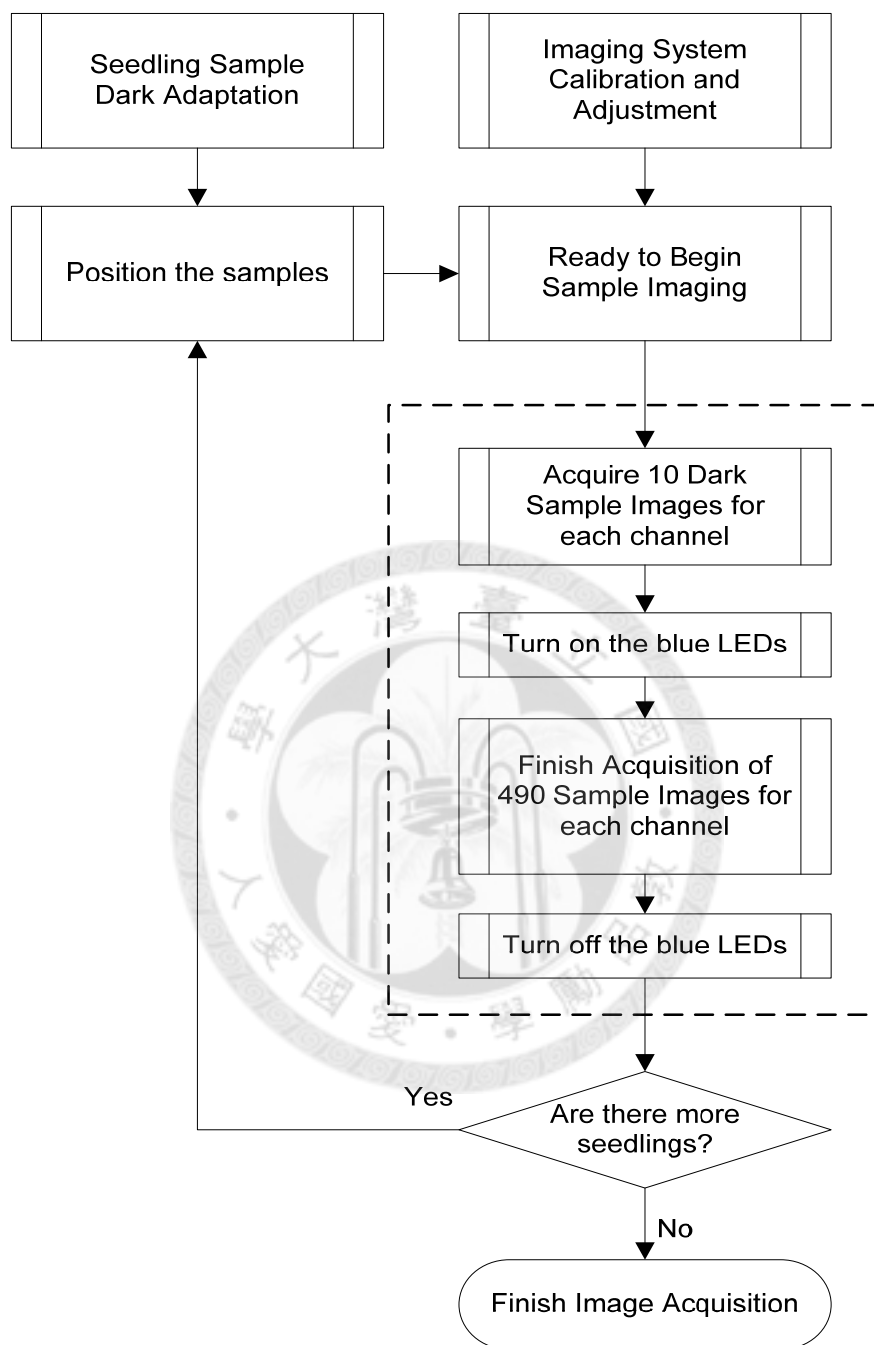


圖 2-4 多光譜螢光影像擷取流程圖

在完成螢光光譜影像擷取的過程中，螢光激發光源之啟閉控制、高感度 CCD 攝影機的驅動取像與停止、同步多通道螢光光譜影像的擷取及影像資料儲存於電腦等動作之執行，如圖 2-4 之操作流程。執行螢光影像擷取前，須先把整株樣本置

於暗室中，經過 20 分鐘暗適應後，才能量取樣本之螢光光譜影像。

本研究之控制程式是以 Visual C++ 為程式發展平台，撰寫控制四支高感度 CCD 攝影機啟閉且啟動影像擷取卡所搭配的驅動程式，並以 Sepera-Lite 4.0 函式庫所提供之 Active X 元件，撰寫可指定通道之波長名稱與影像編號之自動取像程式，所有四個通道影像在同一時間進行擷取，並由擷取卡順序傳入硬碟中，以確保影像是在同一時間點的波長影像。當四支配有不同波長濾鏡的 CCD 攝影機均完成第 10 張影像的拍攝之同時，PLC 透過 RS-232 介面控制藍光 LED 光源開啟，甘藍穴盤苗樣本經短波藍光 LED 照射後，受到激發產生螢光，此時四支 CCD 攝影機持續拍照且依序由影像擷取卡擷取螢光光譜影像。

整個過程 CCD 攝影機以 6.5 張/秒的速度，對每個樣本進行螢光不同時間點影像之拍攝，再由影像擷取卡上的影像暫存區以 frame by frame 的資料傳送方式，傳送影像資料至電腦，同時擷取四個不同光譜波段之螢光影像，以具備快速且多通道螢光光譜影像擷取之特性需求。

2.3 螢光波段的選取及影像處理與分析

2.3.1 螢光波段的選取

螢光光譜之量測是採用光譜輻射分析儀(GER 2600, SVC Co., New York, USA) 如圖 2-5 所示，搭配光纖配件對苗株進行實驗量測，以了解在苗株經由藍光 LED 照射激發後，所產生之螢光光譜的特性。為使後續擷取螢光光譜影像時，以藍光 LED 所激發之螢光波段可以符合 CCD 攝影機之感光需求，藉由本實驗之分析可以得知苗株消散之螢光波段數目及位置，作為建構螢光光譜影像系統之光學濾鏡選擇參考。本實驗在暗箱中裝置四組藍光 LED，其藍光之光譜範圍為 430-530 nm，當藍光照射作物植株後可產生 660-800 nm 之螢光，再以光譜輻射分析儀 GER 2600 利用其光纖探頭伸入暗箱即可量測植株之螢光光譜，所產生之螢光藉由輻射分析

儀 GER 2600 量測後，經分析求出之螢光輻射能量圖（如圖 2-6）。



圖 2-5 光譜輻射分析儀

如圖 2-6 之螢光輻射能量圖（Hsiao *et al.*, 2002），其螢光從 660 nm 開始，輻射能量逐漸增加，約在 690 nm 處，達螢光最大輻射值，即為其最大波峰，約於 740 nm 處，有第二個波峰出現，直至約 780 nm 螢光現象逐漸減弱，此結果與一般植物螢光現象及前人研究結果（Chappelle *et al.*, 1984a；Chappelle *et al.*, 1984b；Cervantes-Martinez *et al.*, 2002；Corp *et al.*, 1996；Subhash *et al.*, 1999）相似。綜合上述，圖 2-6 之 690 nm、740 nm 兩個波峰與波谷 720 nm 的波長，在多通道螢光光譜影像系統中可以當成選用濾鏡的依據。

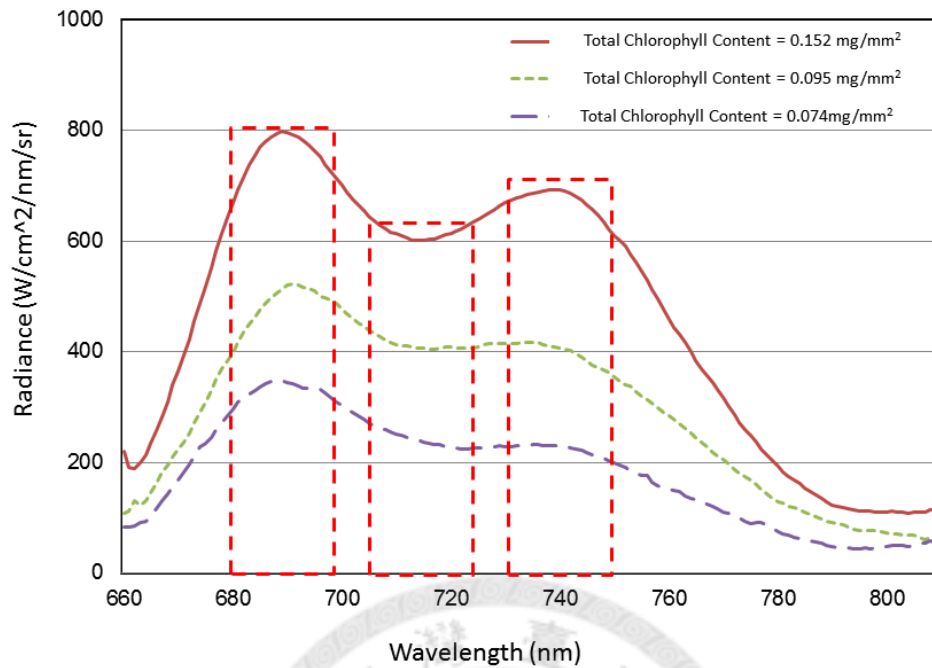


圖 2-6 不同葉綠素含量之甘藍苗螢光光譜 (660~800 nm) (Hsiao, 2002)

2.3.2 CCD 感測光學特性

本研究所採用的攝影機 (CV-M50IR, JAI Co., Japan) 為單色的 CCD 攝影機，感測器採 SONY 之單色 1/2" 的 EXview HAD CCD™ 面積為 6.4mm (h) x 4.8 mm (v)，此外其感測器靈敏度在 0.02 lux 即可進行拍攝，CCD 攝影機之感測器反應特性 (如圖 2-7 所示)，此攝影機於 700 nm 附近仍有相當好的感測強度 (> 80%)，對於螢光可感測波段而言，仍有相當好的感度。藉由上述的分析可以得知苗株主要螢光波段的位置後，並為使往後進行螢光光譜影像擷取時，使所激發出來的螢光光譜波段可以滿足 CCD 攝影機之感光需求，並參考圖 2-6 螢光波峰、波谷的波段，因此選定 690 nm、720 nm 與 740 nm 等三種波段做為濾鏡的規格，以擷取三個波段的螢光光譜影像。配合藍光 LED 燈光波長 460 nm，再選定規格為 460 nm 之濾鏡，其目的是在取像時，作為提供作物葉面積的資訊，因為螢光光譜影像在達到穩定狀態時，會相對較為微弱，並無法確切的計算出葉片的面積，因此以 460 nm 波長拍攝之葉片影像求得葉面積，作為計算出葉片平均螢光強度的葉面積基

礎。最後裝置在 CCD 攝影機之鏡頭上的濾鏡選定 460 nm、690 nm、720 nm 與 740 nm 等四種波段。

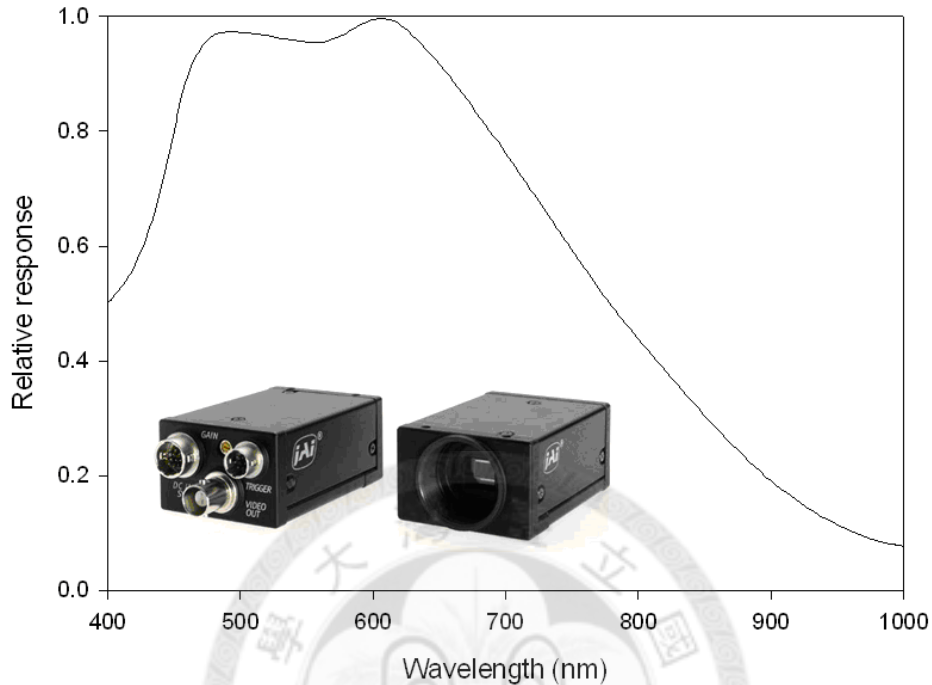


圖 2-7 光學攝影機之感測器響應強度分佈圖

2.3.3 影像處理與分析

拍攝螢光光譜影像的目的是為了能達成確實、非破壞、及時的掌握整片甘藍穴盤苗的資訊，藉由此資訊與作物的生長狀態彼此的關聯性，建立早期診斷的機制。因此以 Matlab 作為程式開發軟體平台，撰寫程式，把儲存在電腦硬碟中的螢光影像資訊，利用影像分析演算法，進行每個樣本螢光影像的分析、處理。整個螢光光譜影像處理流程如圖 2-8 所示，並詳述如下，首先計算第一個樣本 690 nm 的每一張螢光光譜影像的總灰階度共計 500 張，並求出此樣本 690 nm 的螢光光譜影像最大總灰階值之影像編號，計算出此張影像的閾值 (Otsu, 1979)，找出此出此張影像的遮罩，最後對此樣本的每張螢光影像進行背景分離，再計算出所有背景分離影像的灰階度值，接著計算此樣本 460 nm 影像的葉片面積，最後求出此樣本 690 nm 每一張螢光光譜影像之平均灰階度值並將結果儲存於電腦中。接著再依序

對此樣本的 720 nm、740 nm 波段進行相同的計算及儲存結果。當一個樣本計算完畢後，接著再對第二個樣本螢光影像進行相同的處理、計算、分析，直到所有樣本的螢光影像完成為止，並可計算得到不同波長之螢光淬息曲線。

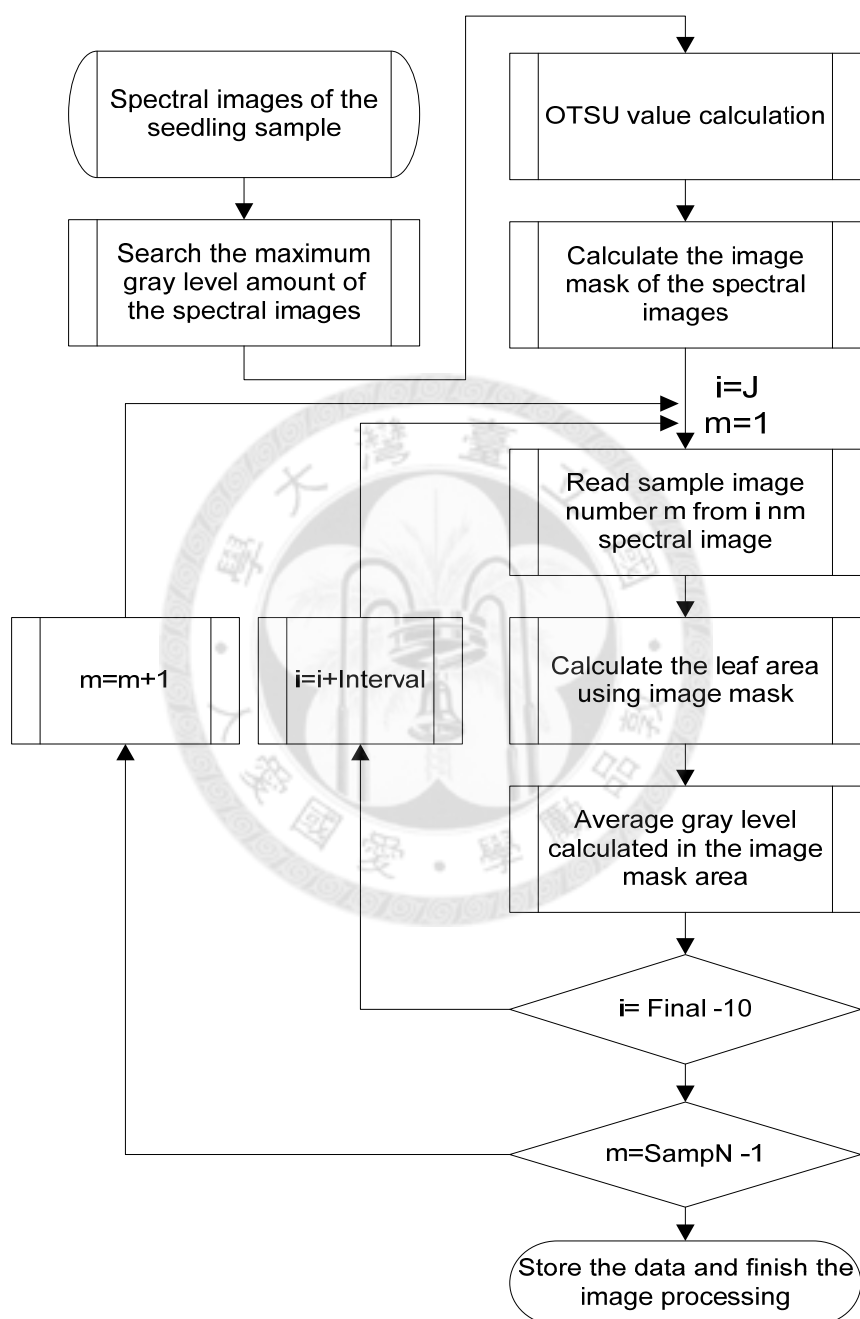


圖 2-8 多光譜螢光影像計算分析流程圖

把每一樣本每張螢光影像計算所得，以 Matlab 撰寫的程式進行繪圖，結果如

圖 2-9 所示為螢光影像的假彩色圖，由圖上可以看出水份在葉片上分佈並不均勻，若以傳統的單點螢光激發光源所產生的螢光葉片，將會造成資訊解讀上的誤導。

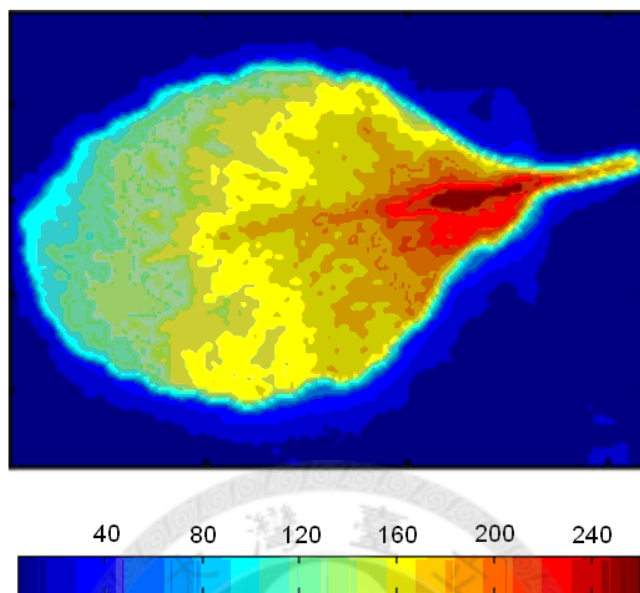


圖 2-9 二維影像中單葉之螢光強度分佈圖（單位：Gray Scale）

2.4 穴盤苗株螢光光譜影像量測

2.4.1 樣本準備

本研究選用的樣本為台灣大宗蔬菜之一，且為育苗場主要栽培對象的初秋甘藍，當甘藍苗成長至 15 天苗齡時，自雲林縣吳平育苗場購買後，移植到台灣大學人工氣候室，環境溫度為 20 °C / 25 °C（夜/日），相對濕度為 80 %（RH）。正常栽培至苗齡為 21 天，進行螢光光譜研究。

2.4.2 儀器設備

使用 2.2 節所研製之同步多通道螢光光譜影像系統，包含個人電腦及螢幕等設備。

2.4.3 實驗方法

把初秋甘藍樣本置於暗室暗適應 20 分鐘後，以激發光源照射初秋甘藍樣本上，使初秋甘藍樣本植株激發出螢光，把產生的螢光影像利用 CCD 攝影機以 6.5 張/秒的速度拍攝 300 秒，並把所拍攝的影像存於電腦中，再以自行撰寫的影像處理程式分析作物螢光影像之平均灰階值，並繪出其螢光量與拍攝時間之關係圖。

2.5 結果與討論

2.5.1 初秋甘藍苗株螢光影像分析

利用已建立的同步多通道螢光光譜影像系統，可以對作物進行螢光的激發及螢光影像的擷取、分析。圖 2-10 所示為鏡頭在激發光源照射作物後第 0.5 秒、125 秒、250 秒所擷取的之葉綠素螢光影像。其中第 0.5 秒所示之葉綠素螢光影像為全部 500 張影像中平均灰階度最大的，由圖 2-10 下方螢光影像中的部分螢光影像序列可以看出隨著照射後時間的增加，葉綠素螢光影像亮度呈現遞減的趨勢。

如圖 2-10 所示為螢光影像平均強度與拍攝時間關係圖，圖上顯示出螢光光譜影像灰階強度最大值 F_m 及把最後 10 張影像的螢光光譜影像灰階強度的平均數做為穩定值 F_s ，不同時段所拍攝的螢光影像平均強度值都能由本研究所開發完成的螢光取像系統量測而得。上述結果顯示與 Lichtenthaler and Miehe, (1997) 曾利用豆類的葉片為對象，在激發光源開啟後的 0.2 秒到 1 秒之間，有螢光最大值 (F_m) 產生，且葉綠素螢光持續減弱，在激發後 5 分鐘左右達到穩定的螢光狀態 (F_s) 所獲得的結果相當一致。

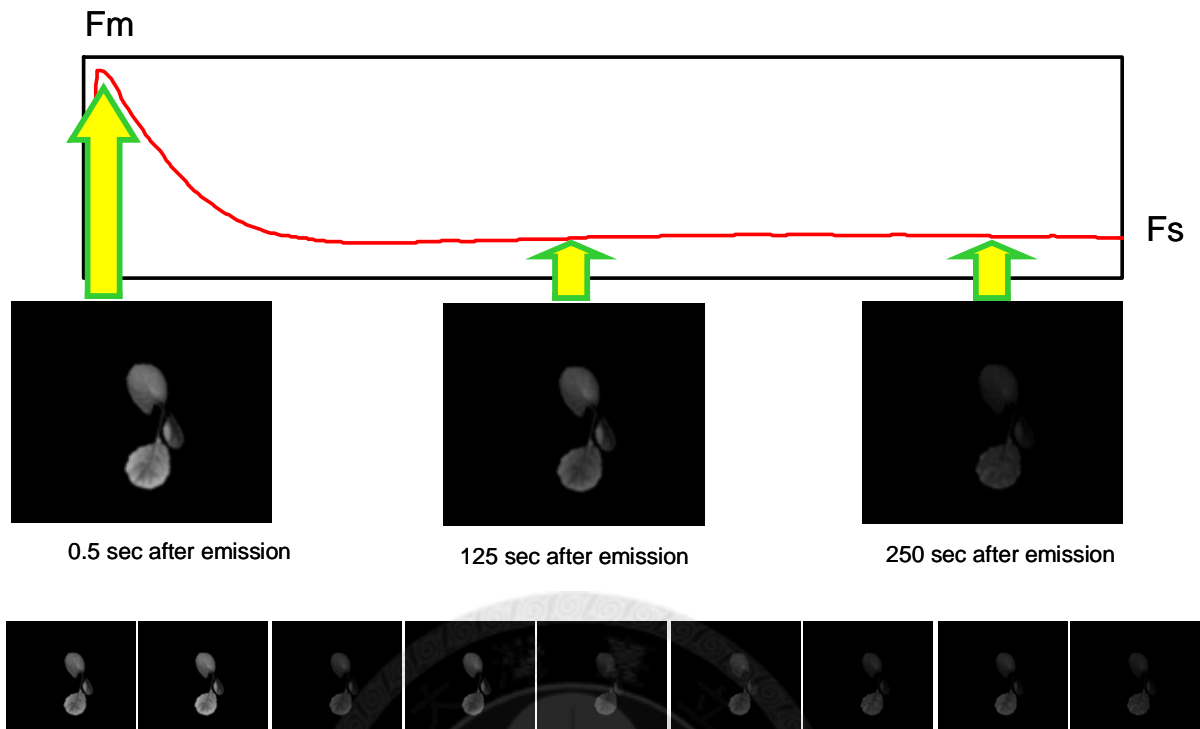


圖 2-10 由螢光影像強度計算之螢光淬息曲線與時間關係圖

2.5.2 初秋甘藍苗株螢光淬息曲線圖分析

圖 2-11 所示為 690 nm、720 nm、740 nm 三個通道擷取的螢光影像，經過影像處理、分析、計算後繪製的螢光淬息曲線，由圖上可以看出，三條螢光淬息曲線與時間關係圖的趨勢是一致的，均呈現在激發光源激發後瞬間（約只需 0.5 秒）即到達螢光平均灰階度的最大值，之後呈現減弱的趨勢，且減弱的情形均呈現先快速的陡降後再平緩的下降之趨勢。此三條淬息曲線在各個時間點的走勢均一致，可以說明本系統在擷取螢光影像時能使三個通道同步作用，進行擷取的動作。

圖中 690 nm、720 nm、740 nm 等三條淬息曲線，以 690 nm 的螢光影像平均強度的表現較另兩條曲線高，而 740 nm 一開始表現的螢光影像平均強度較 720 nm 高，但是到了大約 140 sec 左右就低於 720 nm。且三條淬息曲線相互間的距離並沒有保持一致，而是均隨時在變化，這可以說明，螢光在激發後並不是一直維持一定的強度，而是隨時產生變化的，而且，三個通道擷取的螢光影像強度也隨時產

生變化，可以提供作進一步分析、研究的題材。

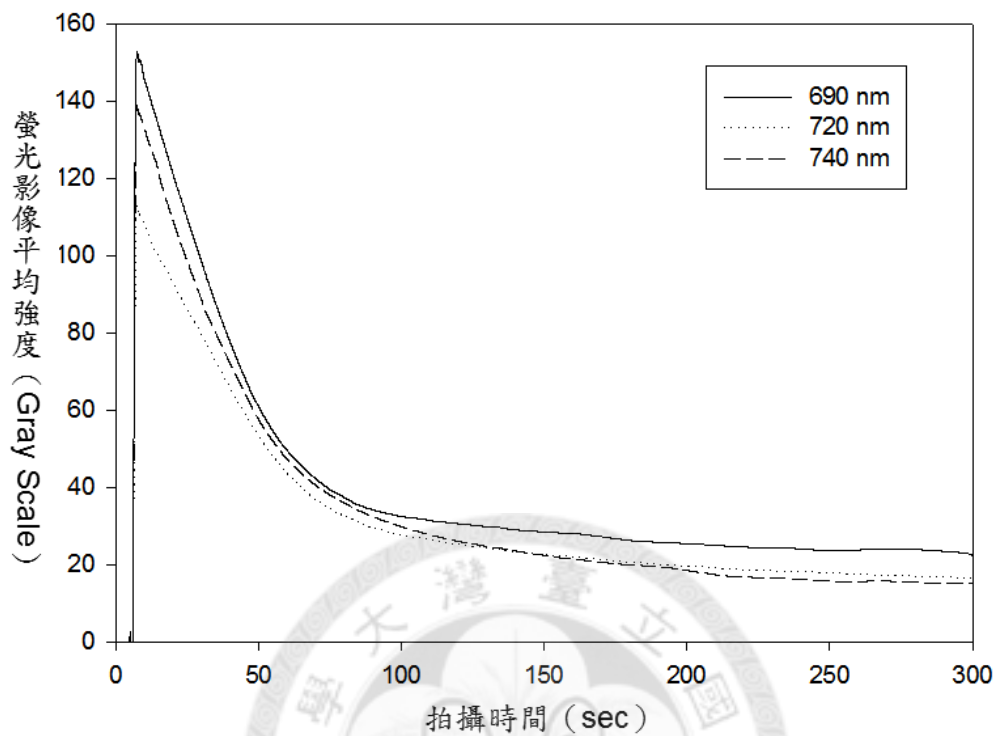


圖 2-11 同步多光譜螢光影像系統相同樣本不同波長螢光淬息曲線與時間關係圖

2.6 結論

本研究已成功建立同步多通道螢光光譜影像系統，具有非破壞性、非侵入式之檢測特性，系統包含藍光 LED 激發光源、CCD 取像設備、濾光鏡、暗室及其控制單元，激發光源燈座為可調式，可使系統光源照射均勻，以快速四通道影像擷取系統進行螢光多光譜影像之擷取，能擷取 460 nm、690 nm、720 nm、740 nm 四個波長之螢光影像，滿足螢光動態表現上所需之時間解析度。系統以 Visual C++ 程式撰寫平台，並開發螢光數位影像處理演算法，可將擷取之螢光影像資料轉換成螢光淬息曲線，並求出 F_m 及 F_s 之螢光指標。經以甘藍穴盤苗株葉片測試系統功能都能達量測螢光影像及獲取螢光指標之目的，本系統對後續之研究將提供一個重要的量測工具，藉以量測各項螢光資訊。

第三章 利用傳統螢光指標探討甘藍穴盤苗株含水率之關係

3.1 前言

以穴盤蔬菜苗株之栽培，因穴盤介質量很少，對水份之管理稍有差錯，極容易造成苗株水份逆境。Lauer and Boyer, (1992) 指出當植物遭遇缺水逆境導致體內缺水，其光合作用就會受到影響。廖等人 (1999) 指出，早期的缺水將會減緩植物的營養生長，其葉片的生長會比根部的生長對缺水的影響更為敏感。廖等人 (1999) 亦提到光合作用對於水份逆境特別敏感。光合作用受到水份逆境的影響有兩方面，分別是；第一、導致氣孔的關閉：通常會造成阻斷葉綠體接受來自大氣的二氧化碳。第二、細胞的水份潛勢過低：會直接影響光合作用組織在結構上的完整性。林 (1984) 指出，當土壤水份逐漸減少時，葉內水份含量暫時不會減少，但當達到某界限時，葉內水份含量會急速下降，俟葉片開始萎凋時，光合速率才急速降低，且缺水對光合成的影響大於呼吸。綜合上述，苗株水份缺乏將導致其生長速率降低，對葉菜類作物之影響更大。為能使苗株在生長過程中避免因為水份逆境導致其生長受到影響，苗株水份逆境狀態之偵測技術的研發，對苗株生產作業就顯得相當重要。

為能達到苗株水份逆境之非破壞性偵測目的，且以不干擾其生長狀態，利用光學方法的檢測為最理想。以作物葉片之光學特性而言，當光線照射在其葉片時，會產生反射、吸收與透射等現象，並以藉由吸收所得光能進行光合作用，達到自營生長之目的。因螢光強度會隨其光照時間與螢光激發週期，而在不同時間有不同螢光強度的變化。Barbagallo *et al.*, (2003) 利用螢光影像偵測穴盤苗中之苗株是否施曾被施以除草劑，由於除草劑之施用會導致光合作用速率降低，而造成生長緩慢的結果，故其在螢光影像的表現上會呈現相當明顯的差異。因此，為了能獲得植株之生理狀態資訊，非破壞性螢光影像偵測技術應具備足夠的空間解析能力，為未來發展之所趨。

Lang *et al.*, (1996); Lichtenthaler *et al.*, (1997); Cervantes-Martinez *et al.*, (2002) 等人曾利用不同波長的螢光強度比值，作為早期作物生長逆境的偵測指標。Michael *et al.*, (1996) 把綠色的菸葉和突變的菸葉植物，在溫室中保持不澆水達三星期之久，並利用 UV-A (波長 355 nm) 激發出螢光發射光譜，結果顯示當綠色菸葉的水份組成由 92% 降到 84%，其螢光發射光譜並沒有改變，而在水份組成為 82% 和更低的百分率時，綠色菸葉的藍綠螢光與紅 + 遠紅葉綠素螢光會增加。由螢光影像也可以決定螢光比率。在失去水份之初，藍/紅 (F440/F690)、藍/遠紅 (F440/F740) 顯示出為一定值，隨後則呈線性增加。綠色菸葉的葉綠素螢光比值 (F690/F740) 約在 0.4 到 0.6 之間。Lichtenthaler and Miché, (1997) 利用豆類的葉片為對象，經過 20 分鐘的暗處理後進行研究，結果顯示，在激發光源開啟後的 0.2 秒到 1 秒之間，有螢光最大值 (F_m) 產生，且葉綠素螢光持續減弱，在激發後 5 分鐘達到穩定的螢光狀態 (F_s)，並以所有的葉片像素 (約 200000) 個像素點) 為基礎，利用長方條的統計圖表示葉綠素螢光強度和螢光比率 ($Rfd = (F_m - F_s) / F_s$ 及 F_m / F_s) 在整個葉片面積上分佈的情形。換言之，作物螢光偵測系統需具備足夠的時間解析能力，量測出苗株之螢光最大強度與不同時間之螢光強度變化，以供作為苗株生長逆境偵測模式之參數。

蔬菜穴盤育苗作業目前在台灣已是蔬菜育苗的主流，但對於穴盤苗水份管理機制仍有待進一步之探討與研究，本研究將以第二章研究所獲得之結果決定系統量測之螢光波段，並以不同缺水程度的甘藍穴盤苗做為研究樣本，利用已建立的快速多通道螢光光譜影像系統，對樣本進行螢光激發、螢光影像拍攝、分析與處理，利用傳統螢光指標，進行蔬菜穴盤苗螢光影像與含水率等水份逆境指標間關係之分析，建構苗株螢光之水份逆境指標估算模式，做為分析穴盤苗水份管理之機制。研究目的是以 Rfd 與 F_m / F_s 之螢光指標，探討甘藍穴盤苗株含水率之關係，並建立葉片樣本含水率之檢測模式。

3.2 材料與方法

3.2.1 樣本準備

本研究使用的甘藍穴盤苗植株做為研究樣本，從育苗場購買苗齡為 15 天之苗株，先於台大人工氣候室內栽培，保持溫度為 20/25°C (夜/日)，濕度為 80%，使其適應環境兩天，當苗齡為 17 天時，開始把甘藍穴盤苗分成對照組與實驗組分別進行不同缺水天數的栽培，其分組的情形如表 3-1 所示，說明如下：1.對照組 (RF)：本組為正常栽培組，甘藍穴盤苗植株係依照分組前的栽培方法，維持每日澆水繼續正常栽培。2.實驗組：本組為缺水處理組，為了造成甘藍穴盤苗植株不同程度的缺水，本組又分成四小組；其中 EA 組仍繼續每日澆水正常栽培 3 天，當苗齡為 20 天，停止澆水 1 天。EB 組仍繼續每日澆水正常栽培 2 天，當苗齡為 19 天，停止澆水 2 天。EC 組繼續澆水正常栽培 1 天，當苗齡為 18 天，停止澆水 3 天。ED 組連續停止澆水 4 天。當苗齡為 21 天，開始進行研究。整個研究樣本的處理情形如表 3.1 所示。當苗齡為 21 天時，每組隨機取 10 株，共 50 株進行實驗。

表 3-1 甘藍穴盤苗生長管理與缺水處理日程表

Sets	Day 15	Day 16	Day 17	Day 18	Day 19	Day 20	Day 21
RF	Normal Watering						
EA	Cultivated in the phytotron at National Taiwan University	Normal Watering			W. C.		Start Experiment
EB		N. W.		W. C.			
EC		N. W.		Watering Ceased			
ED		Watering Ceased					

3.2.2 儀器設備

本實驗使用的儀器設備包括：(1) 於第二章已研發完成建立之同步多通道螢光光譜影像系統，對生長中的甘藍苗植株葉片進行葉綠素螢光之激發、取像、分

析統計。(2) 電子秤 (英展實業股份有限公司; BH-600) 與烤箱 (Memmert; ULM-500): 秤出每一甘藍穴盤苗樣本之鮮葉重及經過烤箱烘烤 48 小時後之乾物重, 並計算濕基樣本之含水率。

3.2.3 實驗方法

3.2.3.1 螢光光譜影像取像

利用已建立完成之多通道螢光光譜影像系統進行本研究之影像量測。首先將甘藍之穴盤苗放置於暗室內暗適應 20 分鐘, 隨即置於取像室內, 為了要凸顯目標葉片, 並節省計算時間, 僅量測甘藍苗第三本葉葉片之影像, 其它葉片則以黑布覆蓋。取像時葉片以支撐架托平後才進行拍攝, 當拍完第 10 張影像後 (約 6.5 秒), 藍光 LED 激發光源立即開啟, 以激發葉片產生螢光, 後續螢光影像之取像則以 6.5 張/秒速度持續進行, 每個頻道共拍攝 500 張 (含激發螢光前之 10 張影像), 每一樣本同步拍攝四個頻道約需 300 秒, 取得之所有螢光影像資料皆存於電腦硬碟中。

3.2.3.2 螢光光譜影像處理

本研究使用 2.4.2 節所研發之影像處理程式, 將上節所擷取之影像資料進行去除背景, 取得甘藍苗葉片三個波段 ($F_{690\text{ nm}}$ 、 $F_{720\text{ nm}}$ 、 $F_{740\text{ nm}}$) 各個時間之螢光強度資料, 以製作每個樣本之螢光淬息曲線。由螢光淬息曲線最高點數據決定每個樣本之螢光最大值 (F_m); 最後 10 點數據的平均值求得每個樣本之螢光穩定值 (F_s)。

3.2.3.3 樣本含水率分析

甘藍苗葉片樣本含水率量測是依據 Ceccato *et al.* (2001) 的方法進行。當甘藍苗葉片取像完畢後, 隨即切下並以電子秤量測每個樣本的鮮葉重 (濕重)。再把鮮葉樣本置入烤箱中以 65°C 的溫度, 烘乾 48 小時後取出, 再量測其乾物重, 利用 [公

式 1] 計算每個樣本之濕基含水率。

$$\text{濕基含水率} = \frac{\text{鮮葉重} - \text{乾葉重}}{\text{鮮葉重}} \quad [\text{公式 1}]$$

3.3 結果與討論

3.3.1 缺水處理與含水率的比較

甘藍苗株經過不同天數的停水處理後，量測各組葉片含水率如表 3-2 所示。

表 3-2 不同實驗組與對照組之甘藍苗葉片平均水份含水率

Sets	Comparison Set (RF)	EA	EB	EC	ED
Treatments	Normal	*WD ₁	*WD ₂	*WD ₃	*WD ₄
Water Content(%)	81.1	80.3	66.5	48.3	13.3

RF: The reference set of the normal watering treatment. EA: The experiment set A. EB: The experiment set B. EC: The experiment set C. ED: The experiment set D.

*WD_n = Water Ceased for n days (n=1, 2, 3, 4).

•The environment in the phytotron is Day/Night = 25°C/20°C, and 80% (RH).

表中 RF 代表正常澆水處理組別；也就是對照組。EA、EB、EC、ED 分別代表實驗 A、B、C、D 之四組實驗組，*WD₁、*WD₂、*WD₃、*WD₄ 分別代表缺水處理 1、2、3、4 天。由表中得知，對照組 RF 組與實驗組停止供水一天的 EA 組，此兩組之葉片平均含水率分別為 81.1%與 80.3%，兩數據約略相同，這是因為僅缺水一天，甘藍苗仍可吸收介質土中的有效水份，尚無缺水之虞。而缺水兩天的 EB 組之葉片含水率為 66.5%，就比前述兩組減少許多，這代表甘藍苗株已經在消耗自己本身的生理水份，有略為缺水的現象。EC、ED 兩組分別缺水三天與四天，其葉片含水率分別為 48.3%與 13.3%，其數據明顯降低，顯示有缺水的情況產生，其中

又以 ED 組的葉片經過缺水四天後，在外觀上已呈現嚴重缺水枯萎的現象。綜合上述得知，雖然由含水率的多寡可以得知甘藍苗株遭遇水份逆境的情況，但是卻無法推估甘藍苗株遭遇水份後的生理狀態及葉綠素活性，因此有必要藉螢光影像的解讀，進行苗株葉綠素活性及其生理狀態的探討。

3.3.2 含水率與螢光強度的關係

如圖 3-1 所示為五個不同處理的甘藍苗葉片樣本所擷取之葉綠素螢光影像平均強度與拍攝時間之關係曲線圖。本圖係以 690 nm 濾鏡所拍攝，由圖之螢光淬息曲線得知，葉綠素螢光在作物受到光源激發後瞬間即可達到最大值 (F_m)，然後依不同缺水程度呈現不同的下降趨勢，最後達到穩定狀態 (F_s)。

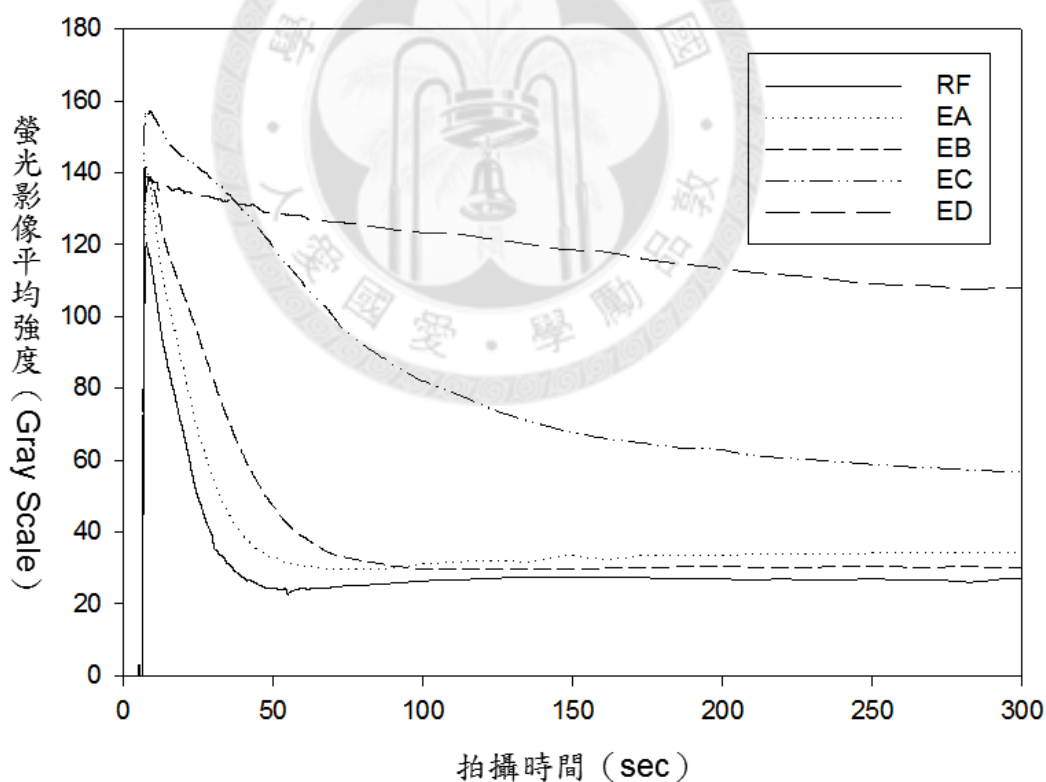


圖 3-1 各處理組之螢光影像平均強度時間關係圖及對應之影像

圖 3-1 可以看出五組不同缺水處理所呈現的螢光淬息曲線可以分成三類，分述如下：第一類：為正常栽培的對照組 RF 與缺水處理一天的 EA 組及缺水兩天的 EB

組，此類中的三條因為葉片水份逆境不高，其葉綠素仍具有較大的活性，可以有效利用給予的光能進行光合作用，因此釋放回自然界的光能變少，螢光淬息曲線均呈現急速陡升到最高點 (F_m) 後，開始下降然後呈現平緩的情形，最後達到穩定 (F_s) 的狀態。其中以 RF 與 EA 兩條螢光淬息曲線，的走勢幾乎一致，並無太大區別，這是因為兩者的葉片含水率約略相同 (RF=81.1%、EA=80.3%)。而 EB 組因為含水率為 66.5% 導致甘藍苗株樣本葉綠素活性低不如於前一組，由圖 3-1 可以看出螢光淬息曲線的下程度較前兩組稍微減緩一些。第二類：為缺水三天的 EC 組，本組的含水率為 48.3%，這代表苗株樣本之缺水逆境較高，導致葉綠素活性不如第一類的樣本，無法有效的利用所給予的光能進行光合作用，因此螢光影像淬息曲線下降的坡度有明顯減緩的趨勢，與前一組呈現出相當程度的差異。第三類：為缺水四天的 ED 組，本組的含水率只有 13.3%，螢光影像淬息曲線下降的坡度相當緩和，整條曲線呈現出平緩下降的斜直線，這顯示甘藍苗因為嚴重缺水造成葉綠素活性失去活性，導致無法正常的進行光合作用，以致葉片內之葉綠素無法將光能轉換利用，而以螢光形式輻射散失。

綜合上述可以得知，甘藍苗株的葉綠素活性與含水率有關，且螢光淬息曲線與葉綠素活性有關，因此，苗株葉片含水率與螢光淬息曲線呈現相關性。

3.3.3 含水率與傳統螢光指標之探討

Lichtenthaler *et al.*, (2005) 及 Lichtenthaler and Miché, (1997) 提到 Rfd 與 F_m/F_s 可作為螢光指標，並針對植物的健康程度進行分析；本研究利用所擷取之螢光光譜影像，可計算得到 Rfd 與 F_m/F_s 等螢光指標數值，並與葉片含水率進行線性迴歸分析。

在經過螢光激發、擷取影像運算後每個樣本可以分別得到 690 nm、720 nm、740 nm 等不同的三個波段各 500 個的螢光影像平均強度資訊，在每筆資料選出最大值為 F_m ，把每筆資料最後 10 個數據求出平均值做為穩定值 F_s ，如圖 3-2 所示，

並利用公式 2 求出 Rfd 與 F_m/F_s 之值。

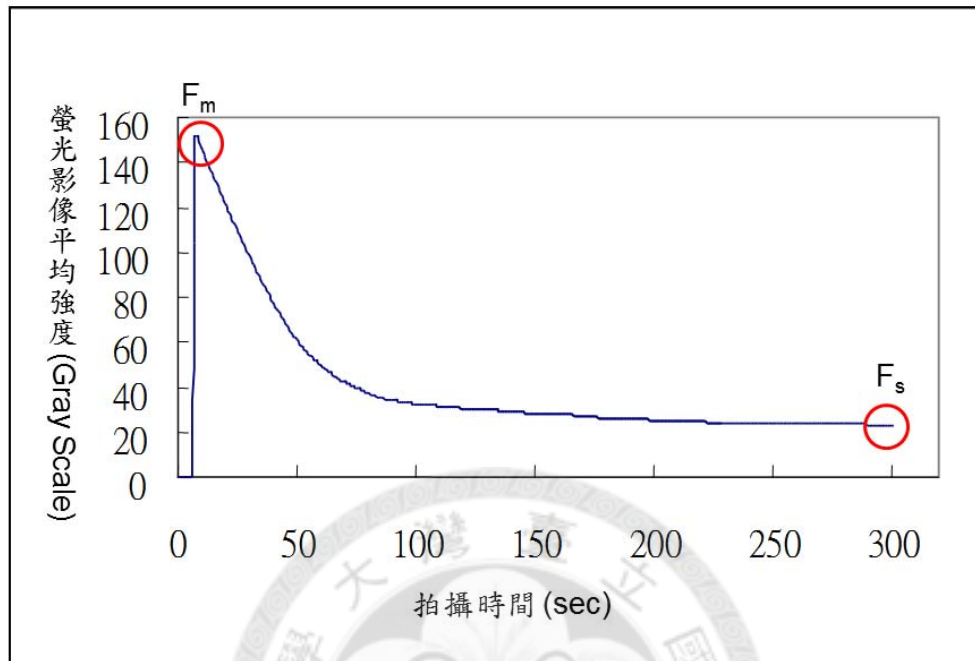


圖 3-2 螢光影像淬息曲線上 F_m 與 F_s 示意圖

$$Rfd = \frac{F_m - F_s}{F_s} = \frac{F_m}{F_s} - 1 \quad [\text{公式 2}]$$

在含水率與 Rfd 兩組數據之相關性分析中，三種不同波長中以 690 nm 之 r 值為 0.906 表現最佳。圖 3-3 為苗株葉片於 690 nm 波長之 Rfd 螢光指標與含水率之關係圖，其預測方程式為：

$$Rfd_{\text{at } 690\text{nm}} = 0.04 \times \text{苗株葉片含水率 (\%)} + 0.0629 \quad [\text{公式 3}]$$

在含水率與 F_m/F_s 兩組數據之相關性分析中，三種不同波長中也以 690 nm 之 r 值 0.906 為最佳，因此可以利用波長 690 nm 之 F_m/F_s 值來預測苗株葉片的含水率，其預測方程式為：

$$F_m/F_s_{\text{at } 690\text{nm}} = 0.04 \times \text{苗株葉片含水率 (\%)} + 1.0629 \quad [\text{公式 4}]$$

綜合上述，比較苗株葉片螢光影像平均強度之 Rfd 及 F_m/F_s 預測苗株葉片含水

率得知 F_m/F_s 與 Rfd 有相同的 r 值，且均為 0.906 (SEC=0.084)，故可利用在 690 nm 波長之螢光影像平均強度求出 F_m/F_s 與 Rfd，用以預測苗株之含水率。

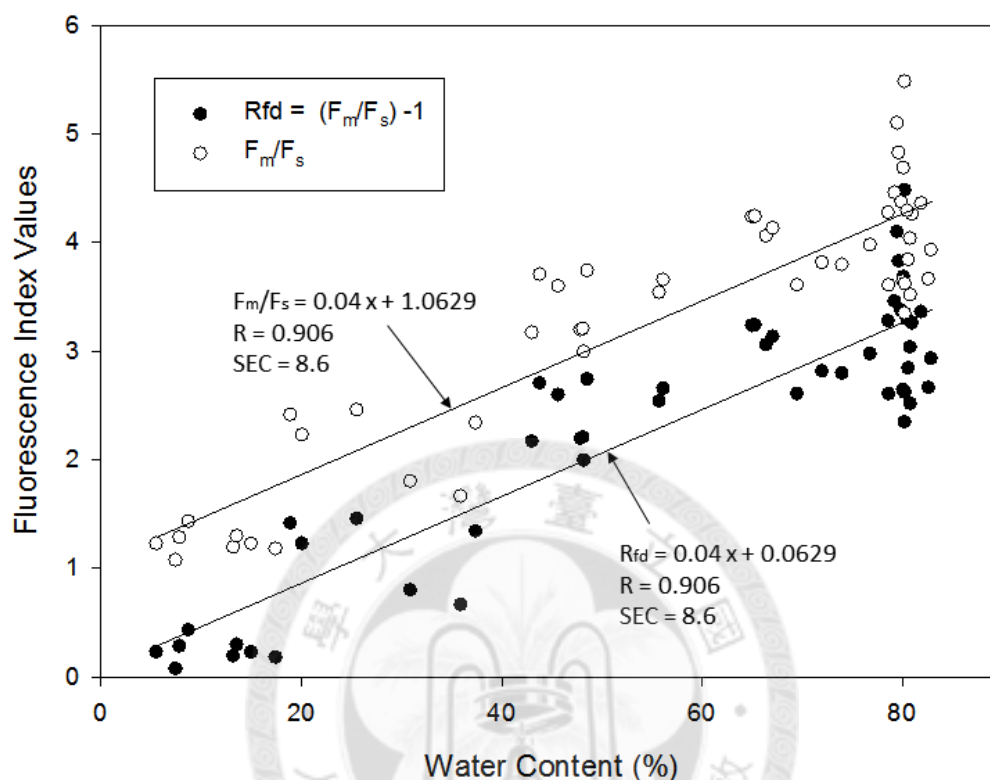


圖 3-3 螢光指標 (F_m/F_s 及 Rfd) 與甘藍苗株含水率線性迴歸分析圖

3.4 結論

本研究以建立完成之多通道螢光光譜影像系統量測不同水份含量之甘藍苗株葉片，能完成分析並獲得葉綠素螢光淬熄曲線，進而求出 F_m 、 F_s 、Rfd 及 F_m/F_s 。以 690 nm、720 nm、740 nm 三個波長之螢光指標 Rfd 及 F_m/F_s 對水份含量進行迴歸分析，其結果得知，以 690 nm 波長之 Rfd 及 F_m/F_s 兩個螢光指標之 r 值相等且為最佳，均達 0.906 (SEC=0.084)。本研究以多通道螢光光譜影像系統偵測苗株含水率，具有非破壞性、非侵入式檢驗的特性，不但能同時解析不同波長位置之螢光資訊，且能有效經由螢光資訊的分析建立苗株含水率的預測模式進而求出植株含水率，對爾後苗株水份相關之研究，可以提供重要的參考依據。

第四章 以藍光 LED 螢光影像系統之動態螢光指標評估植物

苗株之水份逆境

4.1 前言

植物之水份逆境因會改變作物之新陳代謝、延緩生長及抑制光合作用，被認為是農業生產之重大威脅 (Lauer and Boyer, 1992; Tezara *et al.*, 1999; Cornic, 2000)。水份逆境通常指的就是缺水逆境，又稱為脫水逆境、乾旱逆境，是一種極為常見的環境逆境，這是因為植物本身的水份含量少於正常需水量所引起的。當植物遭遇到缺水逆境，水份經由蒸散作用自葉片散失，在植物的生長過程中由於降雨不足或疏於灌溉、澆水，則將會使植物處於缺水、乾旱的情況中。當水份逆境發生的同時，也會使『鹽份逆境』(salt stress) 和『滲透逆境』(osmotic stress) 相伴而發生。有關缺水的所有變異，其一致的特性就是水份潛勢 (Ψ) 過低 (廖等人 1999)。目前已有數個評估水份逆境之指標，如：葉片之水份潛勢與其相對含水量等。這些指標中，葉片之水份潛勢因可直接反映植物組織之物理性質，成為最常用來評估水份逆境之方法 (Jarvis, 1976; Jackson *et al.*, 1981; Hunt *et al.*, 1987; Hunt and Rock, 1989; Ceccato *et al.*, 2001。Kramer, 1988a,b; Choné *et al.*, 2001)。廖等人 (1999) 指出植物早期缺水的影響之一是減緩營養生長，植物葉片的生長比根部的生長對於缺水更敏感。在針對玉米限制給水的實驗中，對葉片而言；當水份潛勢達 -0.45 Mpa 時，葉片的展開明顯減小，水份潛勢達 -1.00 Mpa 時，葉片生長則完全受到抑制。對根部而言；當根部組織的水份潛勢達 -0.85 Mpa 時，根部仍維持正常生長，而當到達 -1.4 Mpa 時，根部的生長仍沒有受到完全的抑制。

然而，無論量測葉片之水份潛勢或其相對含水量，皆需花費數小時進行乾燥或到達平衡方可獲得正確之數據，導致每次實驗時間往往超過 24 小時 (Flexas *et al.*, 2000; Herppich and Willert, 1995)。有鑑於此，開發一套快速、自動化及非破壞性之系統將有迫切之需要，尤其此系統亦可應用於長時間與線上之作物生長管理作業

中。

長期以來，葉綠素螢光已被視為對水份潛勢 (Govindjee *et al.*, 1981; Havaux and Lannoye, 1983; Lichtenthaler and Rinderle, 1988; Daley, 1995; Lang *et al.*, 1996; Schweiger *et al.*, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1997; Lichtenthaler, 1998; Flexas *et al.*, 2000; Norikane and Kurata, 2001; Subhash *et al.*, 2004)、溫度 (Schreiber and Bilger, 1987; Lang *et al.*, 1996)、營養 (Heisel *et al.*, 1996)，以及其它影響植物生長之關鍵因素 (Buschmann *et al.*, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1996; Papageorgiou and Govindjee, 2004) 的敏感指標。植物之螢光影像亦已被證實可用於探討植物成熟度 (Meyer *et al.*, 2003)、葉肉細胞之本體光合作用 (Baker *et al.*, 2001)，以及施加除草劑於豆葉之效果 (Kim *et al.*, 2001a)。根據葉綠素螢光之淬熄曲線，Lichtenthaler 等人 (1988, 1996, 1997, 1998) 發展了一套快速鑑別植物健康程度之方法，由於量測時間僅需幾分鐘，已成為監測植物生長之常見方法。螢光影像具備快速與非侵入性之優點，已被廣泛用於葉片組織本體資訊之量測 (Langsdorf *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001a, 2002, 2003; Kerizek *et al.*, 2001; Agati *et al.*, 2002; Chaerle *et al.*, 2009)。過去 20 年來，耗能之紫外線燈 (Chappelle *et al.*, 1991; Kerizek *et al.*, 2001; Mantha *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002) 或雷射光器 (Lüdeker *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003) 為最普遍之激發光源，此外並有研究針對使用閃光燈於螢光影像系統之節能成本進行探討 (Lichtenthaler and Babani, 2000)。

本研究提出一個動態螢光指標，使用多光譜螢光影像系統 (MSFIS) 搭配高密度之藍光 (460 nm) LED 燈，提供低能量之激發光源，而使用四個平行影像通道則可同時擷取甘藍穴盤苗葉片之多光譜螢光影像。經由非破壞性量測甘藍穴盤苗於不同水份逆境程度下之葉綠素螢光影像，再根據淬熄曲線對葉片之水份潛勢進行分析與評估。

本研究之目的有二：1. 根據螢光淬熄曲線，建立一個可預測甘藍苗水份潛勢之動態螢光指標 (DFI)。2. 證實多光譜螢光影像系統使用較經濟與省能之 LED 燈作

為激發光源，於擷取植物螢光影像之效果。

4.2 材料與方法

4.2.1 樣本準備

本研究使用之甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 為臺灣普遍之蔬菜，於 2006 年 3 月向吳平育苗場 (Wu-Ping, Yun-Lin County, Taiwan) 購買自播種後生長 15 天之甘藍苗，並栽培於 128 格之穴盤中。首先使甘藍苗適應環境兩天，再自其中選取 50 株甘藍苗進行分組，分組方式為每 10 株分成一組，共可分成 5 組，再對各組別之樣本給予 4 天不同之水份逆境處理。除了不同水份逆境處理之外，甘藍苗樣本皆栽培於國立臺灣大學之人工氣候室內，使可獲得自然光，並控制相同環境溫度於 20 °C / 25 °C (夜/日)，以及相對濕度 80 % (RH)。

每一組甘藍苗樣本皆進行為期 4 天之不同水份逆境處理。參考組 (RF) 樣本則給予 4 天正常與充足之灌溉 (無水份逆境)。對甘藍苗樣本取像與量測水份潛勢前，4 個實驗組別，EA、EB、EC 及 ED 於相同之 4 天中，分別給予 1、2、3 及 4 天逐日遞增之水份逆境處理。經過水份逆境處理 4 天後，隔天再擷取這些甘藍苗樣本之螢光影像，此時甘藍苗已經生長了 21 天。

4.2.2 螢光影像系統

本系統包含 (1) 暗室、(2) 螢光激發系統 (FIS) 及 (3) 多光譜影像系統 (MSIS) 三個部份。其中暗室由包覆黑布之鋁製框架建置而成。螢光激發系統 (FIS) 使用 8 盞燈 (8W each, 3T-B126, Top-Tower Technology Co. Ltd., Taiwan)，各盞燈皆由 126 顆藍光二極體 (30 nm FWHM at 460 nm) 所組成，並利用可程式控制器 (PLC; FX2N 32MR, Mitsubishi Co. Ltd., Japan) 進行控制。多光譜影像系統 (MSIS) 示意圖如圖 4-1 所示，由具備 4 個獨立波長之 4 支高感度攝影機 (CV-M50 IR, JAI Co. Ltd.,

Japan)，搭配 4 個光學變焦鏡頭 (16VM612, Tamron Co. Ltd., Japan) 所組成。各攝影機之 CCD 皆具備 752 (h) × 582 (v) 像素 (CCIR video output, 1/2" CCD sensor, 8 bit resolution on frame grabber)，影像擷取卡 (Viper-Quad™, Coreco Co. Ltd., Canada) 則使系統可同時擷取 4 張影像 (每一部攝影機擷取一張影像)。樣品支撐平台可調整高度，使保持於距離藍光 LED 燈 75 cm 內之範圍。此 8 盞 LED 燈於 75 cm 距離內之光子通量 (PPF) 為 69.20 ($\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)，於 50 cm 距離內則為 101.12 ($\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)。

多光譜螢光影像使用 FWHM = 10 nm 之濾鏡，量測得之葉綠素螢光發射光譜，中心點分別為 690 nm (690FS10-25, Andover Co. Ltd., USA)、720 nm (720FS10-25, Andover Co. Ltd., USA) 及 740 nm (740FS10-25, Andover Co. Ltd., USA)。使用 460 nm 濾鏡 (460FS10-25, Andover, Co. Ltd., USA) 所獲得之反射影像可作為螢光影像處理之參考。使用 Visual C++ 開發擷取影像之程式，並利用 MATLAB® 6.5 開發影像處理之程式。

圖 4-1 包括八具燈座，四具 CCD 攝影機和濾鏡和 PLC (可程式邏輯控制器)。其中 (A) 為苗株葉片取像的系統相關位置圖。(B) 為光組成的仰視圖，圖中包含藍光 LED (460 nm) 燈和裝在 CCD 攝影機鏡頭前方的濾鏡 (690 nm, 720 nm, 740 nm, 460 nm)。

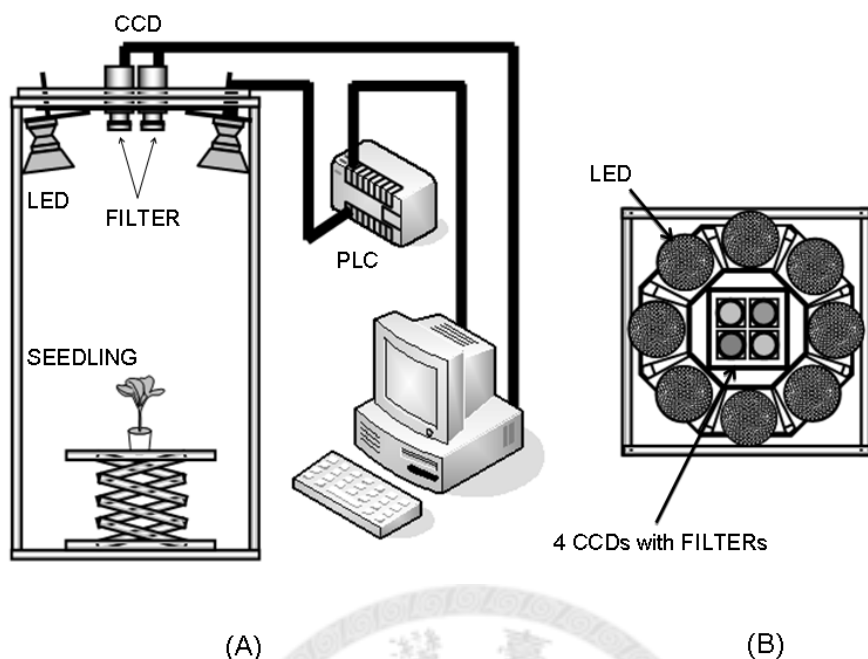


圖 4-1 多通道螢光影像系統(MSFIS)示意圖

4.2.3 螢光影像擷取與分析

本研究使用藍光 LED (460 nm) 穩定激發樣本以擷取其螢光影像，每個樣本各擷取 4 個波長，每個波長各擷取 500 張之螢光影像儲存於硬碟，實驗使用之甘藍苗樣本於取像前需進行 20 分鐘之暗處理。螢光影像擷取之過程如 3.3.3.1 節中所述，4 個波長共擷取 2000 張之螢光影像，總計費時約 300 秒鐘完成。

由於本研究係以第一片發芽之葉片（各幼苗莖部最低位置所生長之葉片）為探討目標，擷取影像時以黑布覆蓋其他葉片與莖部。量測之影像資料則使用 MATLAB[®] 軟體開發之影像處理程式進行分析。其中 460 nm 之影像用於校正葉片於暗室中之相對位置，以及計算目標葉片之面積，這些資訊將作為分析 690、720 及 740 nm 螢光影像之用。各波長皆有其最大灰階，並利用 OTSU 方法(Otsu, 1979) 計算影像之閾值，以獲得各波長之影像遮罩。使用影像遮罩獲得去背景之葉片影像，再計算整片葉片之平均灰階值，作為葉片之相對螢光強度。本實驗所分析之甘藍苗葉片影像所獲得之螢光淬熄曲線如圖 4.2 所示。

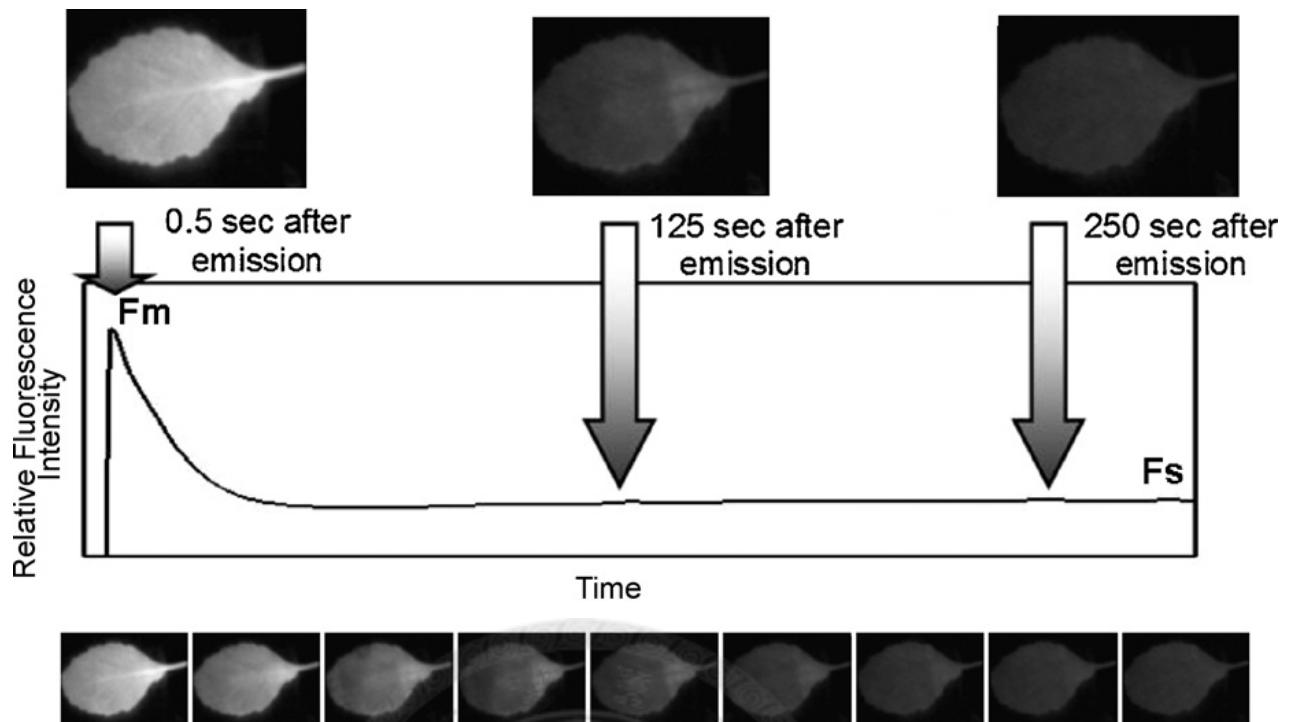


圖 4-2 甘藍葉片螢光影像和淬息曲線

圖 4-2 為甘藍葉片在 690 nm 波長之螢光影像和淬息曲線，本圖可用來決定螢光衰減比 (Rfd)，曲線中的相對螢光強度是指計算葉片影像中全部葉面積的平均值。傳統指標 Rfd 之計算公式為 $Rfd = (F_m - F_s) / F_s$ ，其中 F_m 為螢光強度的波峰值， F_s 為淬息曲不同線尾部穩定狀態的平均值 (Lichtenthaler and Miché, 1997)。

4.2.4 水份潛勢的量測

擷取螢光影像後，將甘藍苗樣本第一片發芽葉片摘除，使用內藏濕度計之 C-52 樣品水份測試箱 (Wescor Inc., Logan, UT, USA) 連接水份潛勢測試儀 (HR-33T, Wescor Inc., Logan, UT, USA) 量測甘藍苗葉片之水份潛勢，如圖 4-3 及圖 4-4 所示。水份潛勢測試儀使用前，需先以氯化鈉水溶液校正濕度計之露點，再利用由虛擬紙帶記錄器與水份潛勢測試儀 (HR-33T) 所組成之 Wescor AC-050 配件 (Pico Technology, Ltd., UK) 擷取濕度計所輸出之信號。C-52 樣品水份測試箱於實驗前

也需先置於室溫（23~25 °C）至少兩個小時，使溫度到達平衡，才能進行水份潛勢之量測。本實驗在甘藍苗葉片擷取螢光影像後，隨即摘除並以打孔器取得直徑 5 mm 之圓形樣本，再置於樣品水份測試箱中量測水份潛勢。50 個葉片樣本皆於上午 8 時至下午 2 時，共 6 小時之內完成量測。由於一次可使用 8 個 C-52 樣品水份測試箱，共分為 7 個批次量測 50 個樣本之水份潛勢。取得水份潛勢之數據後，再利用 SigmaPlot 10 軟體（Systat Software Inc., San Jose, CA, USA）分析其指數衰減擬合曲線。



圖 4-3 水份潛勢測試儀



圖 4-4 使用 C-52 樣品水份測試箱量測甘藍苗葉片樣本之水份潛勢

4.3 結果與討論

4.3.1 螢光影像波段的選取

圖 2-6 之甘藍苗螢光光譜（Hsiao *et al.*, 2002），為本系統量測之結果，顯示葉

綠素含量較高之樣本於 690 與 740 nm 之發射波峰位置會出現較高之螢光，此光譜與使用紫外光 (Lichtenthaler, 1998; Langsdorf *et al.*, 2000) 或雷射 (Kocsanyi *et al.*, 1988; Heisel *et al.*, 1996) 激發所獲得之光譜相似。前人研究有使用窄頻之可見光(藍光、橙光及綠光) 作為激發光源 (Lichtenthaler and Rinderle, 1988; Buschmann, 2007)，但結果顯示穿透深度與葉片組織對光再吸收皆會使葉綠素螢光產生差異。雷射光通常為集中之點狀光源，對整片葉子而言以雷射進行激發，所能提供之有效螢光影像區域過小，不適合應用於本研究中。若欲量測整片葉子之螢光影像，使用 460 nm 之藍光 LED 燈搭配使用 4 片濾鏡(460、690、720 及 740 nm) 之 CCD 攝影機擷取光譜影像的方法，是較為有效及省能的作法，可提供低能量窄頻之激發光，並獲得穩定之螢光數據。

4.3.2 取像和資料處理

苗株先進行 20 分鐘暗處理後，再將其置入暗室取螢光影像，為探討苗株水份潛勢特徵之最佳前處理 (Lichtenthaler and Rinderle, 1988; Langsdorf *et al.*, 2000)。如前所述之方法本研究取得 4 組波長 (460、690、720 及 740 nm)，各包含 500 張之螢光影像，500 張之前 10 張為尚未激發出螢光之影像，用以判斷突然上升之最大螢光值 F_m 。所有影像利用 OTSU 方法決定最大灰階值以分離背景與前景，而葉片之影像遮罩則用來獲得目標葉片之面積，作為光譜影像之興趣區域 (ROI)，影像處理程式會儲存各葉片之面積與平均灰階值，作為分析 Rfd 與 DFI 之用。

傳統上常使用螢光衰減率 (Rfd) 估測植物之生理狀態，Rfd 由 $(F_m - F_s) / F_s$ 計算而得，其中 F_m 為有效光中之最大螢光值， F_s 則為穩態光合作用之螢光值 (Djekoun and Planchon, 1991; Babani and Lichtenthaler, 1996; Babani *et al.*, 1996; Buschmann *et al.*, 1996)。此指標乃由穩態螢光淬熄曲線之尾部計算求得，故需延長取像時間以進行資料處理，水份潛勢越大越需更多時間才能趨於穩定。本研究定義一個動態參數，可以縮短樣本取像時間即便是水份潛勢更大 (更趨負值)，

仍能於短時間內完成預測。

4.3.3 植物逆境的水份潛勢和螢光淬熄

各組苗株樣本經水份逆境處理後，其平均水份潛勢數據如表 4-1 所示。利用 ANOVA 分析 5 種水份逆境處理之平均水份潛勢，結果顯示各處理間出現顯著差異，即缺水處理時間愈長，其水份潛勢愈偏負值。缺水處理超過 4 天，會導致葉片之水份潛勢達 -1.5 MPa 接近永久凋萎點，使植物不易回復原狀。故建立一套有效之非破壞性水份潛勢監測技術有其必要，可避免苗株於栽培期間遭受無法復原之水份逆境傷害。

植物經不同水份逆境處理後，可得到各種處理之葉綠素螢光淬熄曲線，其強度與曲率變化皆隨水潛勢不同而有顯著差異，圖 4-5 為各處理組的螢光淬熄曲線與螢光影像平均強度最大值 (F_m) 與最後 10 張影像平均強度的平均值 (F_s) 圖。圖中各曲線於取像開始的 0.5 秒均陡升到最高點，此時各處理組的螢光影像平均強度為最大 (F_m)，由圖得知，各處理組之 F_m 的螢光影像非常清晰的呈現出葉片的全貌，表示螢光強度甚強。隨後，因水份潛勢不同而呈現不同的下降曲線，其中以對照組 (RF) 與缺水 1 天的 (EA) 組之下降曲線呈現陡降程度最大，曲率半徑小。而缺水 4 天的 (ED) 組，由於缺水嚴重，雖然一開始與其他處理組一樣，都是陡升到最高點，但是卻呈現平緩下降，曲率半徑大。圖中得知，各處理組之 F_m 的螢光影像以對照組 (RF) 與缺水 1 天的 (EA) 兩組，與其左側 F_m 螢光影像之表現相差極大，幾乎看不出有螢光存在。而缺水 4 天的 (ED) 組之螢光影像則清晰可見，螢光強度表現與該組 F_m 螢光影像差異不大。

表 4-1 苗株水份逆境處理後之水份潛勢數據

	Reference Set (RF)	EA	EB	EC	ED
Water Stress Treatments	Normal	*WS1d	*WS2d	*WS3d	*WS4d
Average Water Potential (-MPa)	0.122	0.462	1.056	1.408	1.926
STD	0.192	0.242	0.658	0.640	0.653

上表是苗株正常給水的對照組 (RF) 與苗株水份逆境處理的實驗組 (EA、EB、EC、ED) 之水份潛勢數據。WSnd 代表葉片在進行取像和水份潛勢量測前缺水處理的天數，其中 n=1, 2, 3, 4。苗株栽培之人工氣候室的溫度為日/夜=25°C/20°C，相對濕度為 80%。

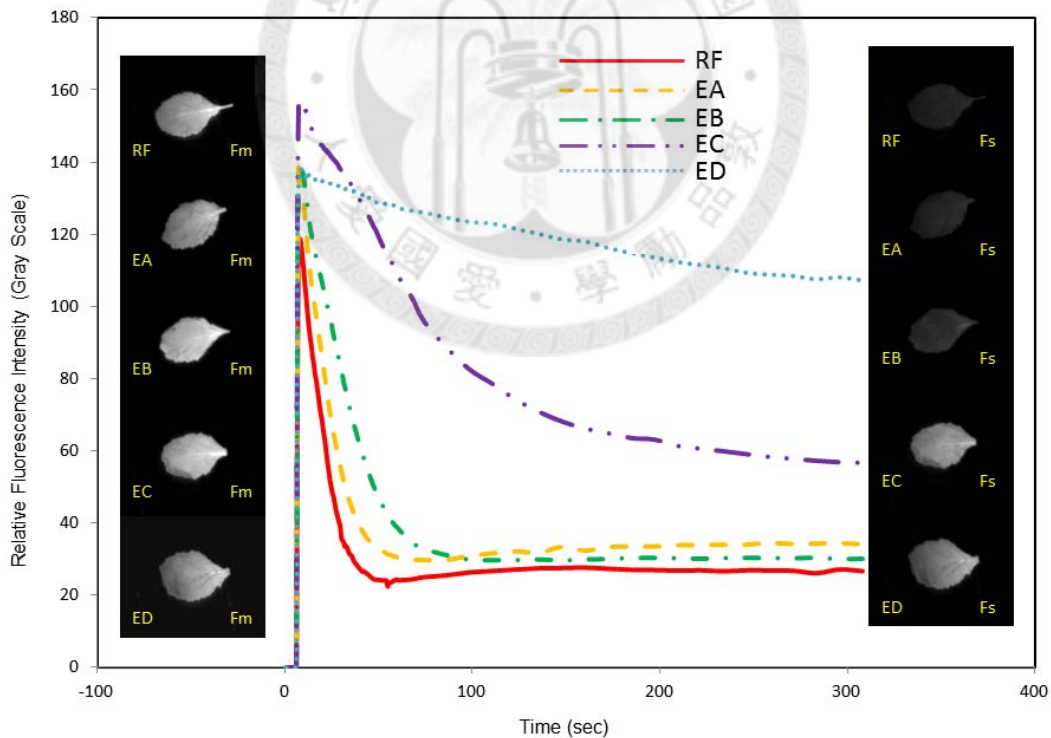


圖 4-5 實驗組 (EA, EB, EC, ED) 與對照組 (RF) 之螢光影像強度與時間關係圖

及相對應之 F_m 、 F_s 螢光影像

由於圖 4-5 各組的最大螢光影像平均強度值 (F_m) 並不相同，且各組之螢光淬息曲線走勢並不一致，不容易比較各組曲線的變化情形。為了分析比較不同水份潛勢之螢光淬息曲線變化情形，及消彌在拍攝螢光時因為調整 CCD 攝影機上的訊號增益所造成的螢光強度變化差，把各組樣本之螢光強度進行正規化處理，亦即把每一樣本之螢光淬息曲線均除以該樣本螢光淬息曲線的最大值 (F_m)，爾後均利用正規化後之數據進行分析。圖 4-6 為正規化後之苗株螢光強度與影像拍攝時間之關係曲線圖，圖中可以見到各組螢光強度最大值均為 1，可以很容易比較出各組淬息曲線的走勢，有利於建立動態螢光指標。

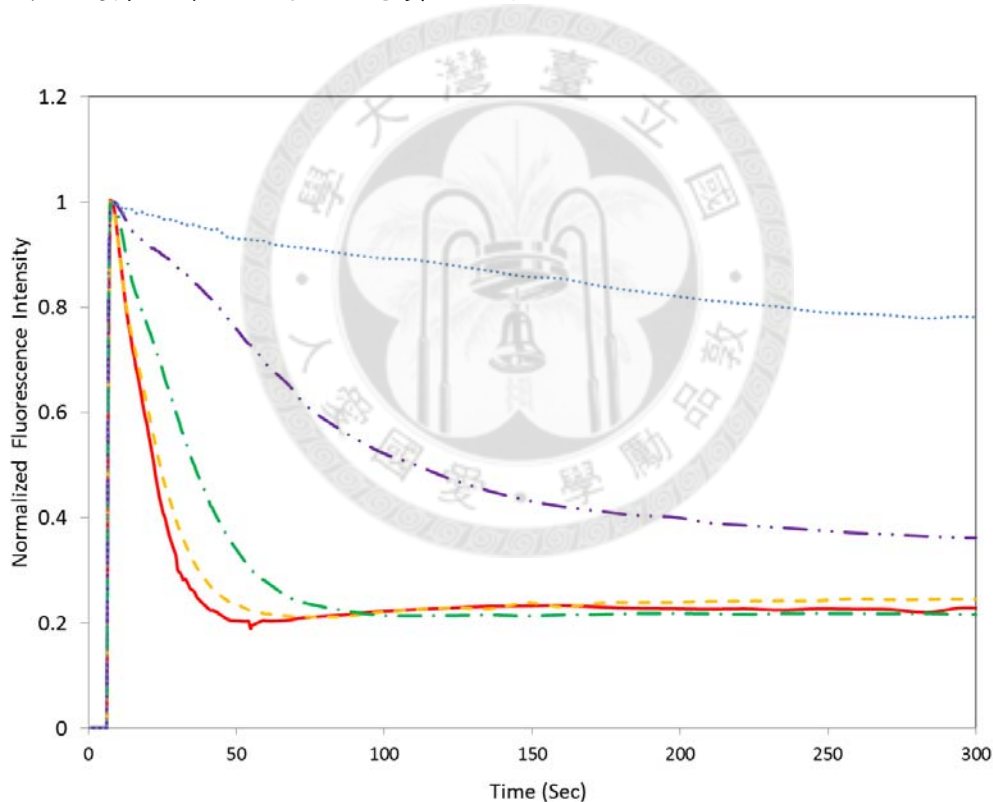


圖 4-6 不同處理組之螢光淬息曲線經過正規化後螢光強度與時間關係圖

4.3.4 動態螢光指標 (DFI) 之建立

如前研究結果顯示，當樣本遭受嚴重水份逆境時，其螢光淬息曲線將相當平緩，需經過 300 秒方可達穩定狀態。為縮短取像時間，本研究提出一個動態螢光

指標 (dynamic fluorescence index, DFI)。DFI 之定義為螢光淬息曲線與 F_m 至 F_e 直線間之最大垂直距離，其中 F_e 為激發後 100 至 300 秒間之螢光影像平均強度。 F_e 會隨苗株種類不同而異，本論文以甘藍苗為研究對象，其 F_e 之決定如圖 4-7 所示，自 100 秒至 300 秒每間隔 10 秒取一個 F_e 值，可得到 21 筆 DFI 值，將此 21 筆 DFI 值與苗株之水份潛勢進行相關性分析，其結果如圖 4-9 所示，可以看出 690 nm、720 nm、740 nm 三個波段的相關係數 r 的表現均呈現先上升到最高點後逐漸下降，其中以 720 nm、740 nm 的表現較 690 nm 佳。就全體表現而言，三個波段的相關係數 r 從第 120 秒起均高於 0.85 以上，其中以 720 nm 在第 170 秒的相關係數 $r=0.944$ 表現最佳，略高於同時段的 740 nm 的表現。因此就預測甘藍苗株水份潛勢而言，以使用 720 nm 波長之第 170 秒的動態螢光指標 (DFI) 進行預測 (如圖 4-8)，將會有很好的結果。

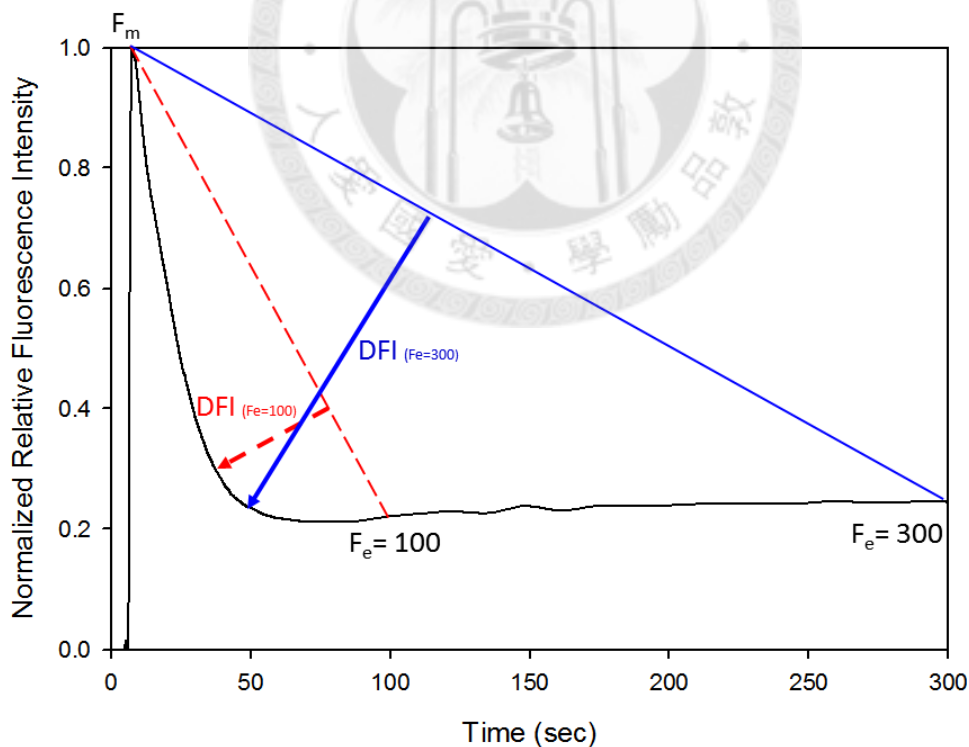


圖 4-7 F_e 分別在第 100 秒及第 300 秒的動態螢光指標 (DFI) 示意圖

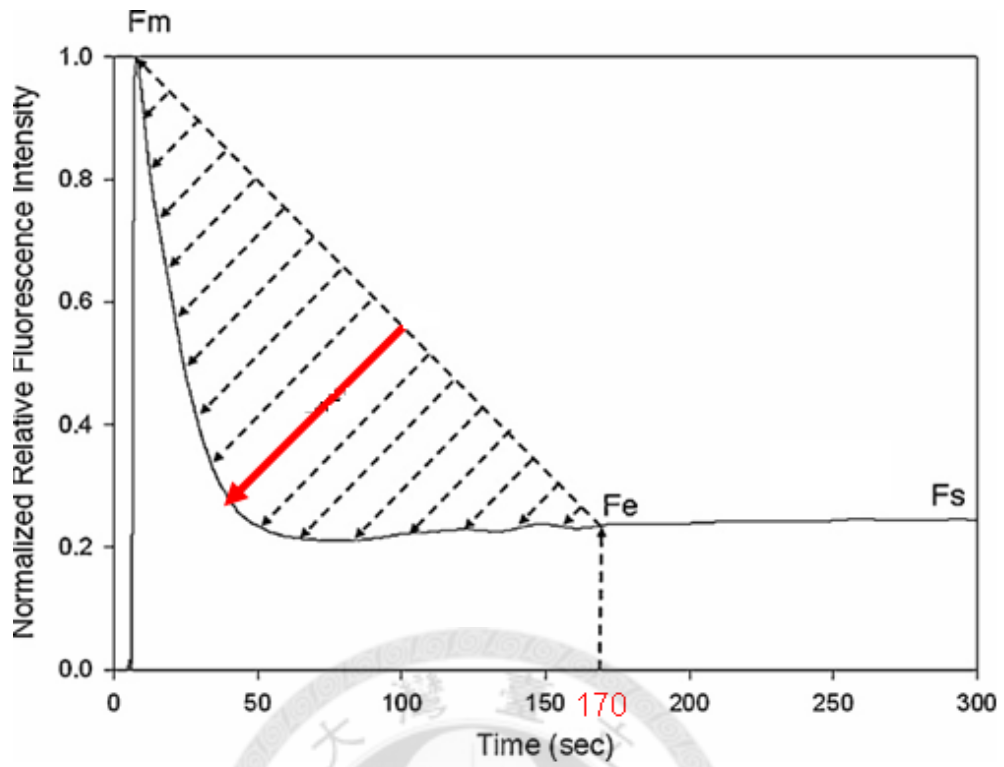


圖 4-8 動態螢光指標 (DFI) 在 170 秒示意圖

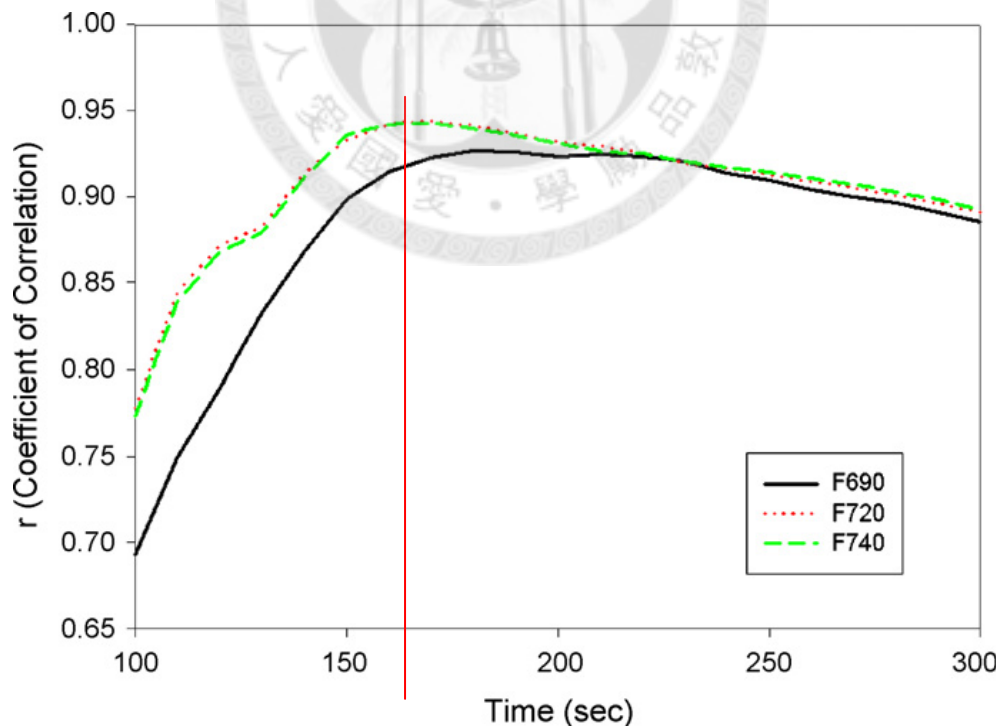


圖 4-9 三個不同波段之葉片水份潛勢與動態螢光指標 (DFI) 之關係

由於利用傳統指標 Rfd 與 F_m/F_s 時每只攝影機需要拍攝完 500 張影像，需要 300

秒才能求得 F_s 。而利用動態螢光指標 (DFI) 僅需要 170 秒的就可以得很好的結果，對苗株進行檢測時，可大幅縮短檢測時間，提升檢測速度。

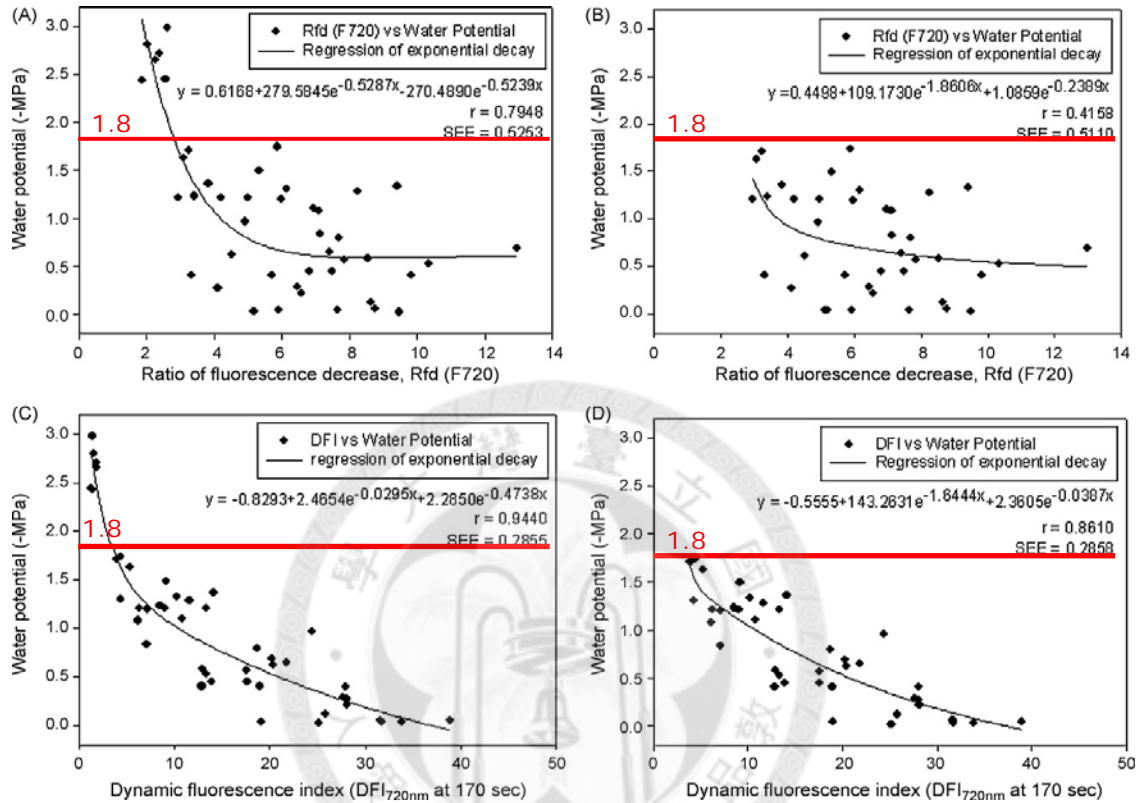


圖 4-10 甘藍苗株葉片水份潛勢與傳統指標 Rfd 及動態螢光指標 DFI 之關係圖

本研究為比較傳統螢光指標 Rfd 及動態螢光指標 DFI，對預測甘藍苗株水份潛勢之能力，利用指數衰減迴歸進行水份潛勢分別與 720 nm 波長之 Rfd 與 DFI 數據進行相關性分析，其結果如圖 4-10 (A) 及圖 4-10 (C) 所示，使用 DFI 之相關係數為 $r = 0.944$ ($SEE = 0.286$)，遠優於使用 Rfd 之相關係數 $r = 0.795$ ($SEE = 0.525$)。若將水份潛勢數據小於 -1.8Mpa 的樣本去除之後；也就是剔除遭遇高水份逆境之樣本，僅留下低水份逆境之樣本。其分析結果如圖 4-10 (B) 及圖 4-10 (D) 所示，使用 DFI 之相關係數 r 由原來之 0.944 微降至 0.861 ， SEE 則保持原有之 0.286 沒有變動。使用 Rfd 之相關係數 r 則由原來之 0.795 降至 0.416 ， SEE 由原有之 0.525

微微降低至 0.511。上述之各項數據整理後如表 4-2 所示，此結果說明了動態螢光指標 (DFI) 較傳統之螢光指標 Rfd 對預測甘藍苗株葉片水份潛勢之能力較佳，尤其對僅遭受低水份逆境之苗株更能突顯其優越的預測能力。

表 4-2 Rfd 和 DFI 指標之相關係數和預測標準差對照表

Regression / Equation category	Full sample set		*Selected subset	
	r	**SEE	r	**SEE
Rfd vs WP / Exponential decay (double, 5 parameters)	0.7948	0.5253	0.4158	0.5110
DFI vs WP / Exponential decay (double, 5 parameters)	0.9440	0.2855	0.8610	0.2858

*Selected：把水份潛勢低於 -1.8 MPa 的樣本移除。

**SEE：預測標準差

4.4 結論

本研究使用藍光 LED 多通道螢光光譜影像系統量測甘藍苗株葉片，能有效量測其葉綠素螢光反應，並建立 690 nm、720 nm、740 nm 三個波長之螢光淬息曲線，及求取其最大螢光值 F_m 與穩態螢光值 F_s 。本研究已成功建立一個動態螢光指標 (DFI)，僅需耗時 170 秒即能以 720 nm 單波長之螢光影像預測甘藍苗株葉片之水份潛勢，其預測能力更優於傳統使用 Rfd 指標，特別於水份潛勢大於 -1.8Mpa，當苗株遭遇低水份逆境時，仍保持相當不錯的預測能力，且可縮短檢測時間，提升檢測速度。此新建立之指標可作為日後探討植物遭受水份逆境研究時，提供一個有效、快速、及非破壞的檢測方法。

第五章 總結與建議

5.1 總結

本研究已成功開發螢光多光譜影像系統，並利用此系統量測分析蔬菜苗株水份及水潛勢。建立之系統具有非破壞性、非侵入式之檢測特性，採用藍光 LED 光源作為激發光源，並開發可調式燈座，可使其系統光源照射均勻，以快速四通道影像擷取系統進行螢光多光譜影像之擷取，能擷取 460 nm、690 nm、720 nm、740 nm 四個波長之螢光影像，滿足螢光動態表現上所需之時間解析度。系統以 Visual C++ 程式撰寫平台，並開發螢光數位影像處理演算法，可將擷取之螢光影像資料轉換成螢光淬熄曲線，並求出其 F_m 、 F_s 、 Rfd 、 F_m/F_s 等螢光指標。使用傳統之螢光指標 Rfd 與 F_m/F_s 探討甘藍苗株葉片水份含量之關係，其結果得知，以 690 nm 波長之 Rfd 及 F_m/F_s 兩個螢光指標之相關係數 r 值相等且為最佳，均達 0.906 (SEC=0.084)。研究更進一步建立動態螢光指標 (DFI) 以達到更快速、更精準進行蔬菜苗株水份逆境的分析。使用 DFI 螢光指標評估甘藍苗株葉片水份潛勢之關係，僅需耗時 170 秒即能以 720 nm 單波長之螢光影像預測甘藍苗株葉片之水份潛勢，較傳統使用 Rfd 指標大幅縮短預測時間，提升預測速度。其預測能力更優於傳統使用 Rfd 指標，特別於水份潛勢大於 -1.8Mpa，當苗株遭遇低水份逆境時，仍保持相當不錯的預測能力。此新建立之指標可作為日後探討植物遭受水份逆境研究時，提供一個有效、快速、及非破壞的檢測方法。

5.2 建議

1. 本研究已經完成多通道螢光光譜影像系統之開發，並由螢光淬息曲線建立動態螢光指標，可以在短時間對苗株水份逆境進行分析之基礎研究，本研究因為具有多通道、即時、非破壞性檢測等特色，可進一步進行研究以應用於其他作物水份逆境之研究。
2. 利用本研究完成的系統在苗株水份逆境的偵測時間是 170 sec，比傳統指標需要 300 sec 已經縮短將近一半的時間。當在進行螢光淬息曲線的數據分析時，發現可以進一步探討斜率、角度及三角形面積相關的指標並與含水率及水份潛勢進行相關性探討，期能更縮短偵測時間。
3. 本研究已經完成甘藍苗株水份逆境之探討，利用本系統擷取之螢光光譜影像，可以進行與作物其他生理相關之研究，例如：探討作物遭受病蟲害、鹽份逆境、養份（氮、磷、鉀）逆境等之研究。
4. 在螢光淬息曲線開始陡升的剎那，會產生初始飽和螢光 F_0 ，若能把 F_0 與螢光淬息曲線合併，一起討論其相關的變化，為作物螢光影像研究方面可以進一步探討的課題。
5. 目前已經建立完成甘藍苗水份逆境與動態螢光指標 (DFI) 兩者關係的檢量線，建議可以建立其他不同作物的檢量線，以擴充資料庫資訊，對不同逆境的評估將更有幫助。

參考文獻

- 林安秋。1984。作物之光合作用。台北：臺灣商務印書館
- 易希道。1999。植物生理學。台北：正中書局。
- 廖玉琬、徐善德、謝永祥、吳弘達、鍾仁彬。1999。植物生理學。台北：啟英文化事業有限公司。
- 蕭世傑、陳世銘、楊宜璋、陳加增、莊永坤、陳毓良。2010。同步多通道螢光光譜影像系統建立及其檢測環境之研究。農業機械學刊 19(4): 93-108。
- Agati, G., C. Galardi, E. Gravano, A. Romani, and M. Tattini. 2002. Flavonoid distribution in tissues of *phillyrea latifolia* L. leaves as estimated by microspectrofluorometry and multispectral fluorescence microimaging. *Photochemistry Photobiology* 76 (3), 350-360.
- Babani, F., H. K. Lichtenthaler, and P. Richter. 1996. Changes of chlorophyll fluorescence signatures during greening of etiolated barley seedlings as measured with the CCD-OMA fluorometer. *Plant Physiology* 148, 471-477.
- Babani, F., and H. K. Lichtenthaler. 1996. Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in Etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO₂ assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *Plant Physiology* 148, 555-566.
- Baker, N. R., K. Oxborough, T. Lawson, and J. I. L. Morison. 2001. High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves. *Journal of Experimental Botany* 52 (356), 615-621.
- Barbagallo, R., K. Oxborough, K. E. Pallett, and N. R. Baker. 2003. Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 132:485-493.
- Bolhar-Nordenkamp, H. R., and G. Oquist. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: A Field and Laboratory Manual*. 193-206.

Buschmann, C., J. Schweiger, H. K. Lichtenthaler, and P. Richter. 1996. Application of the Karlsruhe CCD-OMA LIDAR-fluorosensor in stress detection of plants. *Journal of Plant Physiology* 148 (5), 548-554.

Buschmann, C. 2007. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research* 92, 261-271.

Ceccato, P., S. Flasse, S. Tarantola, S. Jacquemoud, and J. M. Gregoire. 2001. Detecting vegetation leaf water content using reflectance in the optical domain. *Remote Sens. Environ.* 77(1): 22-33.

Cervantes-Martinez, J., R. Flores-Hernandez, B. Rodriguez-Garay, and F. Santacruz-Ruvalcaba. 2002. Detection of bacterial infection of agave plants by laser-induced fluorescence. *Appl. Optics* 41(13): 2541-2545.

Chaerle, L., and D. V. D. Straeten. 2000. Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends in Plant Science* 5(11): 495-501.

Chaerle, L., S. Lenk, I. Leinonen, H. G. Jones, D. Van Der Straeten, and C. Buschmann. 2009. Multi-sensor plant imaging: towards the development of a stress-catalogue. *Biotechnology Journal* 4, 1152-1167.

Chappelle, E. W., F. M. Wood, J. E. McMurtrey, and W. W. Newcourt. 1984a. Laser-induced fluorescence of green plants. 1: a technique for the remote detection of plant stress and species differentiation. *Appl. Optics* 23:134-138.

Chappelle, E. W., F. M. Wood, J. E. McMurtrey, and W. W. Newcourt. 1984b. Laser-induced fluorescence of green plants. 2: LIF caused by nutrient deficiencies in corn. *Appl. Optics* 23:139-142.

Chappelle, E. W., F. M. Wood, J. E. McMurtrey, and W. W. Newcourt. 1985. Laser-induced fluorescence of green plants. 3: LIF spectral signatures of five major plant types. *Appl. Optics* 24:74-80.

Chappelle, E. W., M. Kim, and J. E. McMurtrey. 1991. Identification of the pigment responsible for the blue fluorescence band in the laser induced fluorescence (LIF) spectra of green plants, and the potential use of this band in remotely estimating rates of photosynthesis. *Remote Sensing of Environment* 36 (3), 213-218.

- Choné, X., C. Van Leeuwen, D. Dubourdiou, and J. P. Gaudillère. 2001. Stem water potential is a sensitive Indicator of grapevine water status. *Ann. Bot. (London)* 87 (4), 477-483.
- Conroy, J. P., R. M. Smillie, M. Küppers, D. I. Bevege, and E. W. Barlow. 1986. Chlorophyll a fluorescence and photosynthetic and growth responses of *Pinus radiata* to phosphorus deficiency, drought, stress, and high CO₂. *J. Plant Physiol.* 81: 423-429.
- Cornic, G. 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5 (5), 187-188.
- Corp, L. A., J. E. McMurtrey, E. W. Chappelle, M. S. Kim, and C. S. T. Daughtry. 1996. Optimal fluorescence excitation wavelengths for detection of stress in vegetation. *IEEE, IGARSS Digest*: 1812-1815.
- Corp, L. A., E. W. Chappelle, J. E. McMurtrey, C. L. Mulchi, C. S. T. Daughtry, and M. S. Kim. 2000. Advances in fluorescence sensing systems for the remote assessment of nitrogen supply in field corn. *IEEE, IGARSS Digest* :351-353.
- Corp, L. A., E. M. Middleton, J. E. McMurtrey, P. K. E. Campbell, M. S. E. W. Kim, and L. M. B. Chappelle. 2002. Fluorescence imaging techniques for monitoring vegetation. *IEEE, IGARSS Digest*: 3056-3058.
- Costa, E. S., R. Bressan-smith, J. G. Oliverira, and E. Campostrini. 2003. Chlorophyll a fluorescence analysis in response to excitation irradiance in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp) submitted to high temperature stress. *Photosynthetica* 41(1):77-82.
- Daley, P. F. 1995. Chlorophyll fluorescence analysis and imaging in plant stress and disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17 (2), 167–173.
- Djekoun, A., and C. Planchon. 1991. Tolerance to low leaf water potential in soybean genotypes. *Euphytica* 55, 247-253.
- Flexas, J., J. M. Briantais, Z. Cerovic, H. Medrano, and I. Moya. 2000. Steady-state and maximum chlorophyll fluorescence responses to water stress in grapevine leaves: A new remote sensing system. *Remote Sensing of Environment* 73 (3), 283-297.

- Govindjee, D. W. J. S., D. C. Fork, and P. A. Armond. 1981. Chlorophyll a fluorescence transient as an indicator of water potential of leaves. *Plant Science Letters* 20, 191-194.
- Gray, G. R., B. J. Hope, X. Qin, B. G. Taylor, and C. L. Whitehead. 2003. The characterization of photoinhibition and recovery during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* using chlorophyll fluorescence imaging. *Physiologia Plantarum* 119:365-375.
- Havaux, M., and R. Lannoye. 1983. Chlorophyll fluorescence induction: A sensitive indicator of water stress in maize plants. *Irrigation Science* 4 (2), 147-151.
- Heisel, F., M. Sowinska, J. A. Mieke, M. Lang, and H. K. Lichtenthaler. 1996. Detection of nutrient deficiencies of maize by laser induced fluorescence imaging. *Plant Physiology* 148 (5), 622-631.
- Herppich, W. B., and D. J. Willert. 1995. Dynamic changes in leaf bulk water relations during stomatal oscillations in mangrove species. Continuous analysis using a dewpoint hygrometer. *Physiologia Plantarum* 94 (3), 479-485.
- Hsiao, S. C., S. Chen, and C. T. Chen. 2002. Hyper-spectra and fluorescence analyses of the chlorophyll content in vegetable. In: *Proceedings of International Symposium on Automation and Mechatronics of Agricultural and Bioproduction Systems*. National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, pp. 669-673.
- Hsiao, S. C., S. Chen, I. C. Yang, C. T. Chen, C. Y. Tsai, Y. K. Chuang, F. J. Wang, T. S. Lin, and Y. M. Lo. 2010. Evaluation of plant seedling water stress using dynamic fluorescence index with blue LED-based fluorescence imaging. *Computer and Electronics in Agriculture* 72: 127-133.
- Hunt, E. R. J., B. N. Rock, and P. S. Nobel. 1987. Measurement of leaf relative water content by infrared reflectance. *Remote Sensing of Environment* 22 (3), 429-435
- Hunt, E. R. J., and B. N. Rock. 1989. Detection of changes in leaf water content using Near- and Middle-Infrared reflectances. *Remote Sensing of Environment* 30 (1), 43-54.

- Jackson, R. D., S. B. Idso, R. J. Reginato, and P. J. J. Pinter. 1981. Canopy temperature as a crop water stress indicator. *Water Resource Research* 17 (4), 1133-1138.
- Jarvis, P. G. 1976. The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 273 (927), 593-610.
- Kautsky, H., and A. Hirsch. 1931. Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften*. 19, 964-964.
- Kerizek, D. T., E. M. Middleton, R. K. Sandhu, and M. S. Kim. 2001. Evaluating UV-B effects and EDU protection in cucumber leaves using fluorescence images and fluorescence emission spectra. *Journal of Plant Physiology* 158 (1), 41-53.
- Kim, M. S., J. E. McMurtrey, C. L. Mulchi, C. S. T. Daughtry, E. W. Chappelle, and Y. R. Chen. 2001a. Stead-state multispectral fluorescence imaging system for plant leaves. *Applied Optics*. 40(1):157-166.
- Kim, M. S., Y. R. Chen, and P. M. Mehl. 2001b. Hyperspectral reflectance and fluorescence imaging system for food quality and safety. *Transactions of the ASAE* 44 (3), 721-729.
- Kim, M. S., A. M. Lefcour, Y. R. Chen, I. Kim, D. E. Chan, and K. Chao. 2002. Multispectral detection of fecal contamination on apples based on hyperspectral imagery: Part II. Application of hyperspectral fluorescence imaging. *Transactions of the ASAE* 45 (6), 2039-2047.
- Kim, M. S., A. M. Lefcourt, and Y. R. Chen. 2003. Multispectral laser-induced fluorescence imaging system for large biological samples. *Applied Optics* 42 (19), 3927-3933.
- Kocsanyi, L., M. Haitz, and H. K. Lichtenthaler. 1988. Measurement of the laser-induced chlorophyll fluorescence kinetics using a fast acoustooptic device. *Applications of Chlorophyll Fluorescence*. H. K. Lichtenthaler, Kluwer Academic Publishers, 99-107.
- Kramer, P.J. 1988a. Measurement of plant water status: Historical perspectives and current concerns. *Irrigation Science* 9 (4), 275-287.

- Kramer, P.J. 1988b. Changing concepts regarding plant water relations. *Plant, Cell & Environment* 11 (7), 565-568.
- Krizek, D. T., E. M. Middleton, R. K. Sandhu, and M. S. Kim. 2001. Evaluation UV-B effects and EDU protection in cucumber leaves using fluorescence images and fluorescence emission spectra. 158:41-53.
- Lang, M., H. K. Lichtenthaler, M. Sowinska, F. Heisel, and J. A. Miehe. 1996. Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *Plant Physiology* 148(5), 613–621.
- Langsdorf, G., C. Buschmann, M. Sowinska, F. Babani, M. Mokry, F. Timmermann, and H. K. Lichtenthaler. 2000. Multicolor fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation. *Photosynthetica* 38 (4), 539-551.
- Lauer, M. J., J. S., and Boyer. 1992. Internal CO₂ measured directly in leaves 1 abscisic acid and low leaf water potential cause opposing effects. *Plant Physiology* 98 (4), 1310–1316.
- Lichtenthaler, H. K., and U. Rinderle. 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* 19 Supplement 1, s29-s85.
- Lichtenthaler, H. K., M. Lang, M. Sowinska, F. Heisel, and J. A. Miehe. 1996. Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *Plant Physiology* 148 (5), 599-612.
- Lichtenthaler, H. K., and J. A. Miehe. 1997. Fluorescence imaging as a diagnostics tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2 (8), 316–320.
- Lichtenthaler, H. K., N. Subhash, O. Wenzel, and J. A. Miehe. 1997. Laser-induced imaging of blue/red and blue/far-red fluorescence ratios, F440/F690 and F440/F740, as a means of early stress detection in plants. *IEEE, IGARSS Digest*: 1799-1800.
- Lichtenthaler, H. K. 1998. Plant stress detection by reflectance and fluorescence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851 (1 stress of lif).
- Lichtenthaler, H. K., and F. Babani. 2000. Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence.

Journal of Plant Physiology Biochemistry 38 (11), 889-895.

Lichtenthaler, H. K., G. Langsdorf, S. Lenk, and C. Buschmann. 2005. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica* 43 (3), 355–369.

Lichtenthaler, H. K., F. Babani, and G. Langsdorf. 2007. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity in sun and shade leaves of trees. *Photosynthesis Research*. 93(1):235-244.

Lüdeker, W., H.-G. Dahn, K. P. Günther, and H. Schulz. 1999. Laser-induced fluorescence - A method to detect the vitality of Scots pines. *Remote Sensing of Environment* 68 (3), 225-236.

Mantha, S. V., G. A. Johnson, and T. A. Day. 2001. Evidence from action and fluorescence spectra that UV-induced violet-blue-green fluorescence enhances leaf photosynthesis. *Photochemistry Photobiology* 73 (3), 249-256.

Meyer, S., A. Cartelat, I. Moya, and Z. G. Cerovic. 2003. UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *Journal of Experimental Botany* 54 (383), 757-769.

Michael L., K. Hartut Lichtenthaler, Malgorzata Sowinska, Francine Heisel, and Joseph A. Miede. 1996. Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *Plant Physiol* Vol. 148. pp. 613-621

Muller, N. J. C. 1874. Beziehungen zwischen assimilation, absorption and fluoreszenz in chlorophyll as lebenden blattes. *Jahrbucher Wissenschaftliche Botanik* 9:42-49.

Norikane, J. H., and K. Kurata. 2001. Water stress detection by monitoring fluorescence of plants under ambient light. *Transactions of the ASAE* 44 (6), 1915-1922.

Omasa, K. 1990. Image instrumentation methods of plant analysis. *Modern Methods of Plant Analysis*. Vol. 11. pp.203-243.

Otsu, N. 1979. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* SMC-9 (1), 62-66.

- Papageorgiou GC., and Govindjee (eds). 2004. Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis. Springer, Dordrecht.
- Saito, Y., M. Kanoh, K. Hatakw, T. D. Kawahara, and A. Nomura. 1998. Investigation of laser-induced fluorescence of several natural leaves for application to lidar vegetation monitoring. *Appl. Optics* 37(3): 431-437.
- Schreiber, U., and W. Bilger. 1987. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In "Plant response to stress. Functional analysis in mediterranean ecosystems", ed. J. Tenhunen, F. Catarino, O. Lange and W. Oechel. Berline Heidelberg: Springer-Verlag. 27-53.
- Schweiger, J., M. Lang, and H. K. Lichtenthaler. 1996. Differences in fluorescence excitation spectra of leaves between stressed and non-stressed plants. *Journal of Plant Physiology* 148 (5), 536-547.
- Siebke, K., and E. Weis. 1995a. Assimilation images of leaves of *Glechoma hederacea*: Analysis of non-synchronous stomata reated oscillations. *Planta* 196: 155-165.
- Siebke, K., and E. Weis. 1995b. Imaging chlorophyll a fluorescence in leaves: Topography of photosynthetic oscillations in leaves of *Glechoma hederacea*. *Photosynth. Res.* 45:225-237.
- Soukupová, J., S. Smatanova, L. Nedbal, and A. Jegorov. 2003. Plant response to destruxins visualized by imaging of chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum* 118:399-405.
- Subhash N., and C. Mohanan. 1997. Curve-fit analysis of chlorophyll fluorescence spectra: Application to nutrient stress detection in sunflower. *Remote Sensing of Environment.* 60(3): 347-356.
- Subhash, N., O. Wenzel, and H. K. Lichtenthaler. 1999. Changes in blue-green chlorophyll fluorescence emission and fluorescence ratios during senescence of tobacco plants. *Remote Sens. Environ.* 69:215-223.
- Subhash, N., C. N. Mohanan, R. J. Mallia, and V. Muralidharan. 2004. Quantification of stress adaptation by laser-induced fluorescence spectroscopy of plants exposed to engine exhaust emission and drought. *Functional Plant Biology* 31 (7), 709–719.

Takeuchi, A., Y. Saito, M. Kanoh, T. D. Kawahara, A. Nomura, H. Ishizawa, T. Matsuzawa, and K. Lomatsu. 2002. Laser-induced fluorescence detection of plant and optimal harvest time of agricultural products (Lettuce). *Applied Engineering in Agriculture* 18 (3), 361-366.

Tezara, W., V. J. Mitchell, S. D. Driscoll, and D. W. Lawlor. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401 (6756), 914-917.

