

Krzysztof PACEWICZ, Andrzej GREGORCZYK

PORÓWNANIE OCEN ZAWARTOŚCI CHLOROFILU CHLOROFILOMETRAMI SPAD-502 I N-TESTER

COMPARISON VALUES OF CHLOROPHYLL CONTENT BY CHLOROPHYLL METER SPAD-502 AND N-TESTER

Katedra Uprawy Roli, Roślin i Doświadczalnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet
Technologiczny w Szczecinie
ul. Juliusza Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, krzysztof.pacewicz@zut.edu.pl

Abstract. The present study was the determination the correlation between values of two chlorophyll meters: SPAD-502 and N-tester, indulging in comparison scientific results with these two different devices. To this purpose, the six kinds of cereals in stage of heading were examined on “index of greenest”: oat, barley Rataj and Nagrad, triticale, wheat and rye. Statistical analysis carried out afterwards demonstrated that, between measurements received from two chlorophyll meter founded high efficiency of linear regression. To recount values between the chlorophyll meters can be use equation: (N-tester reading) = 14.5·(SPAD reading) – 73.4.

Słowa kluczowe: chlorofil, chlorofilometr, regresja liniowa, zboże.

Key words: chlorophyll, chlorophyll meter, corn, linear regression.

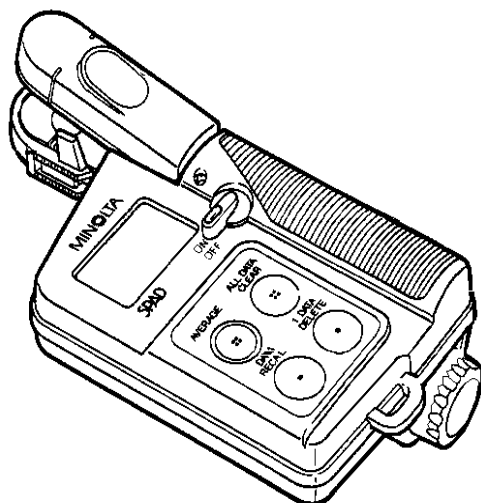
WSTĘP

Zawartość chlorofilu oznacza się z reguły metodą Arnona (1956). Metoda ta jest pracochłonna i niszczy badany materiał. Możemy posłużyć się, zamiast niej, urządzeniami zwanymi chlorofilometrami. Umożliwiają one ocenę zawartości całkowitego chlorofilu na podstawie tzw. indeksu zieloności liścia. Do zalet chlorofilometrów można zaliczyć: małe rozmiary urządzenia i zasilanie bateryjne (pozwalające na wykonywanie pomiarów w terenie), prostotę obsługi, krótki czas pomiaru (dwie sekundy) oraz nieinwazyjność metody. Dzięki tym zaletom chlorofilometry mogą być stosowane w badaniach naukowych (Piekielek i Fox 1992; Piekielek i in. 1995; Gregorczyk i Raczyńska 1997; Gregorczyk i in. 1998; Xu i in. 2000; Schlemmer i in. 2005) i w praktyce rolniczej (Kowalczyk-Juśko i Kościak 2002; Ramesh i in. 2002; Singh i in. 2002; Ortuzar-Iragorri i in. 2005; Spanner i in. 2005; Samborski i in. 2006). Na rynku znajdują się dwie wersje chlorofilometru o podobnym sposobie działania – Minolta SPAD-502 i N-tester, różniące się skalami indeksu zieloności liścia.

Celem pracy było znalezienie – dla wybranych gatunków zbóż – zależności między wartościami odczytów z obu typów chlorofilometrów, co umożliwiło weryfikację hipotezy o porównywalności wyników oznaczeń za pomocą tych dwóch przyrządów.

MATERIAŁY I METODY

Indeks zieloności liścia był oceniany podczas badania następujących gatunków zbóż, będących w fazie kłoszenia (wiechowania): owsa, jęczmienia odmian 'Rataj' i 'Nagrad', pszenżyta, pszenicy i żyta. Do oznaczeń wybierano liście o zróżnicowanej zawartości chlorofilu w celu uzyskania jak największego zakresu wskazań przyrządów. Następnie wyznaczono 11 punktów na liściach traktowanych jako powtórzenia i mierzono indeks zieloności obu typami chlorofilometrów. Budowa i zasada działania obu przyrządów jest identyczna. Zasadniczą ich częścią jest klips zaopatrzony z jednej strony w źródło światła, a z przeciwnej – w fotodetektor (rys. 1). Pod otwarty klips pomiarowy wkłada się analizowany liść. Po zamknięciu przyrządu źródło światła na jednym ramieniu klipsa prześwietla liść. Ilość światła, która przeszła przez liść, jest odczytywana przez fotodetektor, umieszczony na drugim ramieniu. Fotodetektor, mierząc promieniowanie o długości fali 650 nm, może określić (znając pełną dawkę światła ze źródła) ilość światła zaabsorbowaną przez chlorofil. Dodatkowo mierzone jest światło o długości fali 940 nm, absorbowane przez pozostałe elementy struktury. Służy to do korekcji wyniku wyliczanego przez mikroprocesor i podawanego w jednostkach umownych na wyświetlaczu. Po dwóch sekundach można przeprowadzić następny pomiar.



Rys. 1. Chlorofilometr SPAD-502
Fig. 1. Chlorophyll meter SPAD-502

W celu statystycznej oceny wyników odczyty „indeksu zieloności” były analizowane osobno dla każdego z badanych zbóż, za pomocą modelu regresji liniowej:

$$Y = \alpha + \beta X$$

Parametry powyższego modelu estymowano na podstawie wyników próby, według równania prostej regresji:

$$y = a + bx$$

gdzie:

- y – odczyt z chlorofilometru N-tester,
- x – odczyt z chlorofilometru SPAD-502,

a – wyraz wolny,
 b – współczynnik kierunkowy.

Dla każdego z sześciu obiektów wyliczono wartość współczynnika korelacji, oszacowano istotność prostej regresji oraz wykonano analizę wariancji w regresji. Istotność współczynnika kierunkowego prostej i wyrazu wolnego oceniono za pomocą testu t Studenta. W celu oszacowania istotności różnic między prostymi porównano parametry modeli liniowych, wykorzystując procedurę analizy wariancji (Elandt 1964).

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyliczone równania regresji dla poszczególnych gatunków wykazały wysokoistotną liniową zależność między odczytami z obu urządzeń (tab. 1). Wartości współczynnika korelacji dla wszystkich gatunków były nie mniejsze od 0,979.

Tabela 1. Równania regresji między odczytami z chlorofilometru SPAD-502 (zmienna niezależna) i N-testera (zmienna zależna), współczynniki korelacji, istotności współczynników równania a i b oraz wartość statystyki F z analizy wariancji dla badanych gatunków

Table 1. Equations of regression between readings by chlorophyll meter SPAD-502 (independent variable) and N-tester (dependent variable), regression coefficients, significance of equation coefficients a and b also F -ratio by analysis of variance for investigation species

Gatunek Species	Równanie regresji $y = a + bx$ Equation of regression	Współczynnik korelacji Correlation coefficient	Istotność współczynników równania (wartość p) Significance of equation parameters (p -value)		F_{emp}
			a	b	
Jęczmień odmiany Rataj Barley cv. Rataj	$y = -81,2 + 14,7x$	0,987	0,037	< 0,001	333,3**
Jęczmień odmiany Nagrad Barley cv. Nagrad	$y = -82,8 + 14,8x$	0,997	0,002	< 0,001	1218**
Żyto Rye	$y = -78,7 + 14,6x$	0,989	0,053	< 0,001	399,4**
Pszenica odmiany Eta Wheat cv. Eta	$y = -78,1 + 14,6x$	0,979	0,177	< 0,001	204,8**
Owies odmiany Bajka Oat cv. Bajka	$y = -43,5 + 13,4x$	0,980	0,279	< 0,001	217,1**
Pszenżyto Triticale	$y = -13,0 + 13,4x$	0,981	0,780	< 0,001	227,6**

**Wartość istotna na poziomie 0,01 – Significant value at the 0.01 level.

Porównanie współczynników równań i ich istotności umożliwiło podział badanych gatunków na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowiły odmiany jęczmienia 'Rataj' i 'Nagrad', żyto i pszenica odmiany 'Eta'. W grupie tej współczynniki kierunkowe prostej i wyrazy wolne miały

podobne wartości. Ocena ich wiarygodności testem t Studenta wykazała istotność uzyskanych wyników (jedynie współczynnik a dla pszenicy odmiany 'Eta' okazał się nieistotny, a dla żyta znajdował się na granicy istotności). Wartość współczynnika kierunkowego prostej wahała się w zakresie od 14,6 do 14,8, a wyrazu wolnego – od $-82,8$ do $-78,1$, jednocześnie wykazując duże podobieństwo analizowanych prostych.

Drugą grupę stanowiły odmiana owsa 'Bajka' i pszenżyto. Podobnie jak w pierwszej grupie, uzyskano wysoką ocenę wiarygodności współczynnika kierunkowego prostej. Był on jednak mniejszy, niż w pierwszej grupie, o 1,2 jednostki. Wyrazy wolne w tej grupie różniły się w większym stopniu, przy słabej statystycznej wiarygodności ich wartości. Wskazuje to na większy błąd, który powstał w trakcie pomiaru zawartości chlorofilu u odmian owsa 'Bajka' i pszenżyta. Mógł być on spowodowany zaburzeniami w rozmieszczeniu chlorofilu. Drobne plamki na liściu w połączeniu z niewielką powierzchnią, jaką analizują testowane urządzenia, prawdopodobnie zwiększyły przypadkowe różnice w odczycie indeksu zieloności w trakcie przekładania liścia do kolejnego urządzenia.

Na możliwość uzyskania różnic w pomiarach indeksu zieloności wskazują także prace innych autorów (Ginta i in. 2002; Richardson i in. 2002; Kowalczyk-Juško i Kościk 2002), w których zwraca się uwagę na różnice uzyskane w oznaczeniach w zależności m.in. od wieku rośliny, wyboru liścia do pomiaru, miejsca na liściu, dawki azotu, rodzaju gleby czy odmiany.

W celu oceny, czy można uzyskane proste zastąpić jedną wspólną prostą regresji dla wszystkich analizowanych gatunków, zweryfikowano – za pomocą testu F – dwie hipotezy zerowe. Zakładały one identyczność współczynników kierunkowych i identyczność wyrazów wolnych dla całej populacji.

Uzyskane wartości testu F (tab. 2) były podstawą stwierdzenia braku istotnych różnic między analizowanymi równaniami. Pozwoliło to na wyprowadzenie wspólnego równania regresji:

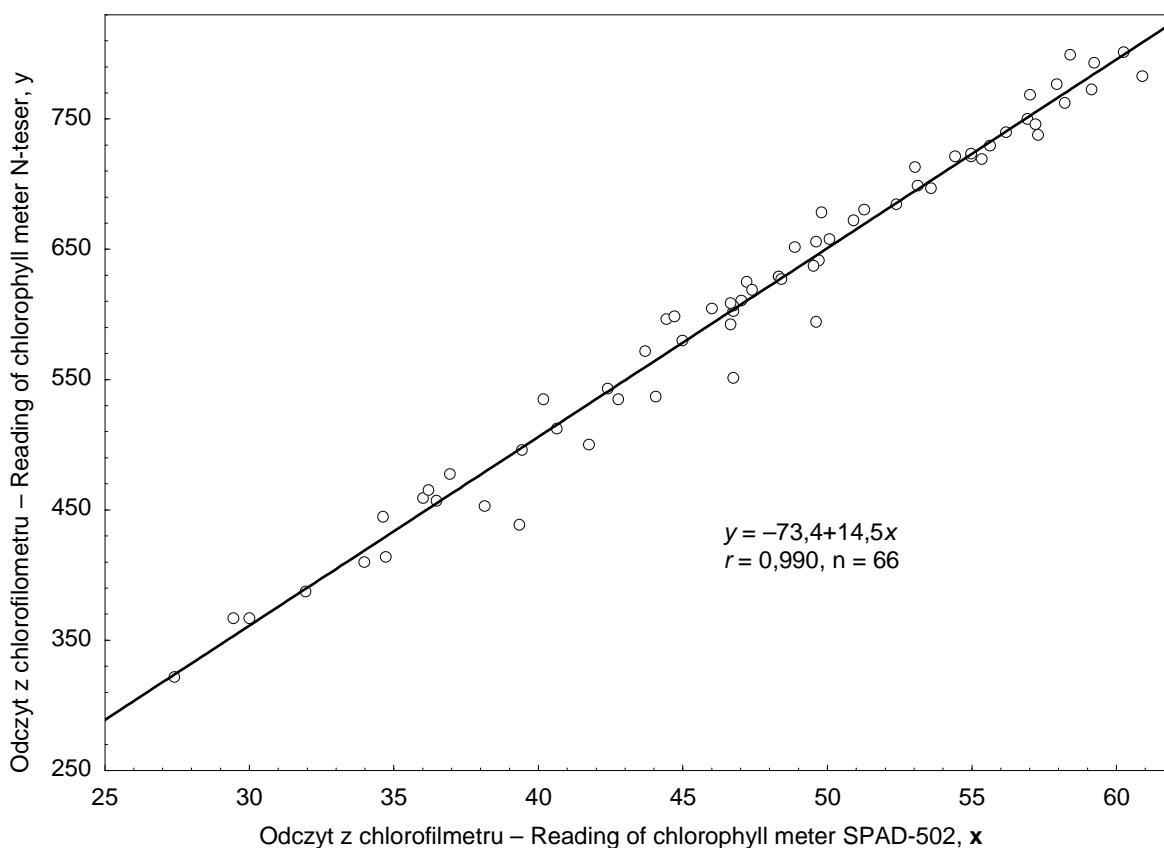
$$y = -73,4 + 14,5x$$

Tabela 2. Analiza wariancji weryfikująca hipotezę zakładającą brak różnic między parametrami modelu regresji liniowej $Y = \alpha + \beta X$

Table 2. Analysis of variance with verification of hypothesis, assumption not difference between parameters in linear regression model $Y = \alpha + \beta X$

Źródło zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	Suma kwadratów Sum of squares	Średni kwadrat Mean square	F_{emp}	Wartość p p -value
$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_6$					
W obrębie gatunków Within species	5	1016,16	203,23	0,670	0,648
Błąd – Error	54	16381,39	303,36		
$H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_6$					
W obrębie gatunków Within species	5	2319,55	464,91	1,57	0,182
Błąd – Error	59	17397,55	294,87		

Wartość współczynnika korelacji dla tej zależności między dwiema zmiennymi ($r = 0,990$) wskazuje na wysoki stopień dopasowania wspólnej prostej do punktów doświadczalnych, otrzymanych na podstawie pomiarów wykonanych w obu urządzeniach (rys. 2). Potwierdzają to wartości krytyczne testu t Studenta obu współczynników równania (ich poziom prawdopodobieństwa $p < 10^{-6}$) oraz uzyskana w analizie wariancji regresji wartość statystyki $F_{emp} = 3139$ ($p < 10^{-6}$).



Rys. 2. Wspólna prosta regresji między wartościami indeksu zieloności z chlorofilometru SPAD-502 (zmienna niezależna) i N-testera (zmienna zależna)

Fig. 2. General line regression between values of „index of greenest” by chlorophyll meter SPAD-502 (independent variable) and N-tester (dependent variable)

WNIOSEK

Stwierdzono wysoki stopień zależności o charakterze liniowym między odczytami z chlorofilometrów SPAD-502 i N-tester. Statystyczna analiza linii regresji dla odmiany jęczmienia ‘Rataj’ i ‘Nagrad’, owsa ‘Bajka’, pszenżyta, pszenicy i żyta wykazała, że do przeliczania odczytów między testowanymi chlorofilometrami można posłużyć się wspólnym równaniem regresji: (odczyt z N-testera) = $14,5 \cdot$ (odczyt z SPAD-502) – 73,4.

PIŚMIENICTWO

- Arnon D.J., Allen M.B., Whatley F.** 1956. Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 20 449–461.
- Elandt R.** 1964. *Statystyka matematyczna w zastosowaniu do doświadczeń rolniczych*. Warszawa, PWN.
- Giunta F., Motzo R., Deidda M.** 2002. SPAD readings and associated leaf traits in durum wheat, barley and triticale cultivars. *Euphytica* 125, 197–205.
- Gregorczyk A., Raczyńska A.** 1997. Badania korelacji między metodą Arnona a pomiarami zawartości chlorofilu za pomocą chlorofilometru. *Zesz. Nauk. AR Szczec.* 181, 119–123.
- Gregorczyk A., Raczyńska A., Pacewicz K.** 1998. Analiza krzywych wzorcowych zawartości chlorofilu dla podstawowych gatunków zbóż. *Biul. Magnezol.* 3 (1), 19–24.
- Kowalczyk-Juśko A., Kościk B.** 2002. Possible use of the chlorophyll meter (SPAD-502) for evaluating nitrogen nutrition of the Virginia Tobacco. *Elektron. J. Pol. Agric. Univ.* 5 (1), www.ejpau.media.pl/volume5/issue1/agronomy/art-05.html.
- Ortuzar-Iragorri M.A., Alonso A., Castellón A., Besga G., Estavillo J.M., Aizpurua A.** 2005. N-tester use in soft winter wheat – evaluation of nitrogen status and grain yield prediction. *Agron. J.* 97, 1380–1389.
- Piekielek W. P., Fox R. H.** 1992. Use of a chlorophyll meter to predict sidedress nitrogen requirements for maize. *Agron. J.* 84, 59–65.
- Piekielek W.P., Fox R.H., Toth J.D., Macneal K.E.** 1995. Use of a chlorophyll meter at the early dent stage of corn to evaluate nitrogen sufficiency. *Agron. J.* 87, 405–408.
- Ramesh K., Chandrasekaran B., Balasubramanian T.N., Bangarusamy U., Sivasamy R., Sankaran N.** 2002. Chlorophyll dynamics in rice (*Oryza sativa*) before and after flowering based on SPAD (chlorophyll) meter monitoring and its relation with grain yield. *J. Agron. Crop Sci.* 188 (2), 102–105.
- Richardson A.D., Duigan P.S., Berlyn P.G.** 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153 (1), 185–194.
- Samborski S., Kozak M., Rozbicki J.** 2006. Przydatność chlorofilometru SPAD–502 do określania plonu ziarna pszenżyta ozimego. *Folia Univ. Agric. Stetin, Ser. Agricultura* 247 (100), 157–162.
- Schlemmer M.R., Francis D.D., Shanahan J.F., Schepers J.S.** 2005. Remotely measuring chlorophyll content in corn leaves with differing nitrogen levels and relative water content. *Agron. J.* 97, 106–112.
- Singh B., Singh Y., Ladha J.K., Bronson K.F., Balasubramanian V., Singh J.** 2002. Chlorophyll meter – and leaf color chart – based nitrogen management for rice and wheat in northwestern. *India Agron. J.* 94, 821–829.
- Spanner D., Todd A.G., Navabi A., McKenzie D.B., Goonewardene L.A.** 2005. Can leaf chlorophyll measures at differing growth stages be used as an indicator of winter wheat and spring barley nitrogen requirements in Eastern Canada. *J. Agron. Crop Sci.* 191 (5), 393–399.
- Xu W., Rosenow D.T., Nguyen H.T.** 2000. Stay green trait in grain sorghum: relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. *Plant Breed.* 119 (4), 365–367.