

# 模擬衛星遙測估算甘蔗葉片葉綠素含量

黃文達<sup>1</sup> 許明晃<sup>2</sup> 楊志維<sup>2</sup> 陳建璋<sup>2</sup> 蔡養正<sup>1</sup> 張新軒<sup>1</sup> 楊棋明<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 國立台灣大學農藝學系

<sup>2</sup> 中央研究院生物多樣性研究中心

## 摘要

本研究以不同生育期第 60、90、360 及 540 天之甘蔗葉片為材料，進行葉片反射光譜測定，並以反射率模擬計算衛星遙測植生指數(vegetation index, VI)，估算其葉片之葉綠素(chlorophyll, Chl)含量。隨著生育日數的增加，甘蔗葉片葉綠素及類胡蘿蔔素含量逐漸減少。由反射光譜分析顯示，甘蔗葉片在 550 nm 與 710 nm 之反射率對色素含量變化具有最大敏感度。以近紅外光波段 750 nm 反射率分別與 710 nm 及 550 nm 反射率計算植生指數 SRVI、NDVI 與 GI、NDVI<sub>Green</sub>，以及寬波段平均反射率計算植生指數 SRVI<sub>broad</sub> 及 NDVI<sub>broad</sub> 後，與葉片色素含量進行迴歸分析，可得到葉綠素含量估算方程式。以此六組方程式估算正常生長之葉片葉綠素含量，其準確度相當高；但估算受逆境含花青素之葉片葉綠素含量時，則有明顯之誤差。本研究結果顯示利用反射光譜計算植生指數，非破壞性地估算正常生長狀況下之葉片葉綠素含量之變化，進而監測作物生長狀況，為有效可行的方法。

關鍵詞：甘蔗、反射光譜、反射率、衛星遙測、植生指數、葉綠素、敏感度、花青素。

# Mimicking satellite remote sensing of chlorophyll content in sugarcane (*Saccharum officinarum*) leaves

Wen-Dar Huang<sup>1</sup>, Ming-Huang Hsu<sup>2</sup>, Zhi-Wei Yang<sup>2</sup>, Jane-Chang Chen<sup>2</sup>, Yang-Zenq Tsai<sup>1</sup>, Shin-Shinge Chang<sup>1</sup>, and Chi-Ming Yang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106, Republic of China

<sup>2</sup> Research Center for Biodiversity, Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan 115, Republic of China

## Abstract

The reflectance spectra of sugarcane (*Saccharum officinarum*) leaves at 60, 90, 360 and 540 days after planting were measured to calculate vegetation indices to mimic satellite remotely estimate the chlorophyll content. The contents of pigments declined following the increasing of days after planting. The signature analysis of reflectance spectra indicated that the maximum sensitivity to chlorophyll content in the leaves of sugarcane was at 550 nm and 710 nm. SRVI and NDVI calculated using reflectance at 750 nm and 710 nm, and GI and NDVI<sub>Green</sub> calculated using reflectance at 750 nm and 550 nm correlated very well with chlorophyll content. SRVI<sub>broad</sub> and NDVI<sub>broad</sub> calculated using broad-band reflectance also correlated well with chlorophyll content. The developed algorithms predicting leaf chlorophyll from the leaf optics were validated for two independent data. An significant error in chlorophyll prediction of the stressed leaves containing anthocyanin was founded significantly. It appears possible to create indices using reflectance spectra for non-destructive estimation chlorophyll content to monitor crop growth in normal environment.

Keywords: Sugarcane, Reflectance spectra, Satellite remote sensing, Vegetation indices, Chlorophyll, Sensitivity, Anthocyanin

## 前言

綠色植物葉片含有大量的光合色素(photosynthetic pigments)，包括葉綠素(chlorophyll, Chl)和類胡蘿蔔素(carotenoid, Car)，能有效地吸收可見光的紅光和藍光波段進行光合作用，進而將光能轉變為化學能以供利用。植物葉片的光合色素含量不僅在不同的發育階段有所變化，在老化的過程中亦逐漸地減少光合色素含量而改變顏色。落葉植物在秋天葉片老化過程中，其葉片色素質量產生變化，葉片顏色也因而轉變(Hendry *et al.* 1987, Matile *et al.* 1989, Matile *et al.* 1992)。植物遭受逆境時，譬如淹水、乾旱、高低溫、除草劑或病蟲害時，葉片色素含量與顏色變化與自然老化時之情形相似(Hendry *et al.* 1987)。因此，葉綠素含量可作為諸如光合作用能力、生長發育階段、生產力及逆境傷害之生理指標(Whittaker and Marks 1975, Danks *et al.* 1983)。

傳統的色素分析方法藉由有機溶劑的萃取後以光譜儀或 HPLC 等測定之(Arnon 1969, Porra *et al.* 1989, Yang *et al.* 1998)，此皆為破壞性之取樣方法，無法針對單一完整葉片在不同時程中色素含量之變化進行監控，且費時又耗工。相對地，以葉片或植冠反射光譜測定葉片色素含量，具有非破壞性、快速又省工之特性(Baret *et al.* 1987, Baret *et al.* 1992, Buschmann and Nagel 1993, Chappelle *et al.* 1992, Curran *et al.* 1991, Gamon and Qiu 1999, Gitelson and Merzlyak 1994a, b, 1997, Hsu *et al.* 2003, Sims and Gamon 2002, Thomas and Gausman 1977)。由於葉綠素在紅光及藍光波段及類胡蘿蔔素在藍光波段都具有強吸收的特性，因此植物葉片或植冠皆可藉此特性描繪出其反射光譜特徵曲線(Fuchs 1990)。由反射光譜的分析顯示，不同波段反射比值的變化與作物的生理反應及生長狀況有密切關係(Bauer 1975, Ma *et al.* 1996, Masoni *et al.* 1997, Walburg *et al.* 1982)，而以不同波段反射比值所計算之各種植生指數(vegetation index)，則受到葉片的發育及水分含量、色素含量、細胞壁組成、葉表面特徵及葉片內部結構等不同因子之影響

(Elvidge and Chen 1995)。正常之綠色植物有吸收藍光、紅光及強烈反射紅外光之特性，葉綠素和類胡蘿蔔素在藍光之強吸收波段互有重疊，故通常較不以藍光波段估算葉綠素含量。常用於植物資源探測的植生指數，多使用紅光與近紅外光之反射比值或差值(Elvidge and Chen 1995)。蓋因植物生長越旺盛，其吸收之紅光越多及反射之紅光越少，而反射之近紅外光越強，紅光與近紅外光之反射差異(reflectance discrepancy)或比值(ratio)即越大(Green *et al.* 1997, Price and Bausch 1995)。葉片葉綠素之紅光強吸收波段約位於 675 nm 左右，但純的 Chl *a* 或 Chl *b* 在紅光區域 645 及 663 nm 有強吸收，且依溶劑而有變化，但變化不大。葉片反射光譜特徵顯示的應不是純的葉綠素，而是 Chl-protein complex 之類的特徵，675 nm 應是葉綠素與某些蛋白質結合成 Chl-protein complex 之強吸收。雖然葉片葉綠素在 675 nm 左右有強吸收，但此一波段範圍之反射率不適用於估算葉綠素含量，因為葉綠素低濃度下在 675 nm 左右波段之吸收即已達飽和，此一波段對低濃度之葉綠素含量變化具有較高之敏感度，但是對於較高濃度葉綠素含量變化之敏感度則較低(Gitelson and Merzlyak 1994a, 1996, 1997, Hsu *et al.* 2003)。對於已達飽和吸收之較高濃度葉綠素含量之估算，計算植生指數常用的波段範圍包括 550 及 700 nm 左右之反射率(Buschman and Nagel 1993, Datt 1998, 1999, Gitelson and Merzlyak 1994a, b, 1996, Hsu *et al.* 2003, Lichtenthaler *et al.* 1996, Schepers *et al.* 1996, Sims and Gamon 2002, Thomas and Gausman 1977, Yoder and Waring 1994)。

本研究以不同生育期之甘蔗葉片為材料，進行葉片反射光譜測定，並以反射率模擬衛星遙測計算植生指數後，估算葉片色素含量，建立遙測估算葉片色素含量之模式。

## 材料與方法

### 試驗材料

本研究以嘉義縣鹿草鄉所種植之甘蔗(*Saccharum officinarum* L.) ROC 10 號為材料。自 2002 年 7 月至 2003 年 10 月期間，先後分四批種植，採全莖苗種植，肥料用量  $N-P_2O_5-K_2O = 195-36-72$  kg/ha。依不同時期種植之田區而採樣取得生育期 60、90、360、540 天之甘蔗植株，取其第三完全展開葉之中段部位，進行葉片反射光譜及葉綠素與類胡蘿蔔素之測定。

### 反射光譜測定

葉片反射光譜以配備積分球(integrating sphere)套件之 Hitachi U-3010 光譜儀(spectrophotometer)進行測定。光譜掃描速率為 600 nm/min，波段範圍自 200 至 900 nm，光譜解析力為 1 nm。測定時以硫酸鋇白板為參考對比。葉片測定反射光譜時以葉脈間之區域為主，反射率為葉片反射輻射值對參考白板反射輻射值之比值。簡易比植生指數(simple ratio vegetation index, SRVI)之計算方法為  $R_{NIR}/R_{RED}$ ， $R_{NIR}$  為近紅外光波段反射率，一般為 750 至 900 nm 之間，而  $R_{RED}$  為紅光波段反射率，一般為 660 至 720 nm 之間。常態化差異植生指數(normalized difference vegetation index, NDVI)之計算方式為  $NDVI = (R_{NIR} - R_{RED}) / (R_{NIR} + R_{RED})$ ；GI (greenness index)之計算公式為  $GI = R_{NIR} / R_{Green}$ ； $NDVI_{Green}$  之計算公式為  $NDVI_{Green} = (R_{NIR} - R_{Green}) / (R_{NIR} + R_{Green})$ 。

### 葉綠素(Chl)及類胡蘿蔔(Car)的測定

甘蔗葉片以液態氮急速冷凍，並以研鉢磨成細粉後進行冷凍乾燥。然後秤取

0.01 g 樣品細粉，以 80% 丙酮萃取色素，在 4,500 rpm 離心 5 分鐘，取上清液，以 Hitachi U-2000 光譜儀測定  $A_{663.6}$ 、 $A_{646.6}$  及  $A_{440.5}$  的吸收值。三者分別為 Chl *a*、Chl *b* 及 Car 的強吸收處。以 Porra *et al.* (1989) 的公式計算 Chl *a* 與 Chl *b* 的含量；以 Holm (1954) 的方法計算 Car 的含量。

#### 花青素測定

秤取 0.01g 樣品細粉，以內含 1 % HCl 之甲醇(methanol)萃取花青素，其萃取液於旋轉混合機連續萃取 2 小時後，於 4°C 及 2000 rpm 下離心 15 分鐘，取其上清液，以 Hitachi U-2000 分光光度計測定  $A_{657}$  及  $A_{530}$  的吸收值，並以 Mancinelli *et al.* (1975) 的方法計算花青素總量。

## 結果與討論

甘蔗葉片 Chl *a*、Chl *b* 與 Car 的含量，隨著生育期之增加而產生大幅度變化 (Table 1)，此亦反映在葉片反射光譜之變化上 (Fig. 1)。隨著生育日數的增加，甘蔗葉片 Chl 及 Car 總含量逐漸下降，Chl 總含量由 8721  $\mu\text{g/g}$  大幅降為 2905  $\mu\text{g/g}$ ，Chl *a/b* 比值則由 3.84 降至 3.58，變化幅度不大，此顯示 Chl *a* 含量減少速率與 Chl *b* 含量減少速率相差不大。Car 含量由 3636  $\mu\text{g/g}$  降為 1449  $\mu\text{g/g}$ ，Car/Chl 比值則在 0.42 至 0.50 之間，變化不大，顯示 Car 含量變化受到 Chl 含量的影響，兩者間有密切關係。而葉片反射光譜，在 400 至 700 nm 可見光區域之反射率增加，尤以 550 nm 左右反射率增加幅度最大，而 700 nm 左右之紅光臨界區域反射率亦明顯增加，但增幅較小。在以秋季落葉植物為材料的研究中顯示，葉片在老化過程中，Chl 含量減少，在 510-600 nm 及 690 nm 以上波段之反射率明顯增加 (Gitelson and Merzlyak 1994a, 1996)。而本研究中，甘蔗葉之 Chl 含量與反射光譜之變化趨勢與老化過程中之葉片相似。

藉由分析反射光譜中反射率的變異量可瞭解光譜變化趨勢，及對色素含量的敏感度 (Gitelson and Merzlyak 1997, Hsu *et al.* 2003)。變異量越大，顯示對色素變異之敏感度越大；反之則越小。甘蔗葉片光譜反射率之標準差 (standard deviation, STD) 顯示，波長 500 nm 以下及波長約 750 nm 以上之近紅外光波段對色素變異之敏感度低，葉綠素紅光吸收波段約 675 nm 附近對甘蔗葉片色素含量變化之敏感度亦低。反射率對色素含量變異具有高敏感度之波段，包括約 550 nm 附近波段及約 710 nm 附近之波段 (Fig. 2)。

波長 550 nm 及 710 nm 之反射率 ( $R_{550}$ 、 $R_{710}$ ) 與甘蔗葉片之 Chl 含量呈現高度之曲線相關 (Fig. 3)。此亦顯示，此二波段反射率對 Chl 含量變化之敏感度高，其相關性之  $R^2$  值分別為 0.92 及 0.91。用來計算植生指數以進行色素含量估算之波

段，必須對色素含量具有高敏感度，且不易受其他因子影響。相對而言，影響這些波段反射率之主要因子即為各種色素。550 nm 的波段及約 710 nm 附近之波段對色素含量具有高敏感度，750 至 900 nm 之近紅外光波段反射率( $R_{NIR}$ )對色素含量變化敏感度低，但可用於植生指數之計算。本研究所使用之植生指數即以  $R_{750}$  與  $R_{710}$  計算 NDVI、SRVI，以及  $R_{750}$  與  $R_{550}$  計算 GI 與  $NDVI_{Green}$ 。

以上之光譜訊息建基在單一波長之反射率，然而迄今，任何人造之光譜感應器尚無法在遙測距離獲取這麼高的光譜解析力。高空及衛星遙測並非以單一波長反射率做為地面植冠反射光譜之探測。以法國 SPOT 衛星為例，其多譜態掃描器 (multispectral scanner) 具有三個波段，分別為綠光波段 XS1 (500~590 nm)、紅光波段 XS2 (610~680 nm) 及近紅外光波段 XS3 (790~890 nm)。因而，本研究模擬 SPOT 衛星之紅光及近紅外光波段，計算寬波段 (broad-band) 之  $SRVI_{broad}$  及  $NDVI_{broad}$  (Hsu *et al.* 2003)。

本研究所使用之植生指數與 Chl 含量之直線迴歸方程式參數分別如 Table 2 所示，這些參數顯示了估算色素含量之準確度。六組估算 Chl 含量之迴歸方程式中，其迴歸相關係數皆高於 0.86 以上，估算誤差 (estimation error) 約在 706 至 879  $\mu\text{g/g}$  之間，其中以  $NDVI_{Green}$  之方程式為最佳，其  $R^2=0.91$ ， $p < 0.001$ ，估算誤差只有 706  $\mu\text{g/g}$ 。

為了測試六組迴歸方程式估算色素含量之準確度，本研究分別以不含花青素及含花青素 (Table 3) 之兩組獨立之光譜及色素資料進行檢定。以六組迴歸方程式估算後得到色素含量之預測值，再與色素含量之實測值進行比較，其結果如 Fig. 4 和 5 所示。以 NDVI、SRVI、 $NDVI_{broad}$ 、 $SRVI_{broad}$ 、GI 及  $NDVI_{Green}$  方程式估算正常未含花青素甘蔗葉片 Chl 含量預測值與實測值之相關係數  $R^2$  分別為 0.90、0.92、0.78、0.82、0.93、0.91，估算誤差分別為 595、503、816、728、424、



470  $\mu\text{g/g}$  (Fig. 4)。而以相同六組迴歸方程式估算受逆境含有花青素之甘蔗葉片 Chl 含量預測值則與實測值有相當大的差異，除 SRVI 方程式誤差較小外，NDVI、 $\text{NDVI}_{\text{broad}}$ 、 $\text{SRVI}_{\text{broad}}$  方程式估算 Chl 含量之預測值則有明顯低估之現象，其計算出來之含量甚至出現負值；而以 GI 及  $\text{NDVI}_{\text{Green}}$  方程式估算 Chl 含量預測值則有高估之現象(Fig. 5)。

Chl 在低濃度下對於 675 nm 左右波段之吸收即已達飽和，對於已達飽和吸收之較高濃度 Chl 含量之估算，計算植生指數所使用之紅光波段多選擇 700 nm 左右之反射率(Gitelson and Merzlyak 1994a, b, 1996, Hsu *et al.* 2003, Lichtenthaler *et al.* 1996 Schepers *et al.* 1996, Sims and Gamon 2002, Thomas and Gausman 1977, Yoder and Waring 1994)。本研究中不同生育期之甘蔗葉片其 Chl 含量顯然屬於高濃度之含量，以  $R_{750}$  及  $R_{710}$  計算之 NDVI、SRVI、 $\text{NDVI}_{\text{broad}}$  及  $\text{SRVI}_{\text{broad}}$  估算 Chl 含量方程式，以獨立之正常葉片資料進行檢定時，準確度相當高。而受逆境傷害且含有花青素之葉片，其 Chl 含量可能在飽和吸收濃度之下，在紅光區域之反射率，可能隨著 Chl 含量的減少而產生大量增加的情形；另外在此情況之下，紅光臨界的位移亦造成  $R_{710}$  明顯增加，致使以此資料計算之植生指數值較低，用以估算 Chl 含量後產生預測值低於實測值之現象。

在許多研究中顯示，以綠光波段計算之植生指數可做為 Chl 含量的指標 (Buschmann and Nagel 1993, Carter 1993, 1994, Gitelson and Merzlyak 1994a, 1996, 1997, Gitelson *et al.* 1996)。以  $\log(R_{800}/R_{550})$  計算之指數可做為菜豆葉片單位葉面積 Chl 含量之指標，另  $R_{800}/R_{550}$  比值對 Chl *a* 含量亦具有高相關性( $R^2 > 0.88$ ) (Buschmann and Nagel 1993)。以多種無相關聯之植物為材料的研究顯示， $R_{750}/R_{550}$  與 Chl 含量具有高度的直線相關，而  $\text{NDVI}_{\text{Green}}$  則與 Chl 含量具有高度的指數曲線相關(Gitelson and Merzlyak 1997)。本研究顯示，GI 與  $\text{NDVI}_{\text{Green}}$  與 Chl 含量間呈現高度相關，以不含花青素之獨立資料進行檢定亦顯示此兩組植生指數估算準

確性高。但是以含有花青素之獨立資料進行檢定則顯示 GI 及  $NDVI_{Green}$  進行估算造成預測值明顯高於實測值的現象。造成此結果之原因可能為花青素在綠光波段具有強吸收(Harborne 1967)，致使葉片在綠光波段之反射率並未隨著 Chl 含量的減少而增加，故計算 GI 及  $NDVI_{green}$  時值會較高，而造成對 Chl 含量之高估情形。因此，若葉片含有對綠光波段有強吸收之色素時，以綠光波段計算植生指數作為 Chl 含量指標之準確性可能會降低(Hsu *et al.* 2003)。

對於正常環境下生長之甘蔗葉片，其葉片之 Chl 含量與  $R_{750}$ 、 $R_{710}$  及寬波段反射率計算之 SRVI 及 NDVI 具有高度相關，亦與計算之 GI 及 NDVI 具有高度相關。因此，這些植生指數可以用來進行正常葉片 Chl 含量之遙測估算。另外，葉片若遭受逆境致使 Chl 含量大量降低時，以正常環境生長下之葉片植生指數估算 Chl 含量可能會有較大的誤差，必須另有適合之植生指數進行估算。葉片含有花青素、類黃酮、多酚類、單寧、或對綠光波段具有強吸收之其他色素，必然影響其在綠光波段之吸收、穿透與反射光譜特徵，故以綠光波段反射率計算之植生指數估算葉片 Chl 含量則需考慮是否含有其他色素之干擾。以 550 及 700 nm 左右之反射率計算之植生指數適用於估算 Chl 含量在飽和吸收濃度以上時，但對於 Chl 含量在飽和吸收濃度以下時之估算，及不同物種間 Chl 之飽和吸收濃度是否一致，尚須進一步地研究。另外葉片在 Chl 高含量下，含有花青素等對綠光波段具有強吸收之其他色素，是否會對 Chl 含量之遙測估算造成干擾，亦須進一步之研究。以葉片反射光譜計算植生指數，可以進行非破壞性地估算葉片色素含量之變化，擴及至植冠反射光譜測定及衛星遙測，可即時估算葉片色素含量與監測作物生長狀況，進而預估作物產量或災害評估，將有助於精準農耕之發展。

## 參考文獻

- Arnon DI (1969) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol.** 24:1-5.
- Baret F, I Champion, G Guyot, A Podaire (1987) Monitoring wheat canopies with high spectral resolution radiometer. **Remote Sens. Environ.** 22:367-378.
- Baret F, S Jacquemoud, G Guyot (1992) Modeled analysis of the biophysical nature of spectral shift and comparison with information content of broad bands. **Remote Sens. Environ.** 41:133-142.
- Bauer ME (1975) The role of remote sensing in determining the distribution and yield of crops. **Adv. Agron.** 27:271-304.
- Buschmann C, E Nagel (1993) *In vivo* spectroscopy and internal optics of leaves as basis for remote sensing of vegetation. **Int. J. Remote Sens.** 14:711-722.
- Carter GA (1993) Responses of leaf spectral reflectance to plant stress. **Am. J. Bot.** 80:239-243.
- Carter GA (1994) Ratios of leaf reflectances in narrow wavebands as indicator of plant stress. **Int. J. Remote Sens.** 15:697-703.
- Chappelle EW, MS Kim, JE McMurtrey III (1992) Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): An algorithm for the remote estimation of the concentrations of chlorophyll a chlorophyll b, and carotenoids in soybean leaves. **Remote Sens. Environ.** 39:239-247.
- Curran PJ, JL Dungan, BA Macler, SE Plummer (1991) The Effect of a red leaf pigment on the relationship between red edge and chlorophyll concentration. **Remote Sens. Environ.** 35:69-76.
- Danks SM, EH Evans, PA Wittaker (1983) Photosynthetic Systems. Structure Function and Assembly, Wiley, New York.
- Datt B (1998) Remote sensing of chlorophyll *a*, Chlorophyll *b*, chlorophyll *a+b*, and total carotenoid content in Eucalyptus leaves. **Remote Sens. Environ.** 66:111-121.
- Elvidge CD and Z Chen (1995) Comparison of broad-band and narrow-band red and near-infrared vegetation indices. **Remote Sens. Environ.** 54:38-48.
- Fuchs M (1990) Canopy thermal infrared observations. p.323-333. *In: Instrumentation for studying vegetation canopies for remote sensing in optical and thermal infrared regions.* NS Goel, JM Norman (eds.) Harwood Acad. Publ. Gmb H, U. K.
- Gamon JF, H Qiu (1999) Ecological applications of remote sensing at multiple scales. p.805-846. *In: Handbook of functional plant ecology.* FI Pugnaire, F Valladares

(eds.) Marcel Dekker, New York.

- Gitelson AA, MN Merzlyak (1994a) Spectral reflectance changes associated with autumn senescence of *Aesculus hippocastanum* L. and *Acer platanoides* L. leaves. Spectral features and relation to chlorophyll estimation. **J. Plant Physiol.** 143:286-292.
- Gitelson AA, MN Merzlyak (1994b) Quantitative estimation of Chlorophyll *a* using reflectance spectra: Experiments with autumn chestnut and maple leaves. **J. Photochem. Photobiol. (B)** 22:247-252.
- Gitelson AA, MN Merzlyak (1996) Signature analysis of leaf reflectance spectra: algorithm development for remote sensing of chlorophyll. **J. Plant Physiol.** 148:494-500.
- Gitelson AA, MN Merzlyak (1997) Remote estimation of chlorophyll content in higher plant leaves. **Int. J. Remote Sens.** 18:2691-2697.
- Gitelson AA, YJ Kaufman, MN Merzlyak (1996) Use of a green channel in remote sensing of global vegetation from EOS-MODIS. **Remote Sens. Environ.** 58:289-298.
- Green EP, PJ Mymby, AJ Edwards, CD Clark, AC Ellis (1997) Estimating leaf area index of mangroves from satellite data. **Aquat. Bot.** 58:11-19.
- Harborne JB (1967) Comparative biochemistry of the flavonoids. Academic Press, London. 383 pp.
- Hendry GAF, JD Houghton, SB Brown (1987) The degradation of chlorophyll – a biological enigma. **New Phytol.** 107:255-302.
- Holm G (1954) Chlorophyll mutations in barley. **Acta Agric. Scand.** 4:457-461.
- Hsu MH, WD Huang, ZW Yang, YZ Tsai, SS Chang, CM Yang (2003) Remote estimation of pigment content in sweet potato leaves by reflectance spectra. (in Chinese) **Chinese Agron. J.** 13:1-12.
- Lichtenthaler HK, AA Gitelson, M Lang (1996) Non-destructive determination of chlorophyll content of leaves of a green and aurea mutant tobacco by reflectance measurements. **J. Plant Physiol.** 148: 483-493.
- Ma BL, MJ Morrison, LM Dwyer (1996) Canopy light reflectance and field greenness to assess nitrogen fertilization and yield of maize. **Agron. J.** 88:915-920.
- Mancinelli AL, CP Huang-Yang, P Lindquist, O Anderson, I Rabino (1975) Photocontrol of anthocyanin synthesis, III. The action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and anthocyanin. **Plant Physiol.** 55:251-257.
- Masoni A, L Ercoli, M Mariotti (1997) Spectral properties of leaves deficient in iron, sulfur, magnesium, and manganese. **Agron. J.** 88:937-943.
- Matile P, M Schellenberg, C Peisker (1992) Production and release of a chlorophyll catabolite in isolated senescent chloroplasts. **Planta** 187:230-235.

- Matile P, T Duggelin, M Schellenberg, D Rentsch, K Bortlik, C Peisker, H Thomas (1989) How and why is chlorophyll broken down in senescent leaves? **Plant Physiol. Biochem.** 27:595-604.
- Porra RJ, WA Thompson, PE Kriedelman (1989) Determination of accurate extraction and simultaneously equation for assaying chlorophyll a and b extracted with different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochem. Biophys. Acta** 975:384-394.
- Price JC, WC Bausch (1995) Leaf area index estimation from visible and near-infrared reflectance data. **Remote Sens. Environ.** 52:55-65.
- Schepers JS, TM Blackmer, WW Wilhelm, M Resende (1996) Transmittance and reflectance measurements of corn leaves from plants with different nitrogen and water supply. **J. Plant Physiol.** 148:523-529.
- Sims DA, JA Gamon (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sens. Environ.** 81:337-354.
- Thomas JR, HW Gausman (1977) Leaf reflectance vs. leaf chlorophyll and carotenoid concentrations for eight crops. **Agron. J.** 69:799-802.
- Walburg G, ME Bauer, CS Daughtry, TL Housley (1982) Effects of nitrogen on the growth, yield, and reflectance characteristics of corn. **Agron. J.** 74:677-683.
- Whittaker RH, PL Marks (1975) Methods of assessing terrestrial productivity. p.55-118 *In: Primary Productivity of the Biosphere.* H Lieth, RH Whittaker (eds.) Springer-Verlag, New York.
- Yang CM, KW Chang, MH Yin, HM Huang (1998) Methods for the determination of the chlorophylls and their derivatives. **Taiwania** 43:116-122.
- Yoder BJ, RH Waring (1994) The normalized difference vegetation index of small Douglas-fir canopies with varying chlorophyll concentrations. **Remote Sens. Environ.** 49: 81-91.

Table 1. The contents of chlorophyll (Chl) and carotenoid (Car) in sugarcane leaves at various developmental stages.

Pigments	Days after planting			
	60	90	360	540
Chl <i>a</i> (µg/g DW)	6918±149 <sup>†</sup>	5749±132	4821±144	2271±44
Chl <i>b</i> (µg/g DW)	1803±19	1459±47	1343±96	634±22
Chl <i>a+b</i> (µg/g DW)	8721±155	7208±176	6164±230	2905±64
Chl <i>a/b</i> ratio	3.84±0.08	3.94±0.06	3.60±0.18	3.58±0.08
Car (µg/g DW)	3636±105	3149±82	2816±75	1449±28
Car/Chl ratio	0.42±0.01	0.44±0.00	0.46±0.01	0.50±0.00

<sup>†</sup> Data presented as mean ± standard error (SE).

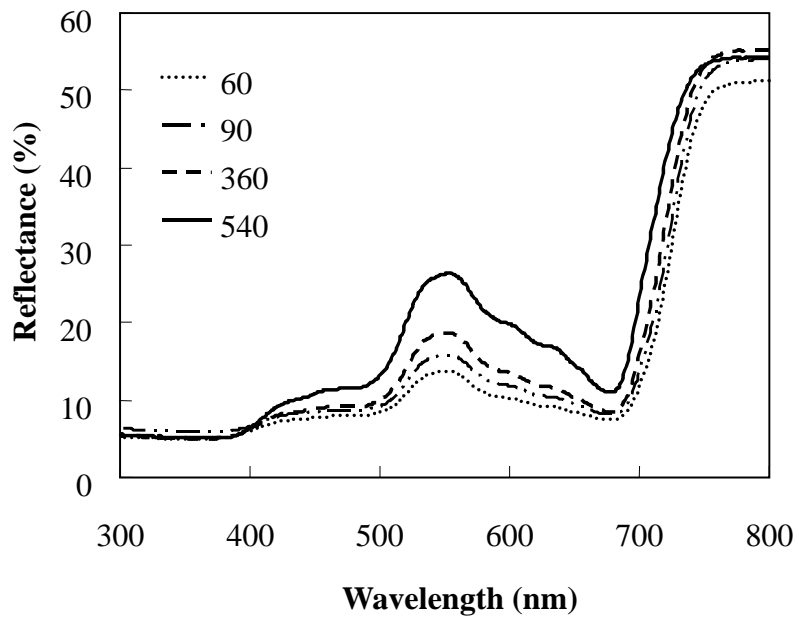


Figure 1. Reflectance spectra of sugarcane leaves at 60, 90, 360, 540 days after planting.

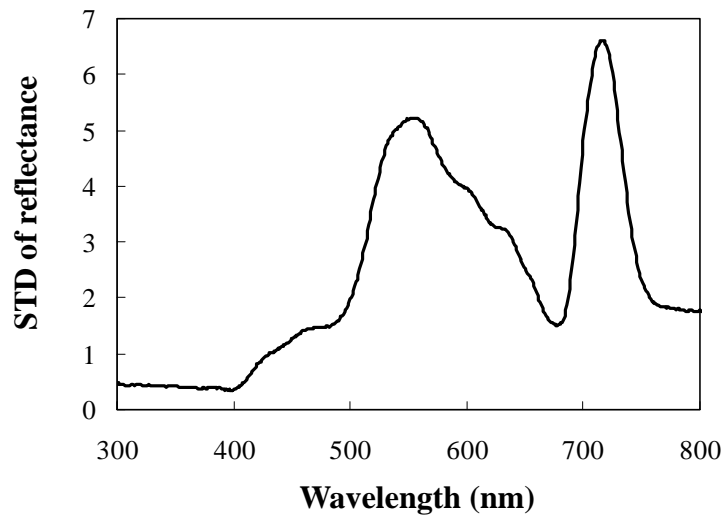


Figure 2. Standard deviation (STD) of reflectance for sugarcane leaves.



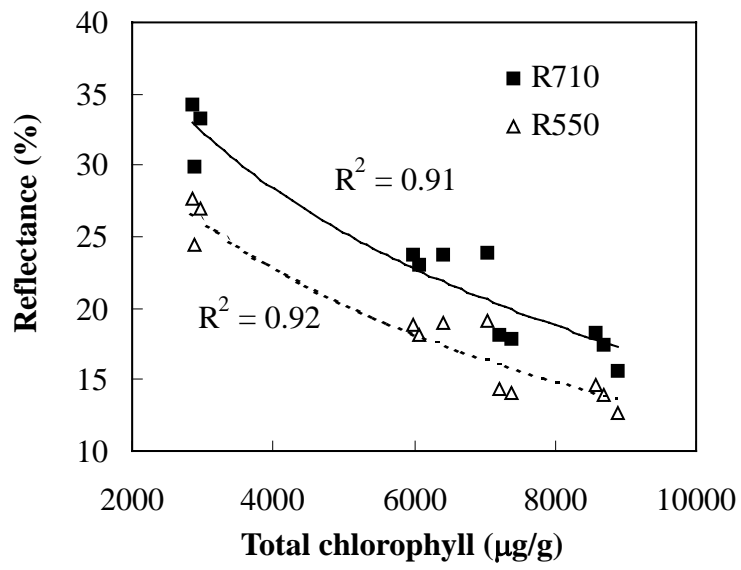


Figure 3. The reflectance at the wavelength 710 (■) and 550 nm (△) versus total Chl content in sugarcane leaves.

Table 2. The algorithms for Chl estimation in sugarcane leaves.

Vegetation index (VI)	Chl = $b + a$ [VI] <sup>†</sup>				
	$R^2$	$a$	$b$	$p$ value	Estimation error <sup>‡</sup>
NDVI	0.91	21775	-2176	< 0.001	711
SRVI	0.87	4142	-3424	< 0.001	841
NDVI <sub>broad</sub>	0.88	33934	-16270	< 0.001	816
SRVI <sub>broad</sub>	0.86	2059	-4278	< 0.001	879
GI	0.88	3282	-3322	< 0.001	823
NDVI <sub>green</sub>	0.91	23188	-4783	< 0.001	706

† VI, vegetation indices. NDVI and SRVI calculated using  $R_{710}$  and  $R_{750}$ ; NDVI<sub>broad</sub> and SRVI<sub>broad</sub> calculated using broad-band reflectance, Red: 610-680 nm; NIR: 790-890 nm; GI and NDVI<sub>green</sub> calculated using  $R_{550}$  and  $R_{750}$ .

‡ Estimation error was an estimation error of Chl and  $R$  was the correlation coefficient of samples measured.  $a$ ,  $b$  and Estimation error were in  $\mu\text{g/g}$  dry wt.

Table 3. The contents of chlorophyll (Chl), carotenoid (Car), and anthocyanin in sugarcane leaves of two independent data sets for validation of vegetation indices.

Pigments	Validation data sets	
	Set 1	Set 2
Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g/g DW}$ )	3200-7434 <sup>†</sup>	235-1041
Chl <i>b</i> ( $\mu\text{g/g DW}$ )	807-2089	227-432
Chl <i>a+b</i> ( $\mu\text{g/g DW}$ )	4007-9523	463-1376
Chl <i>a/b</i> ratio	3.56-4.15	1.04-3.30
Car ( $\mu\text{g/g DW}$ )	1808-3822	362-1041
Car/Chl ratio	0.40-0.48	0.40-1.01
Anthocyanin [(A <sub>530</sub> -0.333A <sub>657</sub> )/g DW]	0	9.98-83.12

<sup>†</sup> Data presented as range.

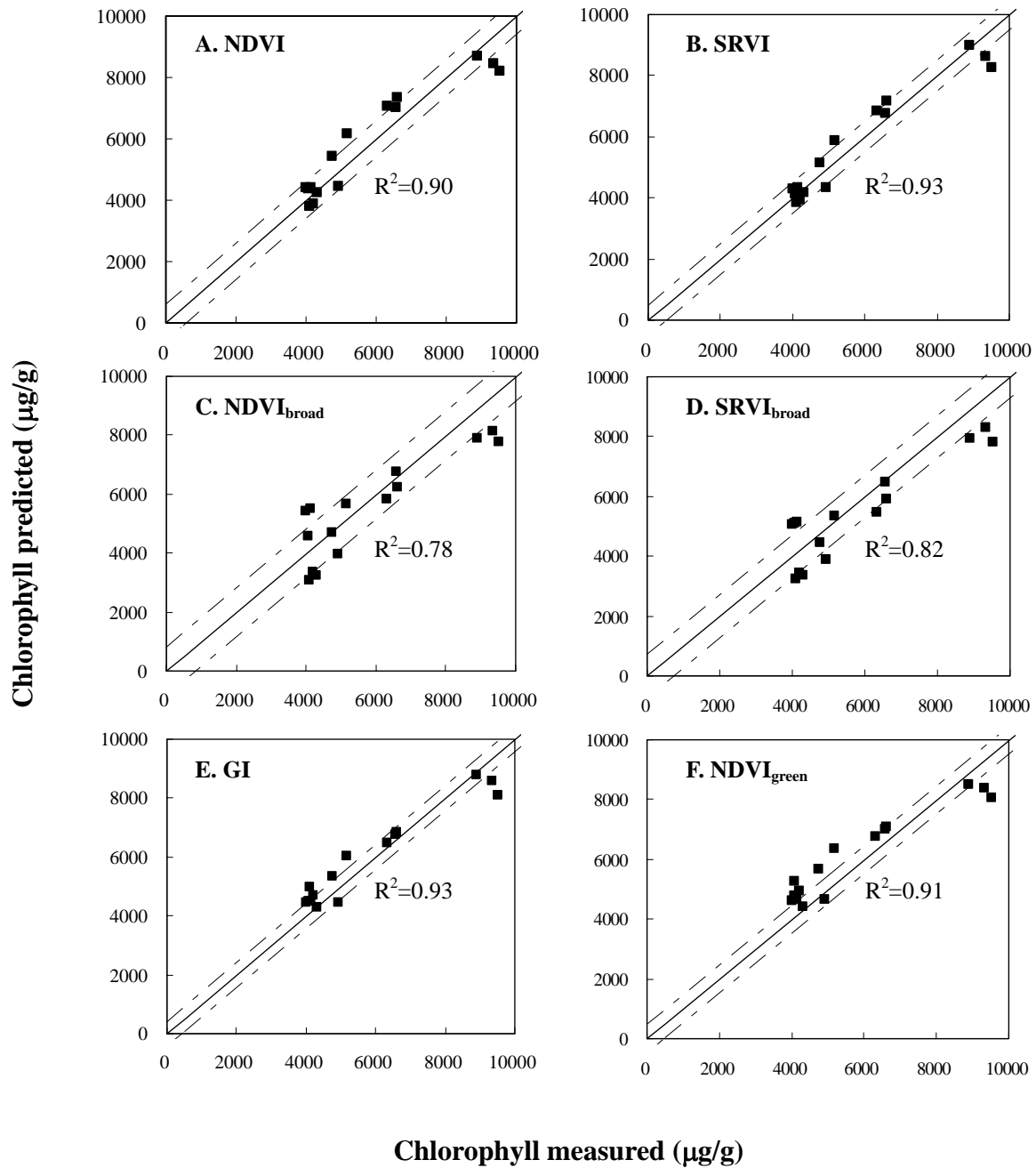


Figure 4. The results of validation of vegetation indices by independent data sets.  $R^2$  was the correlation coefficient between predicted and actually measured Chl content. The solid line represents the equation  $Chlorophyll_{pred} = Chlorophyll_{meas}$ . The dotted lines represent error of Chl prediction.

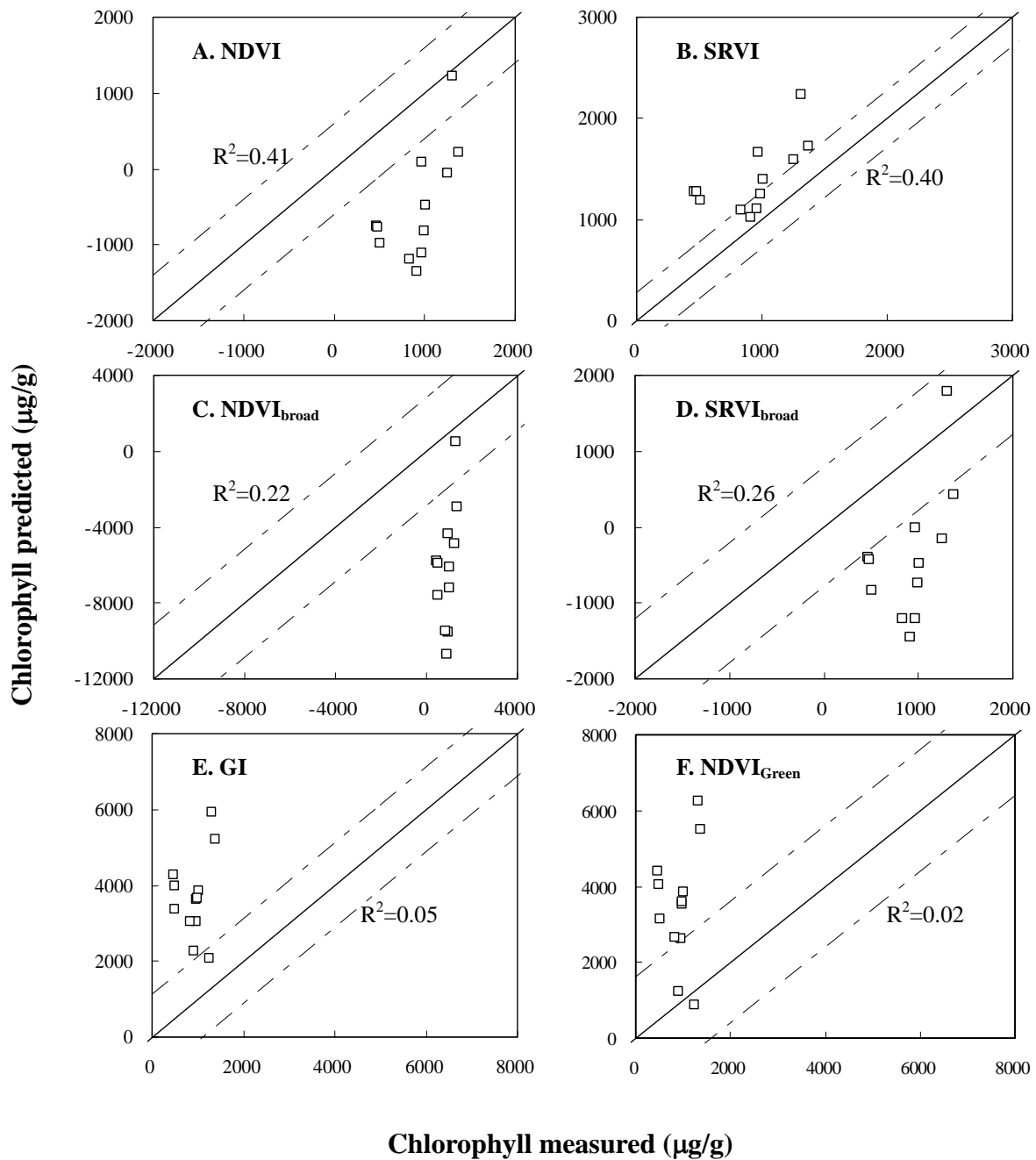


Figure 5. The results of validation of vegetation indices by independent data sets that the samples were containing anthocyanin.  $R^2$  was the correlation coefficient between predicted and actually measured Chl content. The solid line represents the equation  $Chlorophyll_{pred} = Chlorophyll_{meas}$ . The dotted lines represent error of pigment prediction.