

## Bakgrund

Botaniska analyser sker i dag i nästan alla odlingstekniska vallförsök där blandvallar ingår. Syftet är att bestämma procentandelen klöverarter, gräs samt ogräs. I flera försöksserier sker också en bestämning av andelen ingående gräsarter. Analyserna kan ske antingen rutvis eller ledvis. Av kostnadsskäl används ofta ledvisa analyser. Det är dock önskvärt med rutvisa analyser så att en statistisk bearbetning kan utföras.

Två angivna metoder finns idag för att ta ut proverna i fält. När skörden sker med vallskördemaskin med hackustrustning tas proven ut före rutan skördas. Exempelvis genom att ca 12 klippta delprov med 5–7 cm stubbhöjd klipps slumpmässigt per ruta. Sker skörden med en vallskördemaskin utan hackustrustning tar man ut 10 representativa delprov ur skördehögen efter vägning. På senare år tas i en del fall botaniska prov ut från skördehögen även om provuttagningshack finns på vallskördemaskinen. Oavsett provuttagningsmetod är det svårt att ta ut ett representativt prov för rutan. De uttagna proverna sorteras därefter i färskt tillstånd i de fraktioner som stipuleras. Provet kan vid behov delas ner till en mindre volym. Ofta hinns inte proven att sorteras direkt efter uttagningen. De kan då förvaras i kylskåp 4-5 dagar. De olika fraktionerna torkas i torkskåp i max 60<sup>0</sup> C ett dygn. Därefter vägs proven ut och den procentuella andelen ingående arter bestäms.

För att förenkla detta förfarande har ett par undersökningar gjorts med syfte att få fram klöverhalter i botaniska prov med hjälp av nära infraröd reflektans (NIR). Resultat från bl.a. Wachendorf et al. (1999), Locher et al. (2005) och Post et al. (2007) indikerar att baljväxtandel skulle kunna bestämmas tillfredställande, men eftersom Wachendorf et al. (1999) och Post et al. (2007) använt sig av intern validering och Locher et al. (2005) dessutom blandat sina prover från ett fåtal klöver- respektive gräsprover finns det tveksamheter beträffande kalibreringarnas generalitet och precision i praktisk användning.

NIR-analys används rutinmässigt för kvalitetsanalys av grovfoder (Roberts et al. 2004) och ger bl.a. information om fiber och proteininnehåll (Stenberg et al. 2004). Båda dessa parametrar skiljer generellt ganska mycket mellan baljväxter och gräs varför NIR-spektroskopi potentiellt skulle kunna skilja mellan åtminstone dessa botaniska grupper. NIR-analys förutsätter en kalibrering som relaterar nya okända prov till en uppsättning kalibreringsprov med känd botanisk sammansättning. Det är en förutsättning att referensproven är representativa för de nya, okända, prov som skall analyseras (Wachendorf et al. 1999). Dardenne (1996) påtalade också det generella behovet i botaniska material av att uppdatera referensmaterialet med nya prov varje år för att kalibreringen även skall täcka in årsmånsvariationer. Locher et al. (2005) lyckades skapa en relativt pålitlig modell för att skilja på baljväxter och gräs, men betonade också vikten av exakthet i referensmetoden, dvs att sorteringen utförs noggrant och att NIR-analyserna utförs på det faktiskt sorterade proven.

Syftet med projektet var att utveckla en strategi där den NIR-analys som redan i dag görs på prover från vallförsök för fodervärdesbestämning, även skall kunna användas för bestämning av botanisk sammansättning, framförallt klöverhalt. Målet var att utarbeta en robust strategi för svenska vallfröblandningar och svenska förhållanden som påtagligt rationaliserar botanisk analys i fältförsök. I det aktuella projektet låg fokus på klöverandel eftersom preliminära resultat pekar på en stor potential, men i mindre skala undersöktes även möjligheterna att analysera andelen av olika gräs- och klöverarter. Dessutom jämfördes resultaten med kalciuminnehållet, som ger en grov uppskattning om klöverandel.

## Material och metoder

### Provtagning

Vallförsök där en botanisk analys samt kemisk analys av den torkade grönmassan gjordes vid skördetillfället (tabell 1) användes för studien. Proven för botanisk analys togs ut ledvis i samband med skörd. Ett representativt prov om max 1.0 kg togs ut. Detta gjordes på olika sätt beroende på ifall vallskördemaskinen var utrustad med hackutrustning eller inte. I det första fallet måste proven tas ut före rutan skördas. Från varje ruta klipptes då ett representativt prov bestående av ca 12 slumpvisa delprov med 5–7 cm stubbhöjd. Dessa delprov slogs sedan samman ledvis. I de fall försöksvallskördemaskinen saknade hackutrustning togs 10 representativa delprov ur högen efter vägning.

Vid provtagningen för torrsubstansbestämning och kemisk analys togs från varje ruta ett representativt prov om ca 10 delprov utom i de fall en automatisk uttagning av hackat material gjordes. Provstorleken var cirka 1 kg.

Tabell 1. Vallförsök från vilka prover till den botaniska analysen och kemiska analysen samlades in. De botaniska proven är insamlade ledvis och de kemiska rutvis. Antal prov analyserade 2009 och 2010.

Serie	Försök	Region	Antal skördar	2009		2010
				Bot. analys	Kem. analys	Bot. analys
<b>Kalibreringsprov</b>						
Projekt: Kraftsamling växtodling						
Botanisk sammanställning vall						
	Gårdsprover	Sjuhärad	3	43		
L6-4562	PS-107-2006	Länghem	3	30		
L6-472	H-12-2006	Kalmar	3	23	65	34
	PS-106-2006	Länghem	3	48	140	40
				144	205	74
<b>Valideringsprov</b>						
L6-4429	F-5-2006	Jönköping	1	14		
	H-8-2006	Kalmar	1	14		
	I-93-2006	Gotland	1	14		
	NN-676-2006	Halland	1	13		
RÅNU 10	Demo N-vall	Länghem	3			36
				55		36
Totalt antal prover:				220	205	110

### Provberedning och Analyser

Vid den botaniska analysen separerades fraktionerna rödklöver, vitklöver och gräsarter som ingick i försöket, samt ej insådda arter (ogräs). Proverna för botanisk analys låg i kylskåp någon eller några dagar innan de sorterades. De olika fraktionerna torkades i torkskåp i max 60°C ett dygn. Därefter vägdes proven ut och den procentuella andelen ingående arter bestämdes. Proverna för kemiska analyser torkades först i kalllufttork innan de färdigtorkades i 60°C. Därefter hackades och maldes alla prov med ett 0,7 mm såll på kvarnen innan NIR-mätningar

utfördes. De malda proverna scannades i det synliga våglängdsområdet (400-700 nm) och det nära infraröda (700-2500 nm) varvid spektrum med mätintervall på 1 nm erhöles. Till detta användes NIR-instrumentet FieldSpec Pro FR (ASDI, Boulder Colorado; [www.asdi.com](http://www.asdi.com)) utrustat med fiberoptik och en extern ljuskälla.

Kalciumanalys (152/2009 EU mod) utfördes på 165 prover som representerade klöverhalterna i hela kalibreringssetet.

## Utvärdering

Vid utvärdering av NIR-spektrumen räknades både röd- och vitklövern in i klöverhalten. Då de malda torkade proverna från några av försöken hade kraftigt avvikande färg i det synliga våglängdsområdet orsakat av torkningsförfarandet användes endast våglängder mellan 971 och 2500 nm i utvärderingarna.

NIR-mätningar har utförts på de separata botaniska fraktionerna samt på prover som har blandats på nytt för att återskapa den ursprungliga blandningen (tabell.2).

Tabell 2. Antal NIR-mätningar som utförts de olika åren

År	2009	2010
NIR; Samtliga botaniska fraktioner	557	294
NIR; Sammanslagna botaniska prov	220	110
NIR; Prov från kemisk analys	205	

Kalibreringar för att bestämma klöverandel har gjorts utifrån NIR-spektrum på kalibreringsproven i tabell 1 med partial least square (PLS) regression. PLS anpassar empiriskt våglängderna till, i detta fall, klöverandel med en linjär modell. Kalibreringarna utfördes i programvaran Unscrambler 10.2 (Camo A/S, Oslo; [www.camo.com](http://www.camo.com)).

Statistiska begrepp som används i utvärderingen är:

RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross-Validation
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction
R <sup>2</sup>	Prediktionskoefficient

Olika strategier för att uppnå den bästa och mest kostnadseffektiva kalibrering för varje försök jämfördes. Grundstrategin bestod av kalibreringar med enbart kalibreringsproven i tabell 1. Detta var den enklaste strategin. Den förutsätter en generell kalibrering som med tillräckligt hög upplösning representerar alla de typer av prov som kan komma att analyseras. Dessutom testades fyra likartade strategier (A-D) med syftet att förbättra kalibreringen genom att göra dem mer representativa. För detta togs ett fåtal prover från respektive försök och lades till kalibreringssetet. Detta gjordes för ett försök i taget och följaktligen fick varje försök sin unika kalibrering. I A valdes de 3 prov med högst, lägst respektive genomsnittlig klöverandel ut som det mättes med referensmetoden och i B som de mättes med grundkalibreringen. I C lades samma prover som i B till tio gånger för att öka deras betydelse i kalibreringen. I D lades också samma prover som i B till, men dessutom en klöverstege (0-100% i 5 % steg) som blandades genom att vikta spektrum av rena klöver- och gräsprov från respektive försök.

För att kunna relatera felen i klöverkalibreringarna till osäkerheten i de nuvarande manuella botaniska analyserna utfördes NIR-analys även på de rutvisa prov som skickades till kemisk analys inom ramen för respektive försök. Eftersom målsättningen är att dessa prov och de

NIR-spektrum som rutinmässigt tas på dem för kemisk analys skall kunna användas även för den botaniska analysen är det viktigt att dessa prov är någorlunda utbytbara med dem för botanisk analys. Genom att jämföra predikterade värden för proven från botanisk analys med de från kemisk analys kan osäkerheten dem emellan grovt skattas. De kemiska analyserna utfördes 2009 rutvis och den botaniska analysen ledvis. Därför beräknades ett medelspektrum av de tre spektrum från den kemiska analysen som motsvarade den botaniska analysen detta gav 64 spektrum. De spektrum från den botaniska analysen med motsvarande prover för den kemiska analysen användes för att göra en PLS-modell. Denna modell användes sedan för att prediktera klöverhalten utifrån spektrumen från proverna avsedda för kemisk analys.

Kalciumanalyser utfördes på 165 prover utvalda för att få så stor spridning i klöverhalt som möjligt. Detta för att utvärdera kalciumhaltens relation till klöverhalten. Med hjälp av en finskt algoritim ”Artturi Klöverhalt utifrån Ca-halten” som uppskattar klöverhalten utifrån kalciumhalten utvärderades kalciumanalyserna. Ett program för detta finns på hemsidan: [https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Artturi/svenska\\_artturi/artturi\\_biblioteket/utraknare/kloverbandel\\_utifran\\_ca\\_halten/rakna\\_ut](https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Artturi/svenska_artturi/artturi_biblioteket/utraknare/kloverbandel_utifran_ca_halten/rakna_ut)

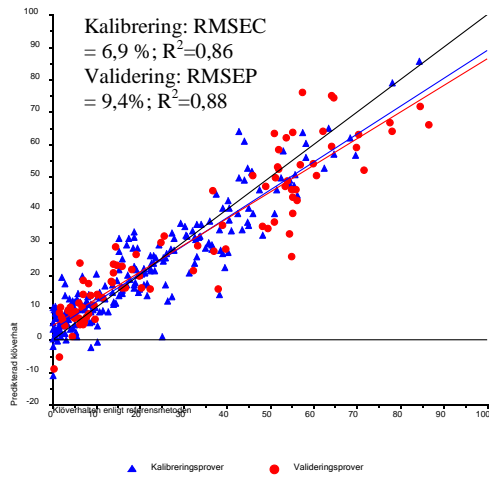
## Resultat

I tabell 3 redovisas medeltalen och standardavvikelsen i försöken som ingår i studien

Tabell 3. Klöverhalter i de olika försöken i studien

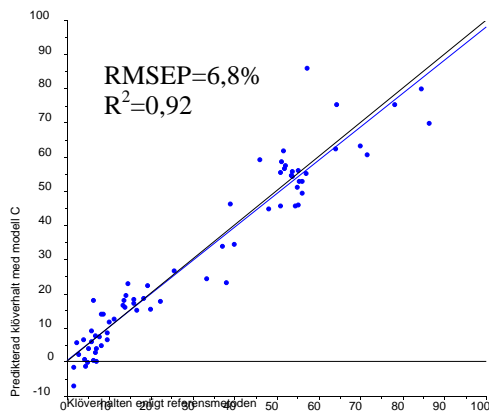
Serie	Försök	År	Skörd	Klöverhalt			
				2009		2010	
				Medel	Std	Medel	Std
<b>Kalibreringsprov</b>							
Projekt Kraftsamling växtodling, Botanisk sammansättning vall							
	Gårdsprover	2009	1	11	7		
			2	14	8		
			3	23	15		
L6-4562	PS-107-2006		1	18	18		
			2	22	19		
			3	24	18		
L6-472	H-12-2006		1	24	12	17	14
			2	40	25	24	20
			3	46	27	32	19
	PS-106-2006		1	14	13	12	7
			2	29	26	20	19
			3	24	20	16	13
<b>Valideringsprov</b>							
L6-4429	F-5-2006	2009	1	26	20		
	H-8-2006		1	9	7		
	I-93-2006		1	4	2		
	NN-676-2006		1	20	14		
RÅNU 10	Demo N-vall	2010	1			51	15
			2			64	11
			3			55	9

Med den generella PLS-modellen bestående av enbart kalibreringsproverna i tabell 1 blev resultatet för prediktion av klöverandel i de oberoende valideringsproverna (figur 1) ett  $R^2$ -värde på 0,88 och RMSEP = 9,4 % klöver.



Figur 1. Klöverhalten med referensmetoden jämfört med den predikterade klöverhalten i den generella PLS-modellen.

I strategierna A-D där ett fåtal prover från respektive valideringsförsök fick förstärka kalibreringen och göra den mer representativ gjordes prediktioner för varje försök och skörd för sig. Resultaten redovisas i tabell 4. Bäst var strategi C med de uppviktade försöksspecifika referensproven tillagda (figur 2 och tabell 4).



Figur 2. Klöverhalten i valideringsproven predikterad med strategi C

Tabell 4. Valideringsresultaten av strategierna A-D i de olika försöken och skördarna, sammanslagna resultat för samtliga försök och skördar med strategierna A-D, samt resultaten för den generella kalibreringen som jämförelse

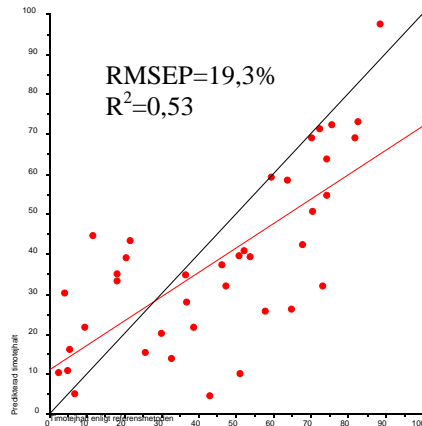
År	Skörd	Försök	Strategi	RMSEP (% klöver)	R <sup>2</sup>
2009	1	F-5-2006	A	8,3	0,78
			B	8,1	0,79
			C	3,4	0,96
			D	9,3	0,72
	1	H-8-2006	A	6,8	0,76
			B	6,8	0,75
			C	4,5	0,87
			D	6,7	0,82
	1	I-93-2006	A	6,0	0,88
			B	4,5	0,93
			C	4,9	0,89
			D	4,4	0,95
	1	NN-676-2006	A	4,7	0,81
			B	4,1	0,91
			C	4,7	0,88
			D	6,6	0,79
2010	1	Demo N-vall	A	13,8	0,80
			B	14,0	0,80
			C	6,7	0,94
			D	10,1	0,88
	2	Demo N-vall	A	8,4	0,96
			B	10,7	0,95
			C	7,9	0,96
			D	7,9	0,97
	3	Demo N-vall	A	12,9	0,85
			B	12,7	0,85
			C	12,5	0,81
			D	13,7	0,79
Sammanslagna			A	8,0	0,89
			B	8,0	0,89
			C	6,8	0,92
			D	8,5	0,88
Generella PLS-modellen				9,4	0,88

### **Prediktion av andra arter**

Möjligheterna att göra kalibreringar som kan skilja mellan olika gräsarter testades också och resultaten återges i tabell 5. Samma kalibrering- och valideringset som i figur 1 användes till alla olika gräsarter. För att förbättra resultatet för timotej gjordes ett nytt valideringset där endast de led där timotej hade sorterats fram användes (figur 3).

Tabell 5. Försök att prediktera andra gräsarter med den generella PLS-modellen

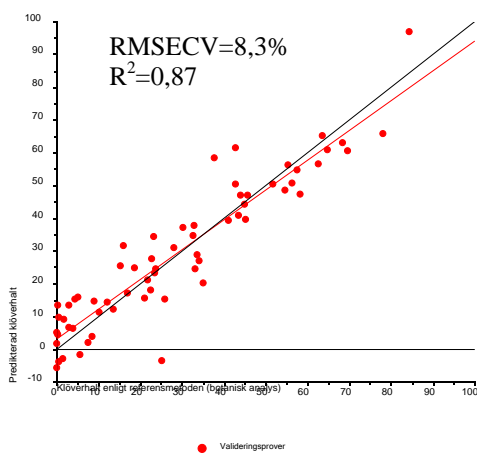
Art	R <sup>2</sup>	RMSEP
Timotej	0,50	22,0
Engelskt rajgräs	0,40	16,7
Ängsvingel	0	21,5
Rajsvingel	0	32,7



Figur 3. Prediktion av timotejhalten.

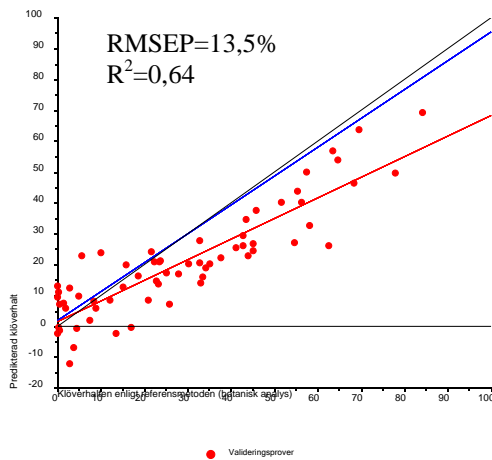
### **Predikterad klöverhalt i proverna från den kemiska analysen.**

De prover som togs ut för kemisk analys 2009 skannades också med NIR-instrumentet. I figur 4 visas den PLS som gjordes med enbart de botaniska prover som det fanns kemiska prover för. Denna modell användes sedan för att prediktera klöverhalten i de kemiska proverna (figur 5). I den jämförelsen användes det genomsnittliga predikterade värdet från de tre upprepningarna. Resultatet visar på en tydlig bias i kemproverna i form av underprediktion. Efter korrektion av bias är skillnaden betydligt mindre. RMSECV korrigerat för bias är 10,9 % jämfört med okorrigerat som är 13,5 % (figur 5). Underprediktionen måste bero på en systematisk skillnad i spektrumet mellan de två dataseten. En noggrann jämförelse av spektrumet i de två dataseten visar att de skillnader som finns är små och de antyder en något högre vattenhalt i kemproven.



Figur 4. Fullt korsvaliderad PLS-modell för de 64 botaniska prover som det finns motsvarande kemiskt prov för.

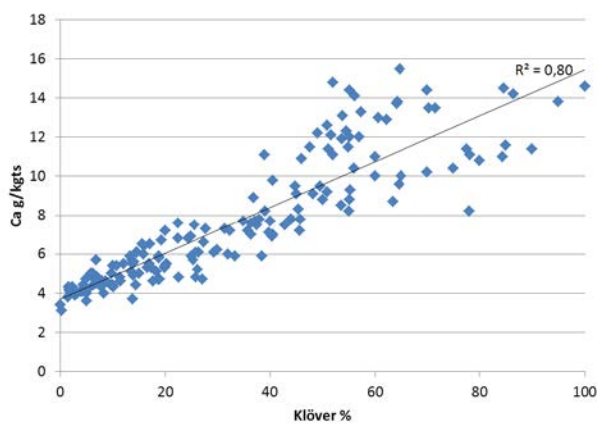
En analys av de tre upprepningarna av proverna från kemanalysen visade att den genomsnittliga skillnaden mellan det högsta och lägsta predikterade värdet var 11 % klöver och att den genomsnittliga standardavvikelsen mellan de tre upprepningarna var 5,8 % klöver.



Figur 5. Klöverhalten i de 64 proverna från den kemiska analysen predikerad med hjälp av modellen från figur 4.

### ***Klöverhalt jämfört med kalciumhalt***

Kalciumhalten analyserades på 165 prover varav 21 prover ingår i klöverstegen. Sambandet mellan kalcium- och klöverhalt visas i figur 6.

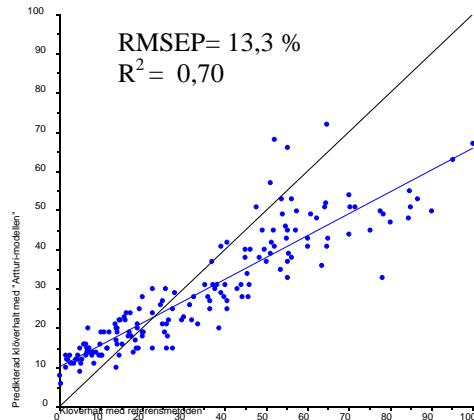


Figur 6. Kalcium innehåll (g/kgts) jämfört med provets klöverhalt (%) från den botaniska analysen.

### **Klöverhaltsbestämning med programmet "Artturi - Klöverhalt utifrån Ca-halten"**

Resultatet från hur programmet estimerar klöverhalten med hjälp av kalciumhalten i grödan visas i figur 7. Sambandet är likvärdigt med det i figur 6, men Artturi-modellen ger ett betydande systematiskt fel.





Figur 7. Klöverhalt predikerad med ”Arturi Klöverhalt utifrån Ca-halten” inkluderar den ihopblandade klöverstegen

## Diskussion

Det övergripande resultatet från studien är att förutsättningarna att bestämma klöverhalt från ett torkat och malt prov är mycket goda. Till skillnad från tidigare studier (Wachendorf et al., 1999; Locher et al., 2005; Post et al., 2007) har vi här validerat NIR-kalibreringarna med prover från helt andra försök och andra gårdar än kalibreringsproven och de kan i den meningen betraktas som helt oberoende. Detta ger resultaten en stor tillförlitlighet. Det bör dock observeras att kalibrerings- och valideringsprov härstammar från samma år och från ett relativt litet antal försök och platser. Ytterligare validering är därför att rekommendera, särskilt för den generella kalibreringen. Våra resultat visade också att en inte helt obetydlig genomsnittlig förbättring kunde uppnås genom att förstärka den generella kalibreringen med så få som tre väl valda prov från respektive försök om dessa viktades upp 10 gånger. Förbättringen var dock ojämn mellan valideringsförsöken. I några fall mer än halverades prediktionsfelen medan det i andra fall inte hade någon effekt alls. Det finns dock anledning att misstänka att när ytterligare variation i form av årsmån förs in så kommer denna typ av lokalt förstärkta kalibreringar att vara robustare, men detta återstår att undersöka.

Även om de förstärkta kalibreringarna dels innebär att botanisk sammansättning från några prov från varje nytt försök fortfarande måste analyseras manuellt och att dessutom prediktionsförfarandet blir något mer komplicerat kommer tidsvinsten ändå att vara mycket stor. Förstärkningsproven bör dessutom efterhand inkluderas i den generella kalibreringen och med tiden kommer denna att bli mer och mer robust. På sikt kan det innebära att det årliga antalet manuella prover kan reduceras avsevärt.

När det gäller att skilja mellan olika gräsarter ser resultaten betydligt mindre lovande ut även om en viss förmåga att bestämma andelen timotej och engelskt rajgräs kunde visas. Om detta kan förbättras med t.ex. ett större kalibreringsmaterial är svårt att säga.

En stor fördel med att NIR-metoden är att den ger bättre förutsättningar att bestämma klöverhalten rutvis, och inte bara ledvis, i och med att prover för kemisk analys analyseras rutvis och att flera av de kemiska analyser som görs utförs genom NIR-analys. Det innebär att NIR-analysen inte innebär någon extra kostnad. En komplikation i detta avseende är att vi i vår studie kunde se en kraftig systematisk avvikelse mellan en kalibrering utförd på NIR-spektrum från proverna för botanisk analys och prediktioner av motsvarande prov för kemisk analys, vilket orsakar ett ganska stort prediktionsfel (RMSEP=13,5 %; Figur 5). Denna skill-

nad går inte att förklara med att det skulle vara någon systematisk skillnad mellan de två olika dataseten med avseende på klöverhalt. Det troligaste är att det är fråga om en artefakt som beror på olikheter i hur proverna hanterats efter uttaget. En närmare analys av spektrummen indikerade att proverna för kemisk analys varit något sämre torkade innan de maldes och analyserades jämfört med proverna från den botaniska analysen. Proverna för kemiska analyser torkades först i kalllufttork innan de färdigtorkades i 60°C medan proverna för botanisk analys torkades i torkskåp direkt. En preliminär, inte lika noggrant validerad, studie med enbart proven i figur 4 och 5 visar att en kalibrering utförd på prover från den kemiska analysen fungerar precis lika bra som den från de botaniska proven. För fortsatt kalibrering rekommenderar vi därför att NIR analysen görs enbart på proverna från den kemiska analysen.

Det fanns ett tydligt samband mellan klöverhalten och kalciumhalten. Korrelationskoefficienten var dock något lägre (0,80) jämfört med prediktionskoefficienten för NIR-kalibreringarna (0,88-0,92). När prediktionsförmågan testades genom det finska programmet Artturi tillkom dessutom ett betydande systematiskt fel. Eftersom våra prov härstammar från två år och ett flertal olika försök förlagda på olika platser är risken stor att detta systematiska fel inte är en tillfällighet. Artturi-modellen bör därför användas med viss försiktighet. Om fler prov från ytterligare år och försök inkluderas borde det emellertid finnas goda utsikter att justera kalibreringen. Att använda Artturimodellen kräver dock den extra analysen av kalcium medan NIR-analysen ändå utförs i den mån kemiska analyser utförs i försöken.

Proverna från denna studie finns lagrade så att nya mätningar med ett annat NIR-instrument kan utföras.

## Litteratur

- Dardenne, P. 1996. Stability NIR spectroscopy equations. *NIR news* 7(5):8-9.
- Locher, F.; Heuwinkel, H., Gutser, R. and Schmidhalter, U. 2005. The legume content in multispecies mixtures as estimated with near infrared reflectance spectroscopy: method validation. *Agron J.* 97: 18-25.
- Post, CJ; DeGloria, SD; Cherney, JH, et al. 2007. Spectral measurements of alfalfa/grass fields related to forage properties and species composition. *Journal of plant nutrition.* 30: 1779-1789.
- Roberts C A, Stuth J and Flinn P 2004 Analysis of Forages and Feedstuffs. In *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture*, Eds C A Roberts, J Workman Jr and J B Reeves III. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI, USA.
- Stenberg B, Jensen L S, Nordkvist E, Breland T A, Pedersen A, Guomundsson J, Bruun S, Salo T, Palmason F, Henriksen T M and Korsæth A 2004 Near infrared reflectance spectroscopy for quantification of crop residue, green manure and catch crop C and N fractions governing decomposition dynamics in soil. *J. Near Infrared Spectrosc.* 12, 331-346.
- Wachendorf, M., Ingwersen, B., Taube, F. 1999. Prediction of the clover content of red clover- and white clover-grass mixtures by near-infrared reflectance spectroscopy. *Grass and forage science.* Volume 54 Issue 1, Pages 87 – 90

## Publikationer

Ett manuskript till en vetenskaplig tidskrift är under bearbetning

## Övrig resultatförmedling till näringen

Redovisning på Fältforsk vallgruppsmöte i Nässjö 15 november 2011.