

Slutrapport

New technology for estimation of vigour of cereal seeds

Projektnummer: O-15-20-576

Projektperiod: 2016-01-01 – 2019-12-31

Huvudsökande:

Thomas Börjesson, Agroväst

Medsökande:

Karin Sperlingsson, Jordbruksverket

Johannes Ravn Jørgensen, Aarhus Universitet

Lars Wadsö, Lunds Tekniska Högskola

Del 1: Utförlig sammanfattning

The aims of the project have been to compare different quick methods for estimation of seed germination. The three methods that we have compared are Videometer Lab. equipment, GERMINATOR and Isothermal Calorimetry. Videometer Lab. equipment and the GERMINATOR method are both based on image analysis while Isothermal calorimetry is based on heat generated by germinating kernels. The Videometer measurements have been performed at Aarhus University, Flakkebjerg, the GERMINATOR studies at Wageningen University and to a limited extent also at SLU in Skara, while the Isothermal Calorimetry was performed at Lund University. Both artificially aged and natural samples have been used in the studies. Reference analyses, Seed germination tests according to ISTA and Tetrazolium tests have been run at Swedish Board of Agriculture (SBA), Seed Laboratory, Svalöv, while Germination energy (Ge) according to EBC was run at Viking Malt, Halmstad, Sweden. Artificial aging of samples was performed by heating them in plastic bags in 60 °C water bath for between 30 and 180 min at Aarhus University, Flakkebjerg, and natural samples were chosen among routine samples analysed at SBA or at Eurofins, Lidköping Sweden. All samples were divided by a seed sample divider and sent out for analyses using reference and quick method.

Results from both Videometer and GERMINATOR were well correlated with reference analyses, $R > 0,80$. The results were particularly satisfactory for barley, intermediate for wheat, but not satisfactory for oats. One explanation for this is that the oat husks may fall off, which disturbs the image analysis. A complication with image analysis methods is that outgrowth of fungi from infected kernels could be erroneously detected as germinating seeds. Both methods based on image analysis were able to deliver acceptable results after approximately 48 hours.

Videometer has the advantage of having a well-established software for making data evaluations and data presentations. One interesting result obtained was that the shorter wave-

length range, 400-500 nm, seemed to produce the most valuable data for distinguishing germinating from non-germinating kernels.

The Videometer equipment is able to produce reliable results from small sample sizes of 20 and also about 50 kernels. To run samples on a belt may increase the throughput, but has only been tested to a limited extent in the project, so that solution would need to be further tested and developed in the future. An advantage with the Videometer is that it is possible to also make other analyses such as seed purity with the same instrumentation.

The GERMINATOR equipment also produces reliable results and data handling is efficient and produces fundamental statistics. It has the potential be developed into both a user-friendly and low-cost routine, although sample handling and software routines are not as developed as for the Videometer, and are also more demanding for the operator. It was possible to scale up the GERMINATOR method to analyse 100 kernels in the same way as the normal routine with 20 kernels.

Data from Isothermal Calorimetry could not be as easily correlated with the reference data as the calorimeter does not measure germination percentage, but respiration rate. However, a good correlation between reference data and calorimetry data was obtained for one dataset with barley samples ($r = 0,94$). A potential advantage with the method is that valuable data seemed to be possible to extract already after 12 h of incubation. One reason for this can be that the measurements are made continuously while the image detections methods only take snapshots during the germination period. There is a potential for building larger measuring cells allowing quite large sample sizes. Sample handling needs to be further developed, e.g. how to optimize aeration. The technique in its present form is also probably too expensive for routine analyses and development work to simplify and scale up is necessary if routine analysis should be possible.

As a conclusion, all methods have potential to give reliable results, and have potentials for scaling up, which would be necessary in order to develop routine analyses. They all need to be further developed and in particular be made more user friendly.

Del 2: Rapporten (max 10 sidor)

Inledning

Det är vanligt att man behöver av att kontrollera ett spannmålspartis groningsegenskaper vid flera olika tillfällen där man inte har behov av certifierad analys, så en förenklad rutin skulle sannolikt kunna få en stor spridning. Detta gäller spannmålspartier avsedda både för utsäde och malkorn, i båda fallen är groningsegenskaperna centrala för partiets användbarhet.

Projektets målsättning har varit att studera hur väl några olika snabbmetoder kan användas för att bedöma grobarheten hos spannmålskärnor. De tre utvalda metoderna har alla i tidigare studier visat sig ha potential att kunna bli användbara för att rutinmässigt kontrollera groningsegenskaper hos spannmål.

Material och metoder

Material

I projektet har vi använt oss av prover som analyserats rutinmässigt antingen av Eurofins eller Jordbruksverkets utsädeslaboratorium. Naturliga prover samlades in från skördeåren 2015, 2016 och i viss mån 2017.

Följande prover har samlats in: Skördeår 2015: 24 korn-prover uttagna från kommersiella flöden av prover hos Jordbruksverket och Eurofins plus 6 prover som åldrats artificiellt i 60 °C i vattenbad i 0, 120 eller 240 minuter (Möller & Munck 2002). Skördeår 2016: 42 prover samlades in från kommersiella flöden av prover hos Jordbruksverket och Eurofins. Av dessa var 18 korn, 15 havre och 9 vete.

Skördeår 2017: Från detta år valdes att i första hand arbeta med artificiellt åldrade prover, eftersom denna metod verkade på ett enkelt sätt kunna producera prover med varierande groningsegenskaper. Man har då möjlighet att designa mer specifikt vilka groningsegenskaper man vill ha. Eftersom vi i den tidigare studien med artificiellt åldrade prover fann att man redan vid 120 minuter fick en mycket kraftig påverkan på groningsegenskaperna, valde vi denna gång att variera tiderna i vattenbad enligt följande: 0, 30, 60, 90, 120, 150 och 180 minuter. Dessutom lade vi till 2 vete och 2 kornprover för att få med ett par naturliga prover som även testats med TZ-metoden, som lades till bland referensmetoderna detta år.

Proverna som samlades in från flöden av naturliga prover hos Jordbruksverket och Eurofins samlades först in hos Agroväst i Skara och provdelades, innan de sändes för referensanalyser och för analyser med de olika snabbmetoderna. Även om prover nyligen hade analyserats av Jordbruksverket gjordes en förnyad analys tillsammans med övriga prover. Referensanalyserna utfördes under sommarhalvåret året efter skördeåret, medan snabbanalyserna mestadels utfördes under hösten året efter skördeåret, men i vissa fall ännu senare. GERMINATOR analyserna utfördes dock alltid senast i september året efter skördeåret. Artificiell åldring av prover utfördes av Aarhus Universitet, Flakkebjerg, provdelades och sändes till övriga aktörer för snabbanalyser respektive referensanalyser.

Referensmetoder

Utsäde

Den referensmetod för utsäde som användes för samtliga prover i studien var ISTAs groningsmetod för stråsäd (ISTA rules 2019, kapitel 5, BP, between paper). I denna metod läggs 400 kärnor på uppfuktat filterpapper och ställs i odlingsrum med hög relativ fuktighet och belysning under 7 dygn. Då man bryter försöket bedöms vilka kärnor som gett upphov till normala skott (normala groddar), de som inte grott och de som producerat s.k. abnorma skott. Orsaker till detta kan vara att det inte bildas ett normalt skott utan enbart koleoptil, men skador på koleoptil och rötter kan också förekomma, vilket gör att man inte bedömer att plantan kommer att utvecklas normalt.

Under sista året, prover från skördeår 2017, gjordes dessutom en snabbanalys, Tetrazoliumanalys, på proverna. Metoden innebär att man klyver uppfuktade kärnor och tillsätter 2,3,5-trimetyl-tetrazolium-klorid-lösning för att efter en tid avläsa ev. färgomslag. Om klivna utsädeskärnor blivit rödfärgade tyder det på en levande kärna.

Malkorn

För malkorn användes två olika metoder: Groningsenergi enligt Aubry som innebär att man lägger ut 500 kärnor på ett uppfuktat bomullspapper varefter man lägger på ett uppfuktat filterpapper. Man inkuberar utan ljustillträde i 3 dygn varefter grodda kärnor tas bort och antalet icke-grodda kärnor räknas. Man inkuberar sedan ytterligare i 2 dygn och därefter upprepas samma räkning. Man summerar sedan hur många kärnor som grott under 5 dygn. Kärnor räknas som grodda om man kan se rottrådar eller skottspetsar. I vissa fall testades även Groningskapaciteten, en metod där man genom att inkubera kärnorna i väteperoxid bryter ev. groningsvila och på sätt kan bedöms partiets groningskapacitet, även om partiet just nu har kvar groningsvila och därmed inte har så hög groningsenergi. Vi bedömer dock inte att groningskapaciteten är så relevant att jämföra med, eftersom vi i referensmetoderna inte bryter ev. groningsvila.

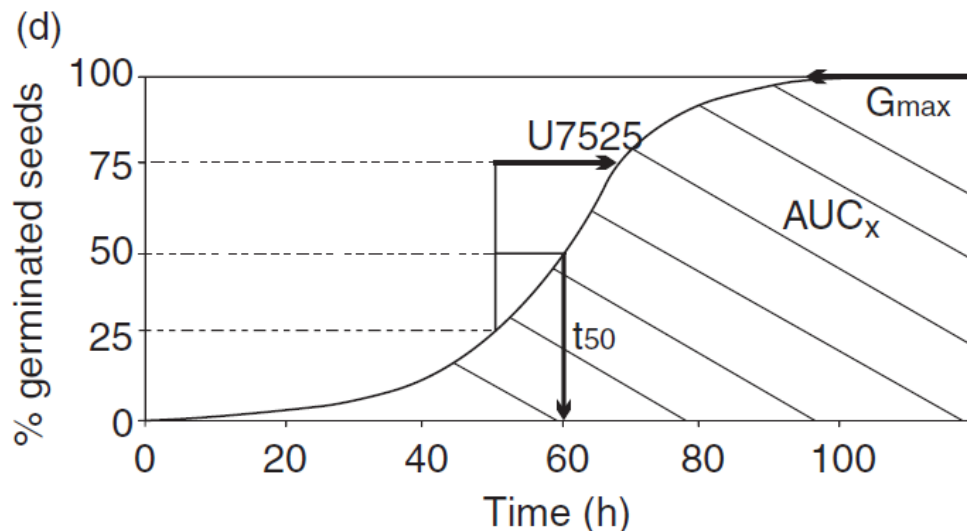
Snabbmetoder

GERMINATOR

Metoden har i stort sett körts enligt publicerad rutin (Joosen et al., 2010). Några mindre justeringar gjordes inledningsvis: Vattenmängden per tråg (150 x 210 mm) anpassades till 62,5 ml och antalet kärnor per tråg sattes till 20. Det noterades även att det fungerar bra att sprida ut kärnorna slumpmässigt på filterpapperet. En anpassning av färgtröskelvärden gjordes också: För att detektera endast kärnor sattes trösklarna i färgkodningssystemet YUV till 0-255, 0-95 respektive 120-255 och för att detektera allt utom bakgrunden sattes YUV till 0-255, 0-125 respektive 120-255. Detta visar att den blåa signalen som representeras av U i färgkodningssystemet tycks vara viktig för att särskilja groddar och rottrådar från kärnor. En annan anpassning av systemet som gjordes var att öka normalstorleken för objekt som systemet skall detektera till mellan 4000 och 25000 pixlar. Största tillåtna varians i ett objekts area sattes till 1000 pixlar och största tillåtna varians i positionen för varje objekt sattes till 5 mm. En viss justering av dessa värden gjordes då systemet sattes upp i Skara då vi här även testade med 100 kärnor, se nedan.

Samma utvärderingar som enligt den ordinarie rutinen på Wageningen University har också använts för spannmålskärnor, d.v.s. de groende fröna fotograferas med ett intervall på ca. 12 timmar och en mätning pågår i ca. 100 timmar, d.v.s. totalt antal bilder per prov uppgick till upp till 9, men intervallerna var i vissa fall något längre, så antalet bilder varierade mellan 7 och 9. Trågen var mellan fototillfällen placerade i klimatskåp (20°) i mörker

Efter att andelen grodda kärnor registrerats vi varje fotograferingstillfälle, produceras en kurva över hur andel grodda kärnor ökar med tiden för varje prov. Utgående från denna kurva tas i sin tur ett antal statistiska mått fram, såsom AUC (arean under kurvan), Gmax (maximal groningsprocent), t50 (tid då 50% av kärnorna i ett prov har grott), MGT (medelgroningstid), t10 (tid då 10% av kärnorna har grott), etc. (Figur 1).



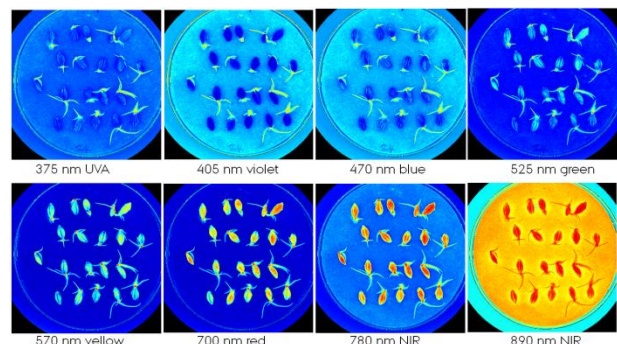
Figur 1. Illustration av några av de mått som genereras av GERMINATOR systemet, AUC (arean under kurvan), Gmax (maximal groningsprocent), t50 (tid då 50% av kärnorna i ett prov har grott) och U7525 (tid mellan 25% och 75% groning).

Vi har även studerat hur lång groningstid som behövs för att få en god korrelation mellan de olika måtten och referensanalysdata. Normalt har 4 upprepningar (80 kärnor) använts för att räkna ut måtten enligt ovan och i programvaran kan man även räkna ut om signifikant skillnad föreligger mellan olika prover, men denna funktion har varit av mindre betydelse i vår studie. Ett försök gjordes även med att skala upp till att analysera 100 kärnor på en gång, som lagts ut på 4 hopsatta filterpapper som lagts ut på en vanlig plastbricka.

Videometermetoden

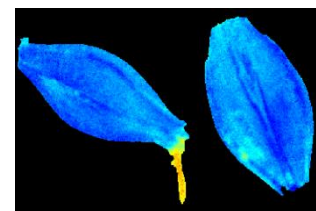
Multispektrala bilder togs med ett VideometerLab multispektralt bildsystem (Videometer A/S, Hørsholm, Danmark). Bilderna är högupplösta (2056 × 2056 pixlar) och består av bilder från 19 våglängder från 375 till 970 nm.

Test med respektive 20 systematiskt arrangerade kärnor eller slumpmässigt placerade 50 kärnor lades på blått filterpapper i en petriskål och 2 ml vatten tillsattes. Sedan blev multispektrala bilder tagna av kärnorna och registrerades med hjälp av VideometerLab systemet efter respektive 0, 24, 48 72 och 96 timmars groning (Figur 2). Som illustreras i Figur 2, var våglängderna 405 och 470 lämpliga för att särskilja grodda från icke-grodda kärnor.



Figur 2. Bilder på groende kärnor efter olika groningstid.

De multispektrala bilderna av de groende kärnorna (Figur 3) innehåller information om varje kärna (region av intresse; ROI). Bilderna sparades i en databas och analyserades med en normaliserad kanonisk diskriminant analys (nCDA) i Videometerlab ver 3.0-mjukvaran (Olesen et al., 2015; Shrestha et al., 2015). Spektral information från kärnorna kan sedan användas för att särskilja groende kärnor från icke-groende kärnor. Utifrån de valda parametrarna beräknas ett RegionMSI_{mean} som anger ett genomsnitt av MSI-transformerade pixelvärden för varje objekt (varje enskild kärna) och



Figur 3 Groende respektive icke-groende kärna.

returnerar ett relativt antal pixlar som överskrider ett gränsvärde för MSI-transformation i kärnan baserat på nCDA-modeller och därmed om kärnan skall anses som grodd eller icke-grodd (Boelt et al., 2018). I exemplet i Figur 3, är det sannolikt att det är tillräckligt många pixlar i det våglängdsområde som illustreras med gul/röd färg i den vänstra kärnan för att den skall klassas som grodd, men inte den högra. Med Videometerutrustningen utfördes endast enkelanalyser.

Isoterm kalorimetri

Den tredje metoden som testades var isoterm kalorimetri. Denna metod skiljer sig från både referensmetoderna och de andra testade metoderna på två sätt. Dels genom att groningen inte detekteras visuellt/optiskt, utan genom mätning av värmeutvecklingen från kärnornas respiration; dels att mätningen är kontinuerlig. Metoden skall ses som ett intressant komplement till visuella/optiska metoder som eventuellt kan ge annan värdefull information än groningen.

För en mätning placeras 100 kärnor i vikta groningspapper som fuktas upp och placeras i en 125 ml plastburk som passar in i de isoterma kalorimetrar (BioCal 2000, Calmetrix Inc.) som har använts. Eftersom mätburkarna är slutna, görs mätningarna i mörker och ett långsamt flöde av uppfuktad luft tillför syre och bortför bildad koldioxid. Mätningarna gjordes vid 20 °C under 72 h med en mät punkt per minut. Metoden ändrades något under projektets gång, vilket troligen begränsar möjligheten att göra korrelationsanalyser på hela materialet. Analyser har därför huvudsakligen gjorts inom varje år.

Isoterm kalorimetri mäter värmeutvecklingen från respirationen – den grundläggande process som driver de biologiska processerna i t ex groende kärnor. Eftersom det alltid bildas samma mängd värme per konsumerad syremolekyl, kan man räkna om den mätta värmeeffekten till respirationshastighet (mängd konsumerad syre per tidsenhet).

Resultat och diskussion

Referensanalyser

Av de naturliga kornproverna från skördeår 2015 hade ett lagrats i mer än 2 år vid rumstemperatur och grodde inte alls. Av de återstående 23 proverna var genomsnittlig grobarhet enligt ISTA-metoden 80% med median på 91%, vilket visar att de allra flestas proverna hade hög grobarhet. Grobarheten varierade mellan 24 och 99%. Ungefär samma fördelning noterades för groningsenergi. De artificiellt åldrade proverna grodde antingen mycket bra (0 min. i vattenbad) eller inte alls (120 min, i vattenbad), så inte heller dessa prover var användbara för utvärdering med referensmetoderna. Motsvarande siffror för korn, havre respektive vetepröver från skördeår 2016 var följande: Korn (n = 18), medel; 83,9, median 91,5, havre (n = 15) medel 89,4, median 90,5, vete (n = 9) medel 91,3, median 93,0 och från skördeår 2017 artificiellt åldrade korn- och vete prover:

Vete (n = 7) medel 29,7, median 21,0, korn (n = 7): medel 71,6, median 85,0. Sammanfattningsvis kan man konstatera dels att kornproverna generellt grodde bra, men med en ganska stor andel prover med lite sämre grobarhet, medan havre och vete-prover inte skilde sig åt så mycket i grobarhet.

Veteproverna som åldrats artificiellt grodde dock överlag betydligt sämre än motsvarande kornprover.

GERMINATOR

De resultat som redovisas är medelvärden för 4 upprepade analyser (prover från 2015) eller 3 upprepade analyser (2016 och 2017), alltså totalt 100 respektive 75 kärnor. För att jämföra resultaten med Videometermetoden, där man endast analyserat en upprepning, har ett slumpmässigt prov om 20 kärnor tagits ut. Samtliga beräknade korrelationer enligt Pearson (r) är beräknade utifrån antagandet att sambanden skall vara linjära. Detta är naturligt när man jämför grobarhet mätt med två metoder, men för vissa andra mått (t ex AUC från GERMINATOR) kan man tänka sig att korrelationer mot grobarhet skulle kunna vara icke-linjära.

Resultat från analyser av prover från 2015 års skörd, prover uttagna från flöden av rutinprover.

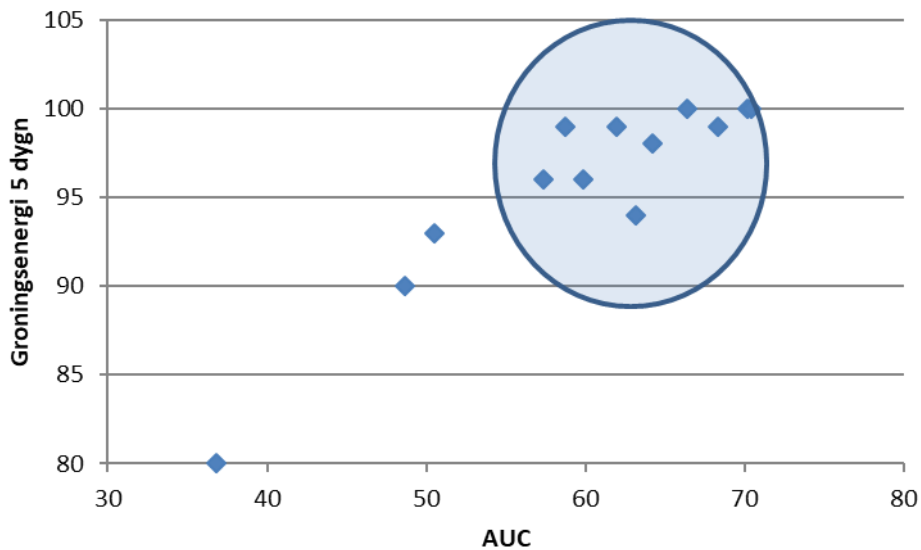
De data från bearbetningen av kurvor som tas fram utifrån groningsdata som korrelerar bäst mot referensanalydata är Gmax och AUC (Tabell 1). Resultaten visar att man får lika bra samband om

man bryter försöket efter ca. 48 timmar, som att använda alla data som samlats upp fram till 100 timmar, Tabell 1. Att beräkna Gmax och AUC tidigare än efter 48 timmar gav dock inga användbara resultat.

Tabell 1. Korrelation (r, Pearson) mellan GERMINATOR resultat och referensanalyser efter olika försöklängd.

Försökets längd, timmar	Referensmått					
	Normala groddar (ISTA)		Aubry (EBC) 3 dygn		Aubry (EBC) 5 dygn	
	gMAX (%)	AUC	gMAX (%)	AUC	gMAX (%)	AUC
100	0,88	0,88	0,93	0,94	0,91	0,91
48	0,87	0,87	0,93	0,92	0,91	0,91

Man kan även notera att det går bra att särskilja prover med hög grobarhet, Groningsenergi > 95% från prover med lägre grobarhet, 80-95% (Figur 4).



Figur 4. AUC-mått från GERMINATOR jämfört med groningsenergi 5

Resultat från analyser av prover från 2016 års skörd, prover uttagna från flöden av rutinprover.

Även i detta material var det måtten Gmax och AUC som korrelerade bäst mot referensanalyserna. Resultaten visar även här att man får lika bra samband om man bryter försöket efter ca. 48 timmar, som att använda alla data som samlats upp fram till 100 timmar, Tabell 2. Att beräkna Gmax och AUC tidigare än efter 48 timmar gav inte heller i detta fallet några användbara resultat. Resultaten var återigen bra för korn, i viss mån även för vete, men inte tillfredsställande när det gäller havre.

Tabell 2. Korrelation mellan GERMINATOR resultat, gMAX% och AUC och referensanalyser efter olika försökslängd. Naturliga prover från 2016.

a) Samtliga prover, N = 42

Försöks- längd, timmar	Normala groddar (ISTA)	
	gMAX (%)	AUC
100	0,87	0,72
48	0,56	0,49

b) Kornprover, N = 18

Försöks- längd, timmar	Normala groddar (ISTA) Aubry (EBC) 5 dygn			
	gMAX (%)	AUC	gMAX (%)	AUC
100	0,90	0,90	0,96	0,96
48	0,91	0,90	0,96	0,95

c) Havreprover, N = 15

Försöks- längd, timmar	Normala groddar (ISTA)	
	gMAX (%)	AUC
100	0,43	0,43
48	0,39	0,37

d) Veteprover, N = 9

Försöks- längd, timmar	Normala groddar (ISTA)	
	gMAX (%)	AUC
100	0,92	0,83
48	0,70	0,69

Resultat från analyser av prover från 2017 års skörd, artificiellt åldrade prover.

Från detta år redovisas endast data från artificiellt åldrade prover då de fåtaliga naturliga proverna inte varierade särskilt mycket i groningsegenskaper. Korn- och vete-proverna utvärderades tillsammans eftersom detta inte gav sämre korrelation mot måttet Normala groddar enligt ISTA än att utvärdera korn respektive vete prover var för sig. Till skillnad från övriga år, var det inte möjligt att få några bra samband alls efter 48 timmar, utan det gick endast att få fram data efter 55 respektive 71 timmar. Däremot var sambanden mellan några andra mått och groningsegenskaperna i vissa fall bättre än Gmax och AUC som använts tidigare år, nämligen t10, tid då 10% av kärnorna grott och MGT (Mean Germination time), (Tabell 3). TZ-metodens resultat har också lagts till i tabellen och dessa korrelerar i detta dataset ungefär lika bra mot referensmetoden som GERMINATOR-resultaten.

Tabell 3. Korrelationer mellan olika mått erhållna från GERMINATOR och TZ och referensmått för artificiellt åldrade korn och veteprover från 2017 (N = 14).

Försöks- längd, timmar	Normala groddar (ISTA)						Aubry (EBC) 3 dagar (endast korn)						Aubry (EBC) 5 dagar (endast korn)					
	gMAX%	AUC	t10	MGT	TZ		gMAX%	AUC	t10	MGT	TZ		gMAX%	AUC	t10	MGT	TZ	
100	0,73	0,92	-0,92	-0,90	0,90		0,65	0,71	-0,75	-0,69	0,71		0,64	0,62	-0,65	-0,57	0,58	
55-72	0,73	0,81	-0,89	-0,22	0,90		0,71	0,68	-0,62	-0,13	0,71		0,62	0,59	-0,49	0,07	0,58	

Försöken med att sätta upp metoden i Skara fungerade tillfredsställande, men resultaten blev inte fullt så bra som i Wageningen. Uppskalning gav också lovande resultat, men endast 3 mindre försöksserier har körts. Det är ett för litet material för att några siffror skall kunna redovisas.

Videometer

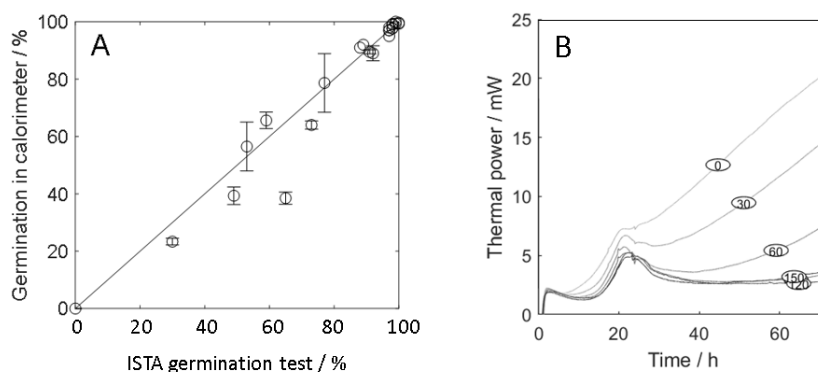
Liksom för GERMINATOR, uppvisade Videometer-analyserna bra samband med referensanalyser för korn och i viss mån för vete, men inte för havre (Tabell 4). Inte heller vid analys av samtliga prover tillsammans från 2016 erhöles bra samband. Vad gäller artificiellt åldrade prover, var sambanden relativt bra då alla prover utvärderades tillsammans, men inte då enbart korn-prover utvärderades. För naturliga prover gäller att endast en analys om 20 kärnor utförts, medan totalt ca. 20 + 50 = 70 kärnor ligger till grund för resultaten för artificiellt åldrade prover från 2017.

Tabell 4. Korrelation mellan Videometer resultat och referensanalyser efter olika försökslängd i timmar(h).

Skördeår/spannmål	Normala groddar (ISTA)			Aubry (EBC) 3 dagar			Aubry (EBC) 5 dagar		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
2015 korn (n = 22)	0,70	0,89	0,84	0,69	0,88	0,86	0,62	0,78	0,80
2016 alla prover (n = 41)	0,02	0,32	0,48						
2016 korn (n = 17)	0,46	0,85	0,91				0,52	0,91	0,94
2016 havre (n = 15)	0,33	0,54	0,46						
2016 vete (n = 9)	0,39	0,51	0,17						
2017 vete och korn art. åldrade (n = 14)	0,74	0,83	0,86						
2017 korn art. åldrade (n = 7)	0,79	0,58	0,50	0,72	0,47	0,34	0,66	0,38	0,20

Isoterm Kalorimetri

Figur 5A visar ett exempel på att grobarheten i kalorimetern (mätt visuellt efter mätning) väl följer grobarheten mätt med en referensmetod ($r=0,98$). I detta fallet var det dubbelbestämningar av kornprover från skördeår 2015 som körts i kalorimetern. Fig. 5B visar ett exempel på hur värmeeffekterna mätta med kalorimetern minskar när tiden för värmebehandling ökas (resultat från artificiellt åldrade prover från skördeår 2017). Notera att även döda kärnor ger ifrån sig värme eftersom det sker respirationsliknande kemiska processer i dem även om det inte leder till groningen.



Figur 5. A) Jämförelse mellan ISTA-metod och visuell bedömning av andel grodda kärnor vid isoterm kalorimetri. B) Kurvor som visar värmeeffekt utvecklad vid analys av artificiellt åldrade prover (0-150 min.) från skördeår 2017.

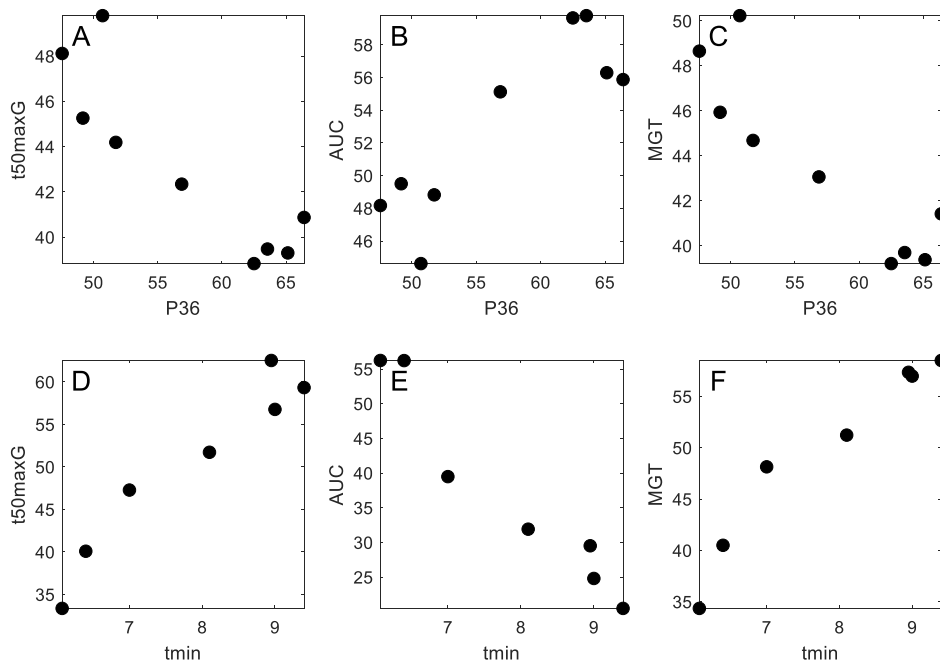
Jämförelse av de olika metoderna

För att kunna jämföra GERMINATOR och Videometeranalyser av naturliga prover, har ett slumpmässigt prov valts ut bland de 4 eller 3 upprepningar som körts i GERMINATOR-utrustningen. Rådata har använts, alltså andel kärnor som bedömts ha grott vid olika tidpunkter (Tabell 5).

Tabell 5. Korrelation mellan detekterad % groning med Videometer och GERMINATOR och referensanalyser efter olika försökslängd i timmar (h) för naturliga prover från skördeår 2015 och 2016.

Skördeår/prover	Normala groddar (ISTA)				Aubry (EBC) 3 dygn				Aubry (EBC) 5 dygn			
	Videometer		GERMINATOR		Videometer		GERMINATOR		Videometer		GERMINATOR	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
2015 (n = 18)	0,91	0,82	0,77	0,82	0,90	0,83	0,85	0,88	0,88	0,83	0,81	0,84
2016 alla prover (n = 41)	0,32	0,48	0,65	0,81								
2016 korn (n = 17)	0,85	0,91	0,87	0,85	0,91	0,94	0,94	0,92				
2016 havre (n = 15)	0,54	0,46	0,31	0,39								
2016 vete (n = 9)	0,51	0,17	0,46	0,68								

Resultaten från isoterm kalorimetri har även jämförts med resultaten från GERMINATOR-metoden (Figur 6 A-F). För att göra detta bestämdes ett antal mätpunkter på kalorimeterkurvorna. Här visar vi valda resultat med tmin (tiden till minimum, h) och P36 (värmeeffekten efter 36 h, mW). I A-C visas data för vete (skördeår 2016) och i D-E visas data för värmebehandlat korn (skördeår 2017). För A-C visas att värmeeffekten efter 36 h väl förutsäger tiden till hälften av kärnorna har grott (t50maxG), arean under groningskurvan (AUC) och medeltiden till groning (MGT) enligt GERMINATOR-metoden. I D-F visas att tiden till minimumet i värmeeffektkurvorna korrelerar väl till samma GERMINATOR-variabler som i A-C.



Figur 6. Jämförelse av några olika mått erhållna från GERMINATOR-metoden och P36 (Värmeeffekt efter 36 timmar i mW) och tmin, tid för minimum i värmeeffekt, från isoterm kalorimetri.

Korrelationerna ovan är intressanta eftersom kalorimeter-indexen är tagna betydligt tidigare än vad man kan göra för metoder baserade på räkning av grodda kärnor. Framförallt gäller detta för D-F, där kalorimetern ger resultat efter mindre än 10 h som korrelerar väl med t ex tiden till hälften av kärnorna har grott, något som man inte kan veta förrän efter en längre tids mätning (minst 48 h för ovanstående GERMINATOR-mätningar).

Tre begränsningar med kalorimetermetoden skall nämnas. För det första så är mätinstrumenten relativt dyra och proven måste hållas i instrumenten under hela mättiden. För det andra så har vi inte sett lika bra korrelationer som visas ovan i samtliga fall. Korrelationen med tmin (D-F) finns t ex inte för icke-värmebehandlade kärnor, vilket tyder på att de värmebehandlingsmetoder som har använts inte åldrar eller skadar kärnor på samma sätt som naturlig åldring. För det tredje så fungerar kalorimetern bäst när det är stor skillnad i vitalitet mellan proven; kalorimetern kan inte skilja på olika partier med hög grobarhet, t ex 97 och 100%. Trots dessa nackdelar är metoden intressant eftersom den fungerar enligt en helt annan princip än andra använda metoder. Kalorimetern mäter inte grobarheten direkt, men där kan andra index användas för att korrelera med referensmetoderna; korrelationen mellan värmeeffekten vid 72 h mätt på 100 kärnor med Isoterm Kalorimetri och normala groddar enligt ISTA-metoden för 2015 års kärnor var 0,94, alltså något bättre än de redovisade resultaten för enkelanalyser med Videometer respektive GERMINATOR (Tabell 5).

För de artificiellt åldrade proverna jämfördes korrelationen mellan mätvärdena efter ca. 48 timmar för de bildanalysbaserade metoderna och referensmetoden (ISTA). Det skiljer då inte mycket mellan metoderna, för Videometer är korrelationen 0,83, och för GERMINATOR, (t10) 0,89. I båda fallen användes 60-70 kärnor.

Slutsatser

- GERMINATOR utrustningen och Videometer ger en bra bedömning av groningsegenskaper efter ca. 48 timmar. Detta gäller för korn och i viss mån för vete, medan havre utgör ett större problem.
- Ursprunglig GERMINATOR-metod kunde i stort sett användas.
- GERMINATOR-metoden sattes upp och skalades upp i Skara med tillfredsställande resultat, vilket visar på att metoden på ett enkelt sätt kan sättas upp på nya platser.
- Videometer och GERMINATOR-metod gav likartade resultat som TZ-snabbmetod.
- Analyser med Videometer och GERMINATOR noterades att det blåa våglängds-intervallet hade störst betydelse för att särskilja grodda från icke grodda spannmålskärnor.
- Isoterm kalorimetri mäter inte grobarhet, så där får istället andra mått användas för korrelationsanalyser. Gör man detta finner man många mycket bra korrelationer inom varje årgång av kärnor, exempelvis för kornmaterialet från 2015 års skörd, men korrelationerna är inte lika bra för hela materialet. Ett intressant resultat är att det i vissa fall tycks vara möjligt att bedöma gronings-egenskaperna tidigare än med de andra metoderna. En fördel kan vara att en uppskalning av metoden kan ge stabilare resultat, men syreförsörjningen kan vara en begränsning.

Nytta för näringen och rekommendationer

Metoderna kan ha ett stort värde för näringen, så det finns behov av snabba bedömningar av groningsegenskaper i många sammanhang, där man inte har tid/råd att sända prover till externt laboratorium och i många fall är certifieringsanalyser inte nödvändiga. I första hand behöver metoderna bli mer användarvänliga. I fallet med Videometer behöver provhanteringen ses över och när det gäller GERMINATOR behöver både provhanteringen och användargränssnitt vid själva analysen förenklas och förbättras, men metoden goda resultat är lovande för att kunna ta fram ett kostnadseffektiv metod. För kalorimetri behöver man undersöka möjligheterna att använda ett billigare mätinstrument och att bara arbeta med korta mätningar (24 h). Man behöver även göra en kostnads kalkyl för hur en utrustning som kan utföra en analys till konkurrenskraftigt pris skulle kunna tillverkas.

Referenser

- Joosen, R.V.L., Kodde, J., Willems, L.A.J., Ligterink, W., van der Plas, L.H.W. & Hilhorst, H.W.M. 2010. GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal* 62, 148-159.
- Möller, B., Munck, L. 2002. Seed vigour in relation to heat sensitivity and heat resistance in barley evaluated by multivariate data analysis. *J.Inst. Brew.* 108 (3), 286-293.
- Olesen, M., Nikneshan, P., Shrestha, S., Tadayyon, A., Deleuran, L., Boelt, B., & Gislum, R. 2015. Viability prediction of *Ricinus communis* L. seeds using multispectral imaging. *Sensors*, 15(2), 4592-4604.
- Shrestha, S., Deleuran, L., Olesen, M., & Gislum, R. 2015. Use of multispectral imaging in varietal identification of tomato. *Sensors*, 15(2), 4496-4512.
- Boelt, B., Shrestha, S., Salimi, Z., Jørgensen, J. R., Nicolaisen, M., & Carstensen, J. M. 2018. Multispectral imaging—a new tool in seed quality assessment?. *Seed Science Research*, 28(3), 222-228.

Del 3. Resultatförmedling

Vetenskapliga publiceringar	Lars Wadsö "Isothermal calorimetry of terrestrial samples: handling oxygen and carbon dioxide", manuskript under utarbetande; skall skickas till J. Thermal Anal. Calorimetry
	Lars Wadsö, Thomas Börjesson, "Method based on isothermal calorimetry to assess the respiration rate during grain germination", manuskript under utarbetande; skall skickas till Seed Science and Technology (ISTA) under 2020
	Wadsö, Jørgensen, Ligterink, Börjesson "Evaluation of quick methods to assess germination in cereal grains", manuskript som skall skrivas under 2020. Förslag på tidsskrift: Seed Science and Technology
Övriga publiceringar	
Muntlig kommunikation	Thomas Börjesson: ISTA-konferens Hyderabad, Indien, juni 2019, Muntlig presentation.
	Thomas Börjesson, Johannes Ravn Jørgensen: Grönt Möte, Skara, september 2019
	Thomas Börjesson: NordPlant Annual Day, Lund, november 2019
	Wadsö, konferens International Society for Biological Calorimetry (ISBC XVIII), Krakow, 2018 "A calorimetric method to study grain germination"
	Wadsö, konferens International Society for Biological Calorimetry (ISBC XIX) Basel, 2016 "Studying barley grain germination by isothermal calorimetry"
	Wadsö, besök på Science & Advice for Scottish Agriculture (SASA), 13 oktober 2016, presentation "Studying barley grain germination by isothermal calorimetry"
Studentarbete	Hannes Haraldsson, "Utsäde, klasser och certifiering" BYS-studentarbete höst 2017.
Övrigt	