

Bioforsk Rapport

Vol. 3 Nr. 88 2008

Utvikling av tester for å skille frøpartier med ulik spirekraft av Lea rødkløver og Grindstad timotei

Lars T. Havstad¹⁾, Trygve S. Aamlid¹⁾, Anders Lomholt²⁾ og Anne A. Steensohn¹⁾

¹⁾Bioforsk Øst Landvik ²⁾Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, Danmark





Hovedkontor
Frederik A. Dahls vei 20,
1432 Ås
Tlf: 03 246
Fax: 63 00 92 10
post@bioforsk.no

Bioforsk Øst Landvik
Reddalsveien 330
4886 Grimstad
Tlf: 03 246
Faks: 37044278
landvik@bioforsk.no

Tittel/Title:
Utvikling av tester for å skille frøpartier med ulik spirekraft av Lea rødkløver og Grindstad timotei

Forfatter(e)/ Autor(s):
Lars T. Havstad, Trygve S. Aamlid, Anders Lomholt og Anne A. Steensohn

<i>Dato/Date:</i> 12. juni 2008	<i>Tilgjengelighet/Availability:</i> Åpen	<i>Prosjekt nr./Project No.:</i> 1910059	<i>Arkiv nr./Archive No.:</i>
<i>Rapport nr./Report No.:</i> Vol. 3 No 88 (2008)	<i>ISBN-nr.:</i> 978-82-17-00394-6	<i>Antall sider/Number of pages:</i> 18	<i>Antall vedlegg/Number of appendix:</i> Ingen /no

<i>Oppdragsgiver/Employer:</i> Felleskjøpet Agri	<i>Kontaktperson/Contact person:</i> Jon Atle Repstad
---	--

<i>Stikkord/Keywords:</i> Timotei, rødkløver, frø, spiring, forsert aldring, spireindeks,	<i>Fagområde/Field of work:</i> Korn, oljevekster og frøproduksjon
--	---

Sammendrag
Frøets levetid er i høy grad korrelert med frøets livskraft (seed vigour), dvs. evnen til å spire raskt og enhetlig i felt under ulike vekstforhold. Ved å utvikle tester som vurderer ulike frøpartiers livskraft kan en danne seg et bilde på de ulike frøpartienes levetid på lager.
Som del av det brukerstyrteprosjektet 'SAFE-SEED: Safe supply of climatically adapted forage seed through reduced storage losses' ble det ved Bioforsk Øst Landvik i 2007 utviklet livskraftstester for å skille frøpartier av Grindstad timotei og Lea rødkløver. Testene som ble prøvd ut var forsert aldringstest (eng: Accelerated Ageing, AA-test), Polyetylenglykol (PEG)-test og spireindekstest.
I timotei var både forsert aldringstest, hvor frøet ble oppvarmet til 45 °C i 56 timer før spireanalyse (opptelling av spirer etter 7 og 10 dager), og en forenkla spireindekstest med opptelling av nye spirer (>2 mm) etter 3 og 5 dager egnede tester for å skille "gode" og "dårlige" timoteipartier fra hverandre. I rødkløver var en forsert aldringstest, med oppvarming av rødkløverfrø i 24 timer ved 45 °C og 100 % relativ luftfuktighet, den beste behandlingen for å skille "gode" og "dårlige" frøpartier.

Godkjent / Approved

Prosjektleder/Project leader

.....
Ingvar Hage / Direktør

.....
Lars T. Havstad

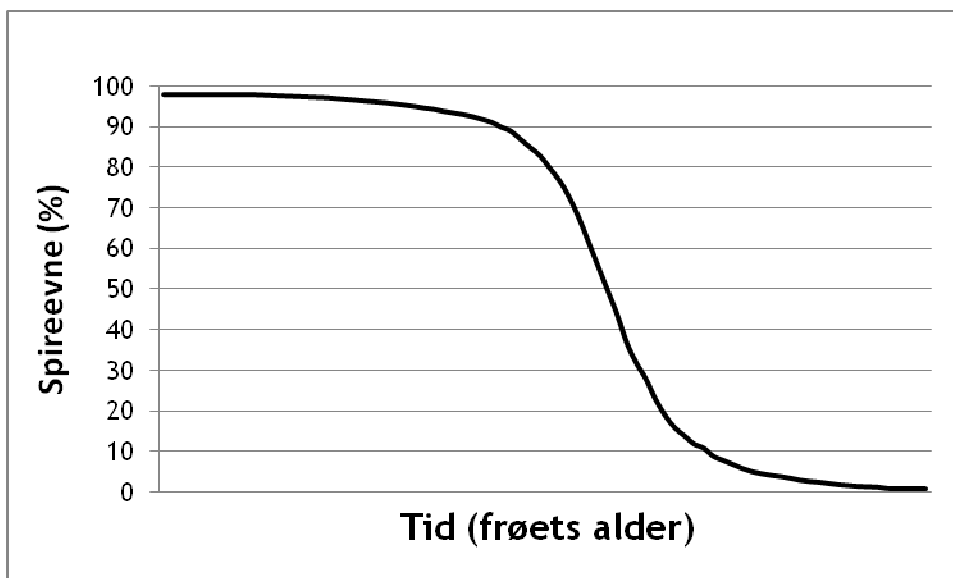
Innhold

2. Innledning.....	3
2. Utvelgelse / tillaging av referansesett	5
3. Utprøving av livskrafttester på referansepartiene	7
3.1 Spireindeks (SI)-test:.....	7
3.1.1 Metode	7
3.1.2 Resultater	7
3.2 Polyetylen glykol (PEG)-test.....	8
3.2.1 Metode	8
3.2.2 Resultater	9
3.3 Forsert aldringstest (AA-test).....	9
3.3.1 Innledende screening - Metode	10
3.3.2 Innledende screening - Resultater	10
3.3.3 Endelig utprøving - Metode	12
3.3.4 Endelig utprøving - Resultater.....	12
3.4 Statistiske testkriterier	13
3.4.1 Resultater	15
3.5 Vurdering av de ulike testene - Anbefaling til Kimen	15
3.5.1 Timotei	15
3.5.2 Rødkløver	16
4. Etterord	17
5. Referanser	18

2. Innledning

Frøkvaliteten (spireevnen) hos engfrø er som regel best når frøet har nådd fysiologisk modning, dvs. maksimal tørrvekt. For de fleste arter oppstår dette allerede på gulmodningsstadiet ved om lag 40 % vann. Ved for tidlig høsting er det imidlertid lett å skade frøet, og for de fleste arter foregår derfor frøhøstinga når vanninnholdet er kommet ned i 30-35 prosent. Frøet begynner dermed å eldes allerede i frøenga mens det enda er festet til frøstengelen.

Betraktes aldringen av frø gjennom hele levetida, dannes en overlevelseskurve hvor spireevnen i starten er konstant høy eller har et ubetydelig fall (fase 1), deretter følger en fase med betydelig tap av spireevne (fase 2), og til slutt i den siste fasen er det bare svært få frø som fortsatt er i live (figur 1) (Harrington 1972).



Figur 1. Overlevelseskurve.

Hvor fort denne utviklinga går, er både genetisk bestemt (art og sort) og bestemt av miljøfaktorer som vær- og høsteforhold i høsteåret, treskerinnstillinger (skade på frøet), vanninnhold i frøet og temperatur og fuktighet på lageret. Blir frøene lagret ved høy temperatur og/eller høy fuktighet vil aldringsprosessen akselerere og spireevnen tape seg raskt. Tapet av spireevne skjer på grunn av aldringsprosesser som pågår i cellene. Det skjer endringer både i cellemembranen og molekylstrukturen hos DNA og RNA (Abdalla & Roberts 1968), samtidig som den enzymatiske og metabolske aktiviteten blir redusert (Roberts 1986).

Like etter frøhøsting er det vanskelig å bedømme hvor langt i den fysiologiske aldringen frøet har kommet bare på bakgrunn av en vanlig spireanalyse. I mange tilfeller kan to frøpartier etter tresking ha nærmest lik spireprosent men ulik levetid på lager, avhengig av hvor på overlevelseskurven frøpartiene befinner seg (figur 1).

Frøets levetid er i høy grad korrelert med frøets livskraft (seed vigour), dvs. evnen til å spire raskt og enhetlig i felt under ulike vekstforhold. Ved å utvikle tester som vurderer ulike frøpartiers livskraft kan en danne seg et bilde på de ulike frøpartienes levetid på lager. Slik informasjon vil spesielt være nyttig for frøfirmaene, som på

bakgrunn av slike tester kan få solgt unna frøpartier med dårlig livskraft (og dermed kort levetid) først, slik at tapet av spireevne på lageret begrenses.

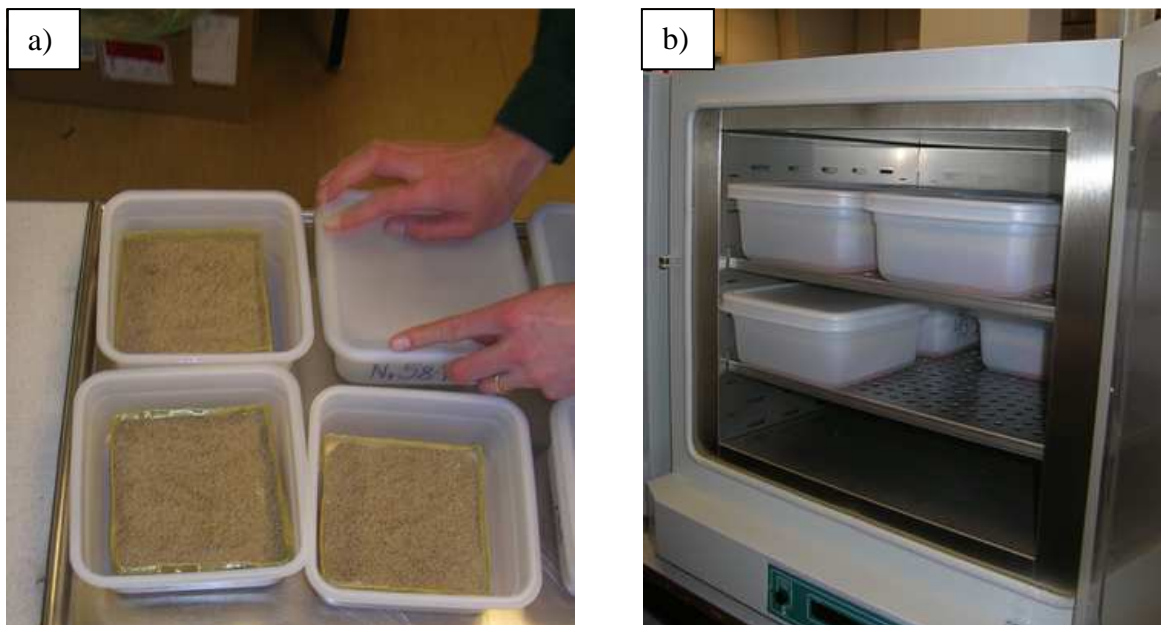
Med dette som bakgrunn satte vi på Bioforsk Landvik vinteren 2007 i gang arbeid med utvikling av livskraft-tester for å skille frøpartier av Grindstad timotei og Lea rødkløver. Arbeidet inngår i prosjektet 'SAFE-SEED: Safe supply of climatically adapted forage seed through reduced storage losses', som er et brukerstyrt prosjekt ledet av Felleskjøpet Agri og finansiert av Norges forskningsråd. Målsettingen er å komme fram til minst en test som gjør det mulig å skille "gode" og "dårlige" frøpartier med hensyn på spirekraft/lagringsevne, og som dessuten er enkel å gjennomføre, slik at den på sikt kan inngå i Kimen såvarelaboratoriums analyserutiner.

Testene som har blitt prøvd ut, både i timotei og rødkløver, er forsert aldringstest (eng: Accelerated Ageing, AA-test), Polyetylenglykol (PEG)-test og spireindeks-test. For å tilpasse disse testene til timotei og rødkløver laget vi for hver art først et referansesett bestående av seks frøpartier med noenlunde lik spireprosent, men med ulik fysiologisk alder.

2. Utvelgelse / tillaging av referansesett

For å oppnå frø med ulik fysiologisk alder valgte vi ut et kvalitetsmessig godt parti som så ble stresset ved høy temperatur / fuktig luft av ulik varighet. Partiene som ble brukt som utgangspunkt for referansesettet var kommersielt dyrket frø fra Felleskjøpet Agri med partinummer 060077 (timotei, spireevne: 97 %) og partinummer 060149 (rødkløver, spireevne: 97 %).

Frø (14-16 g) av disse to partiene ble lagt på finmaska nett m/kanter og plassert i lufttette plastbokser (bilde 1a). For å oppnå vannmettet luft (100 % luftfuktighet), var bunnen av boksen dekket av vann (150 ml). Boksene med frø ble deretter inkubert i skap ('Termaks TS 8000') med fire ulike temperaturer, 35, 38, 41 og 44 °C. Uttak ble gjort etter 10, 20, 24, 28, 34, 44, 48, 52, 58, 68, 72, 76 eller 82 timer.

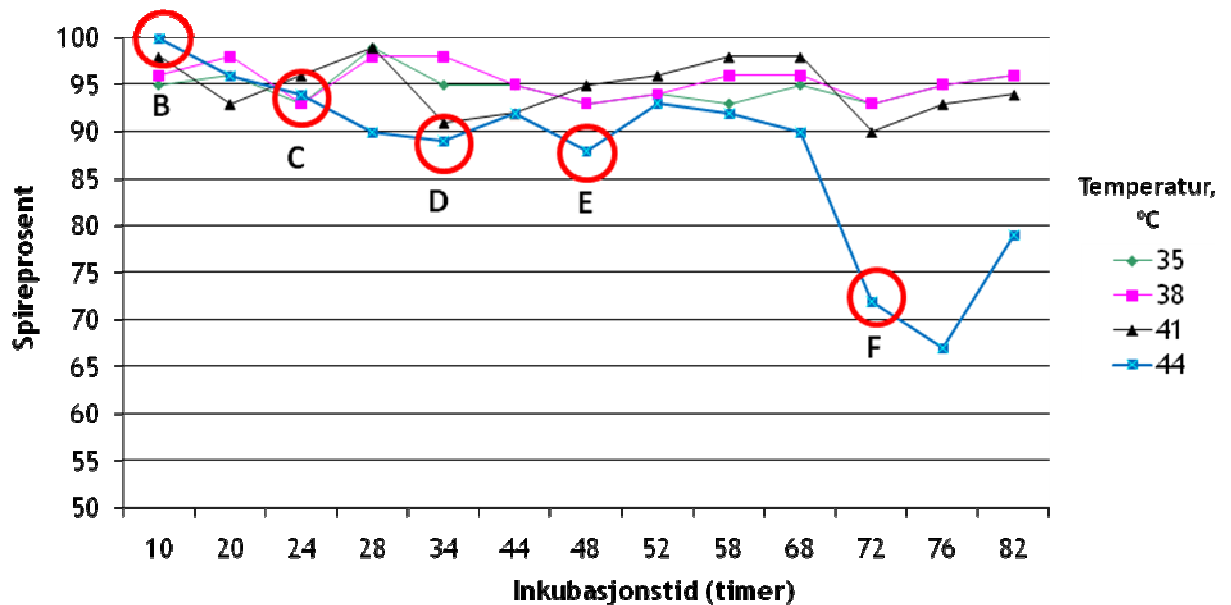


Bilde 1. Frø av timotei lagt på finmaska nett med kanter og plassert i lufttette plastbokser (a). Deretter ble boksene plassert i skap ved ulike temperaturer (b).

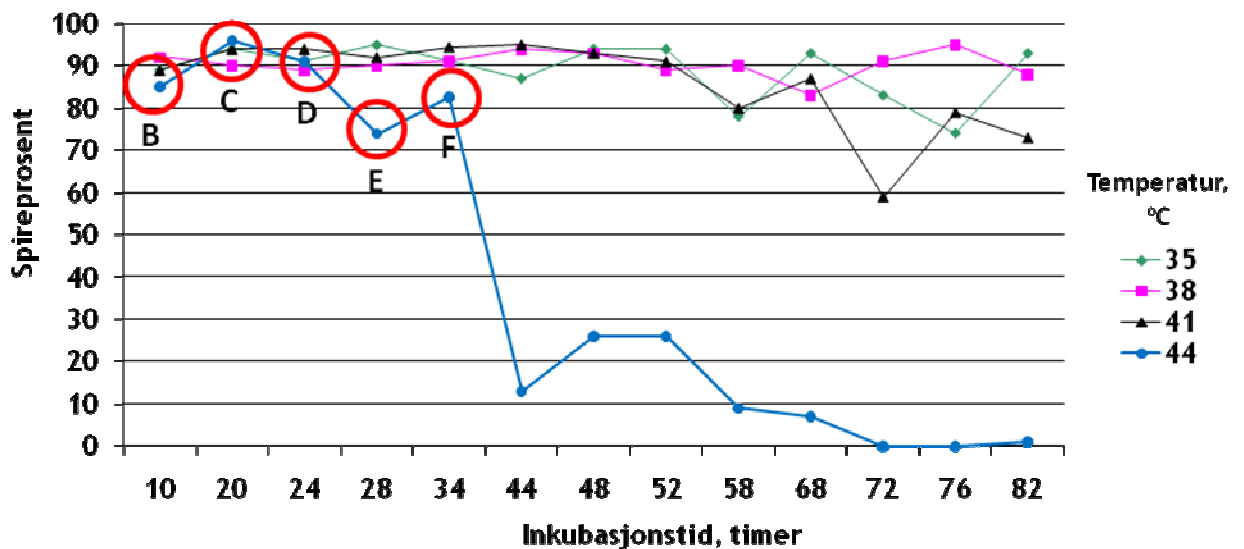
Etter inkubering ble frøet lagt til tørking ved romtemperatur. Etter siste uttak ble 4 x 100 frø fra de ulike kombinasjonene av temperatur / varighet lagt til spiring ved dag / nattetemperatur 25 / 20 °C for timotei og 20 / 20 °C for rødkløver. Resten av frøet ble lagt i papirposer og satt til lagring ved 4 °C og 30 % luftfuktighet. Spireevne n ble registrert etter 10 dager i begge arter. For hver test ble det foretatt variansanalyser for å skille de ulike behandlingene fra hverandre med hensyn til spireevne etter 10 dager. I disse analysene ble 4 paralleler a 100 frø betrakta som tilfeldig variabel. Dette ble gjort ved hjelp av SAS-prosedyren 'PROC GLM' (SAS Institute 1990).

Resultater fra spireanalysene framgår av figurene 2 og 3. I begge arter var det bare den høyeste temperaturen, 44 °C, som etter en bestemt varighet av inkubasjonen gav et markant fall i spireevne. Ved sammensetning av referansesettene til bruk i seinere deler av prosjektet ble det derfor valgt ut frøpartier som hadde vært eksponert for

denne temperaturen i ulikt antall timer. Spireevnen til de utvalgte referansepartiene framgår av figur 2. Av de utvalgte partiene i begge arter var altså den fysiologiske alderen til referanseparti A (ubehandla frø) og referanseparti F henholdsvis 'yngst' og 'eldst' iht. overlevelseskurven (figur 1).



Figur 2. Virkning av økende inkubasjonstid ved 100 % luftfuktighet og ulik temperatur på spireprosent hos Grindstad timotei. Middell av 4 paralleler a 100 frø. Referansepartiene B-F som ble valgt ut til videre bruk i prosjektet er markert med rød ring.



Figur 3. Virkning av økende inkubasjonstid ved 100 % luftfuktighet og ulik temperatur på spireprosent hos Lea rødkløver. Middell av 4 paralleler a 100 frø. Referansepartiene B-F som ble valgt ut til videre bruk i prosjektet er markert med rød ring.

3. Utprøving av livskrafttester på referansepartiene

3.1 Spireindeks (SI)-test:

Tidlig framspiring er et tegn på god livskraft. I SI-testen blir spiringshastigheten vektlagt ved at frø som spirer tidlig regnes som mer verdifullt enn frø med tregere framspiring. SI- testen utføres som en vanlig spireanalyse, men med hyppigere telling (Maguire 1962).

3.1.1 Metode

Både av Grindstad timotei og Lea rødkløver ble 4 gjentak a 100 frø av hver av de seks referansepartiene satt til spiring på spirebord. Dag / nattetemperaturen ble regulert til 25 / 20 °C (timotei) og 20 / 20 °C (rødkløver).

Første registrering ble gjort etter 2 dager for rødkløver og 3 dager for timotei. Deretter ble nye spirer telt etter hver dag fram til dag nr 7, før en siste telling avsluttet forsøket etter 10 dager i begge arter. Utrekning av spireindeksen ble i rødkløver utført på følgende måte: $SI = (\text{Antall spirer etter 2 dager} / 2) + (\text{Antall spirer etter 3 dager} / 3) + (\text{Antall spirer etter 4 dager} / 4) + (\text{antall spirer etter 5 dager} / 5) + (\text{Antall spirer etter 6 dager} / 6) + (\text{antall spirer etter 7 dager} / 7) + (\text{antall spirer etter 10 dager} / 10)$. Samme formel ble benyttet i timotei, men her startet som nevnt ikke optellingen før etter 3 dager.

Frøene ble registrert som spirt når lengden av skuddet (timotei) eller lengden av rot og skudd (rødkløver) var 2 mm eller lengre. Ved avslutningen av forsøket ble abnorme spirer og antall døde frø notert i begge arter. I rødkløver registrerte vi dessuten antall friske uspirte og antall harde, men disse ble holdt utenfor ved beregning av spireindeksen.

For å skille de ulike partiene fra hverandre med hensyn til spireindeks ble det foretatt variansanalyse ved hjelp av SAS-prosedyren 'PROC GLM' (SAS Institute 1990). I tabellene er statistisk sikre forskjeller mellom de ulike referansepartiene angitt med ulike bokstaver.

3.1.2 Resultater

I Grindstad timotei klarte vi med sikkerhet å skille alle de seks referansepartiene fra hverandre ved hjelp av SI-testen. I tillegg ble det prøvd å forenkle testen for å gjøre denne mindre arbeidskrevende. Ved å telle bare etter 3 og 5 dager ble det oppnådd nesten like godt resultat. Med denne forenkla testen klarte vi å skille fem av de seks referansepartiene fra hverandre (tabell 1).

I rødkløver var det ikke mulig å skille mer enn tre av de seks referansepartiene fra hverandre ved hjelp av spireindekstesten (tabell 1).

Tabell 1. Spireindeks (SI) for ulike referansepartier av Grindstad timotei og Lea rødkløver.

Referanse- parti	Grindstad timotei		Lea rødkløver
	Spire- indeks	Forenkla spireindeks, 3 + 5 dager	Spire- indeks
A	24.5a	20.5a	38.0a
B	23.0b	18.6b	38.4a
C	21.8c	15.5c	38.8a
D	20.0d	12.1d	38.5a
E	18.0e	12.1d	34.3b
F	11.4f	0.9e	28.3c
P%	<0.01	<0.01	<0.01

3.2 Polyetylenglykol (PEG)-test

I denne testen spires frøet i petriskåler der spirepapiret i stedet for vann er fuktet med en oppløsning av polyetylenglykol (PEG). PEG senker det osmotiske potensialet i løsningen og gjør det dermed vanskeligere for frøet å ta opp vann. Når forholdene for spiring blir vanskelig vil frøet med best livskraft spire bedre enn dårligere frø.

3.2.1 Metode

Testen ble både i timotei og rødkløver utført ved at petriskåler med spirepapir i bunnen ble fuktet med 3 ml PEG-løsning med følgende osmotiske potensial (Ψ) / PEG-konsentrasjon:

1. 0,00 (sterilt vann)
2. -0,15 MPa (96,5 g PEG/ l dest. vann)
3. -0,30 MPa (146,5 g PEG/ l dest. vann)
4. -0,45 MPa (185,0 g PEG/ l dest. vann)
5. -0,60 MPa (217,5 g PEG/ l dest. vann)

Sammenhengen mellom osmotisk potensial og PEG-konsentrasjonen er her beregnet ut fra Michel & Kaufmann 1973).

For hver av de fem PEG-konsentrasjonene ble det lagt ut 4 x 100 frø fra hver av de seks referansepartiene. Det var 50 frø pr skål og to og to skåler ble telt sammen. Etter at frøene var plassert ble skålene påført lokk og forseglet med parafilm for å hindre uttørking. Deretter ble skålene satt opp på spirebordet der temperaturen var regulert til 25 / 20 °C for timotei og 20 / 20 °C for rødkløver. Antall spirer ble telt etter 7 og 10 dager i timotei og 5 og 10 dager i rødkløver. For å hindre oksygenmangel ble skålene luftet ved at lokket ble tatt av og på etter 3 og 7 dager i rødkløver, og etter 3 dager i timotei.

For å skille de ulike partiene fra hverandre med hensyn til antall spirer etter 5 (rødkløver) / 7 (timotei) og 10 dager (begge arter) ble det foretatt variansanalyse ved hjelp av SAS-proseduren 'PROC GLM' (SAS Institute 1990). For å sikre lite varians og normalfordeling ble analysene alltid foretatt på arkus-sinus transformerte verdier. I tabellene er statistisk sikre forskjeller mellom referansepartiene angitt med ulik bokstaver.

3.2.2 Resultater

Enten antall spirer ved første eller andre telling ble brukt som kriterium ble best separasjon av de seks referansepartiene av timotei fra oppnådd et osmotisk trykk på -0,60 MPa (tabell 2). Ved disse spireebetingelsene kunne fem av de seks referansepartiene skilles med sikkerhet. I rødkløver var forskjellen mellom de ulike partiene tydeligst (fem av seks partier) ved et osmotisk trykk på -0,15 MPa (tabell 3).

Tabell 2. Virkning av ulik osmotisk trykk (MPa) på antall spirer etter 7 døgn og 10 døgn hos Grindstad timotei.

Referanse- parti	Spiring etter 7 dager (%)					Spiring etter 10 dager (%)				
	0,00 MPa	-0,15 MPa	-0,30 MPa	-0,45 MPa	-0,60 MPa	0,00 MPa	-0,15 MPa	-0,30 MPa	-0,45 MPa	-0,60 MPa
A	96.5a	95.7a	92.5a	72.7a	67.5a	97.8a	98.7a	96.3a	81.9a	67.5a
B	91.5b	96.2a	92.4a	66.4a	55.0b	95.3ab	98.0a	96.2a	78.4a	55.0b
C	92.1b	93.3a	77.4b	40.0b	29.7c	97.9a	97.7a	87.2b	54.5b	29.7c
D	83.7c	76.2b	57.1c	37.1b	9.4d	95.3ab	91.8ab	76.4c	60.2b	12.1de
E	84.2c	74.3b	63.7c	45.3b	12.8d	92.5b	87.3b	83.5bc	51.0b	15.3d
F	27.3d	37.9c	23.5d	15.5c	0.5e	62.8c	76.0c	64.8d	32.1c	4.0e
P %	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<1	<0.01	<0.01	<0.01

Tabell 3. Virkning av ulik osmotisk trykk på antall spirer etter 5 døgn og 10 døgn hos Lea rødkløver.

Referanse- parti	Spiring etter 5 dager (%)					Spiring etter 10 dager (%)				
	0,00 MPa	-0,15 MPa	-0,30 MPa	-0,45 MPa	-0,60 MPa	0,00 MPa	-0,15 MPa	-0,30 MPa	-0,45 MPa	-0,60 MPa
A	94.5a	93.0a	70.8a	0.0	0.0	96.8a	95.8ab	83.3a	38.8bc	19.8a
B	96.0a	94.3ab	55.5b	0.0	0.0	98.5a	97.0a	82.8a	67.5a	13.0b
C	94.8a	89.5b	46.0b	0.0	0.0	96.5a	91.3b	83.5a	52.8ab	1.5c
D	85.0b	81.5c	33.8c	0.0	0.0	88.0b	84.3c	78.5a	30.3c	2.0c
E	86.5b	68.0d	21.5d	0.0	0.0	91.3b	76.3d	54.0b	23.3c	2.8c
F	62.5c	40.0e	12.3d	0.0	0.0	68.0c	61.3e	43.0c	20.5c	1.0c
P %	<0.01	<0.01	<0.01	-	-	<0.01	<1	<0.01	<1	<0.01

3.3 Forsert aldringstest (AA-test)

Ved forsert aldring (AA-test) blir frø oppbevart ved tilnærmet 100 prosent luftfuktighet og høy temperatur i en bestemt periode (på samme måte som ved tillaging av referansepartiene). Ettersom fuktighet og varme er de to viktigste faktorene som styrer frøets fysiologiske alder, vil frøet på denne måten eldes svært raskt. Ved å framskynde aldringen beveger frøet seg fra den konstante delen (fase 1) til den bratte delen (fase 2) av overlevelseskurven (Delouche & Baskin 1973) (figur 1).

Etter en slik forsert aldring kan frø som før hadde noenlunde samme spireevne, men var på ulik aldringsnivå, skilles fra hverandre ved hjelp av en vanlig spireanalyse.

For å innsnevre det aktuelle temperaturområdet / varigheten for å skille de seks referansepartiene fra hverandre ble det både i rødkløver og timotei utført en innledende screening (uten gjentak) før den endelige testen ble utført.

3.3.1 Innledende screening - Metode

I screeningen ble 0,25 g frø av hvert av de seks referansepartiene av hver art fordelt på små finmaska nett med kanter. Nettet med frø ble så plassert på en ring av plast midt i et 100 ml stort plastglass (høyde: 7 cm, diameter: 6 cm) med skrulokk (bilde 2). Bunnen av glasset var dekt med vann (40 ml) for å oppnå høy luftfuktighet. Frøet ble påført et tynt lag med soppmidlet Thiram før lokka ble skrudd på og glassene inkubert ved fire ulike temperaturer (38, 41, 44 og 48°C) i 24, 48, 72 eller 96 timer. Det var til sammen 96 kombinasjoner (6 referansepartier x 4 temperaturer x 4 uttak) av hver art.

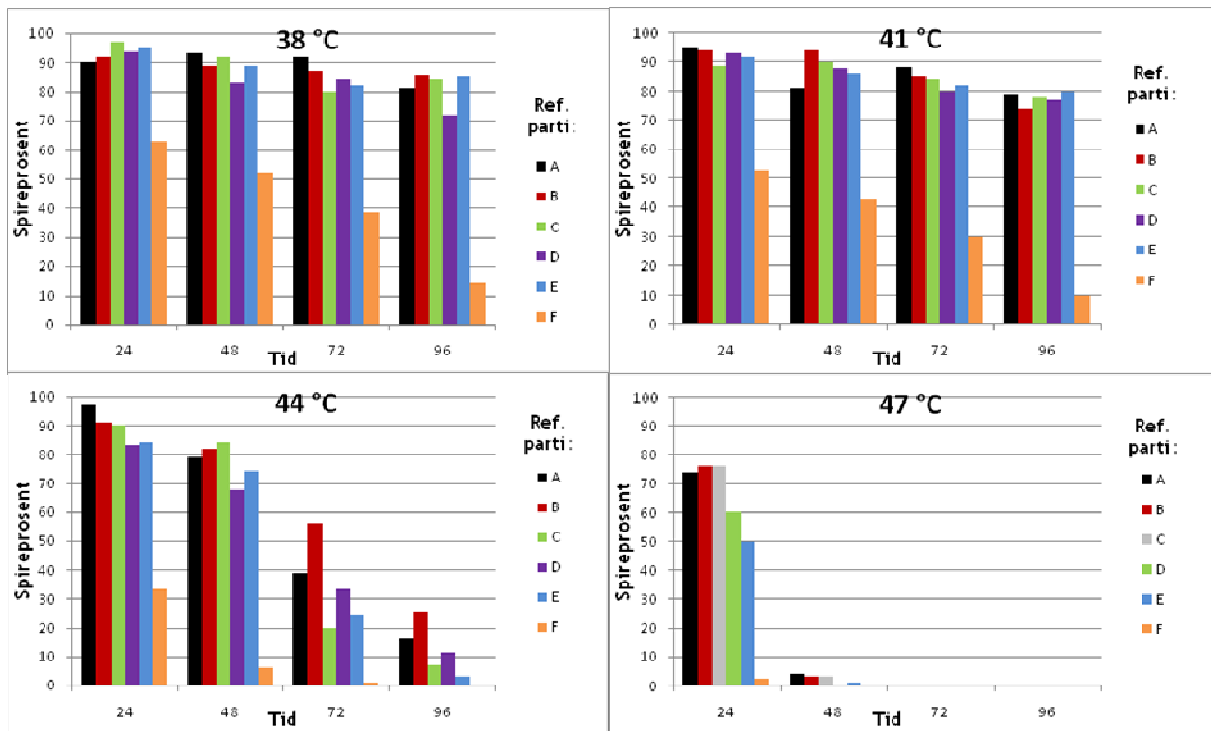


Bilde 2. Plastglass med skrulokk, samt det finmaska nettet som ble brukt i forsøkene med forsert aldring.

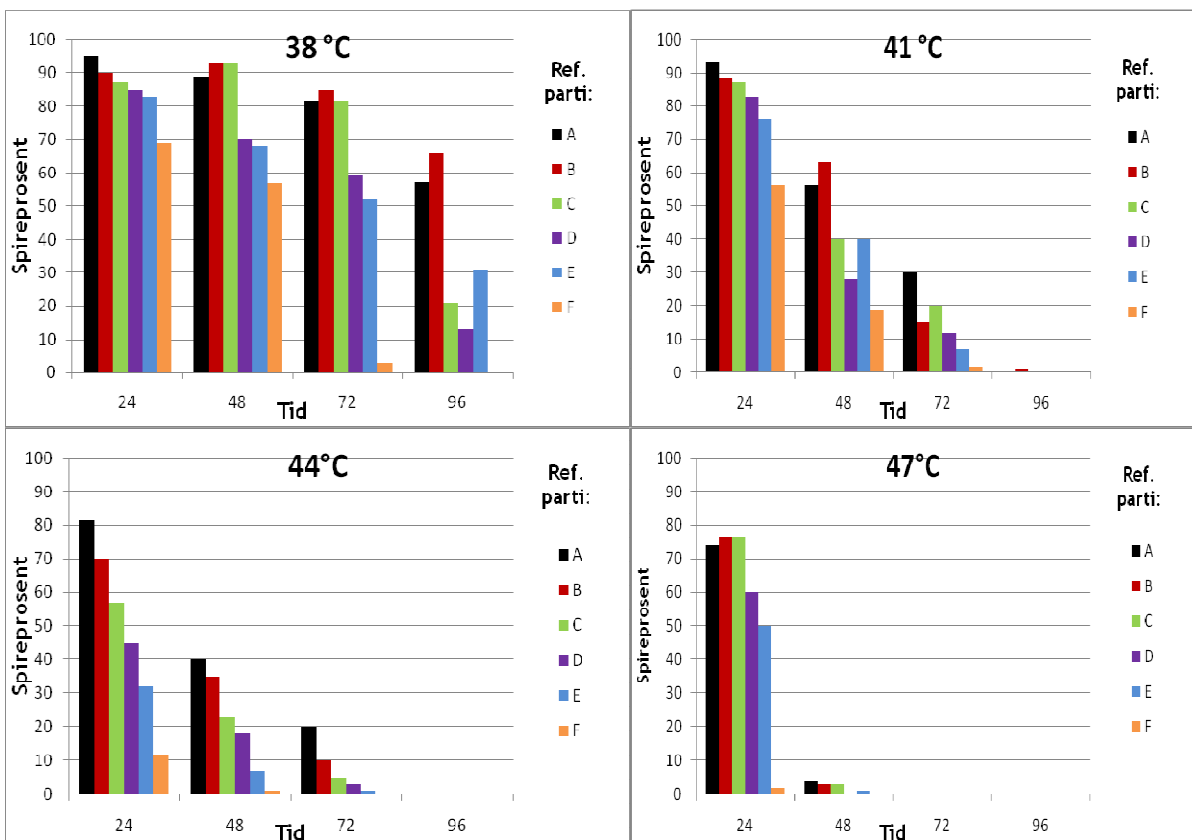
Ved hvert uttak ble det finmaska nettet med frø tatt ut av plastglassa og lagt til tørking ved romtemperatur i 1-2 døgn. Deretter ble det utført en vanlig spireanalyse med 100 frø.

3.3.2 Innledende screening - Resultater

Både hos timotei og rødkløver viste screeningen at de ulike partiene ble best skilt ved inkubering ved 44 °C (figur 4 og 5).



Figur 4. Virkning av forsert aldring ved ulike temperaturer og varighet (timer) på antall spirer etter 10 dager hos seks referansepartier av Grindstad timotei. Screeningforsøk.



Figur 5. Virkning av forsert aldring ved ulike temperaturer og varighet (timer) på antall spirer etter 10 dager hos seks referansepartier av Lea rødkløver. Screeningforsøk.

3.3.3 Endelig utprøving - Metode

Ut fra resultatene i det innledende forsøkene ble det valgt å kjøre et mer detaljerte forsøk ved 43 og 45 °C, med varighet i enten 32, 48 og 72 timer (timotei) eller 24, 32 og 48 timer (rødkløver). Forsøkene ble gjennomført på samme måte som i det screeningsforsøkene, men med 4 paralleler a 100 frø (iht. ISTA standard).

For å skille de ulike partiene fra hverandre med hensyn til antall spirer etter 5 (rødkløver) / 7 (timotei) og 10 dager (begge arter) ble det foretatt variansanalyse ved hjelp av SAS-proseduren 'PROC GLM' (SAS Institute 1990). For å sikre lite varians og normalfordeling ble spiretalla alltid arkus-sinus transformert før analyse. I tabellene er statistisk sikre forskjeller mellom referansepartiene angitt med ulike bokstaver.

3.3.4 Endelig utprøving - Resultater

I timotei var det forsert aldring i 56 timer ved 45°C som best skilte de ulike referansepartiene (tabell 4), mens 24, 32 og 48 timer ved 43 °C, eller 24 timer ved 45 °C, kom best ut i rødkløver (tabell 5) ved opptelling etter 10 dager. I begge arter klarte testen sikkert å skille fem av de seks referansepartiene fra hverandre.

Tabell 4. Virkning av temperatur og varighet ved forsert aldring på antall spirer etter 7 eller 10 dager hos Grindstad timotei.

	Antall spirer etter 7 dager						Antall spirer etter 10 dager					
	43°C			45°C			43°C			45°C		
	32t	48t	56t	32t	48t	56t	32t	48t	56t	32t	48t	56t
A	86.5a	80.8a	81.8a	73.5a	68.8a	59.5a	92.5a	90.0a	90.3a	90.3a	85.3a	78.5a
B	86.3a	82.5a	84.3a	70.5a	67.3a	45.0b	89.0ab	87.5a	90.3a	88.0a	84.0a	76.5a
C	80.5b	82.5a	73.3b	68.3a	48.0b	25.3c	89.5ab	88.3a	85.0b	88.8a	71.0b	64.3b
D	76.5bc	64.3b	65.3c	52.5b	31.5c	14.0d	88.3bc	80.8b	81.3bc	79.0b	63.8c	52.5c
E	74.3c	70.0b	60.3c	47.0b	27.8c	8.0d	85.0c	84.8ab	78.0c	80.8b	62.3c	34.0d
F	15.5d	6.8c	4.3d	3.8c	0.0d	0.0e	47.0d	22.0c	19.8d	18.5c	2.5d	0.8e
Sign,%	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

Tabell 5. Virkning av temperatur og varighet ved forsert aldring på antall spirer etter 5 eller 10 dager hos Lea rødkløver.

	Antall spirer etter 5 dager						Antall spirer etter 10 dager					
	43°C			45°C			43°C			45°C		
	24t	32t	48t	24t	32t	48t	24t	32t	48t	24t	32t	48t
A	88.8a	63.5a	46.0a	84.8a	62.0a	0.0a	94.5a	79.3a	73.0a	88.5a	78.8a	5.5a
B	87.0a	57.3a	35.0b	73.0b	57.8a	0.0a	91.3a	79.3a	58.0b	80.0b	73.0b	9.8a
C	72.5b	39.8b	12.0c	32.3c	11.8b	0.0a	80.0b	70.8b	30.0c	47.5c	14.0c	0.5b
D	57.5c	25.3c	4.0d	30.3c	9.0b	0.0a	62.5c	57.0c	18.8d	46.3c	15.5c	0.0b
E	39.0d	17.8c	0.0d	11.8d	0.0c	0.0a	47.8d	34.8d	0.3e	14.0d	0.3d	0.8b
F	11.5e	2.3d	0.0d	4.3d	0.8c	0.0a	13.8e	3.8e	0.0e	4.5e	0.8d	0.0b
Sign,%	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.2

3.4 Statistiske testkriterier

Av foregående avsnitt framgår at de mest lovende livskrafttestene i de to artene var:

Timotei:

1. Spireindeks med telling hver dag fra dag nr 3 til dag nr 7, + dag nr 10.
2. Spireindeks med telling dag nr 3 og dag nr 5.
3. PEG-test, -0.6 MPa, telling etter 7 dager.
4. PEG-test, -0.6 MPa, telling etter 10 dager.
5. AA-test, 45 °C, 56 timer, telling etter 7 dager
6. AA-test, 45 °C, 56 timer, telling etter 10 dager

Rødkløver:

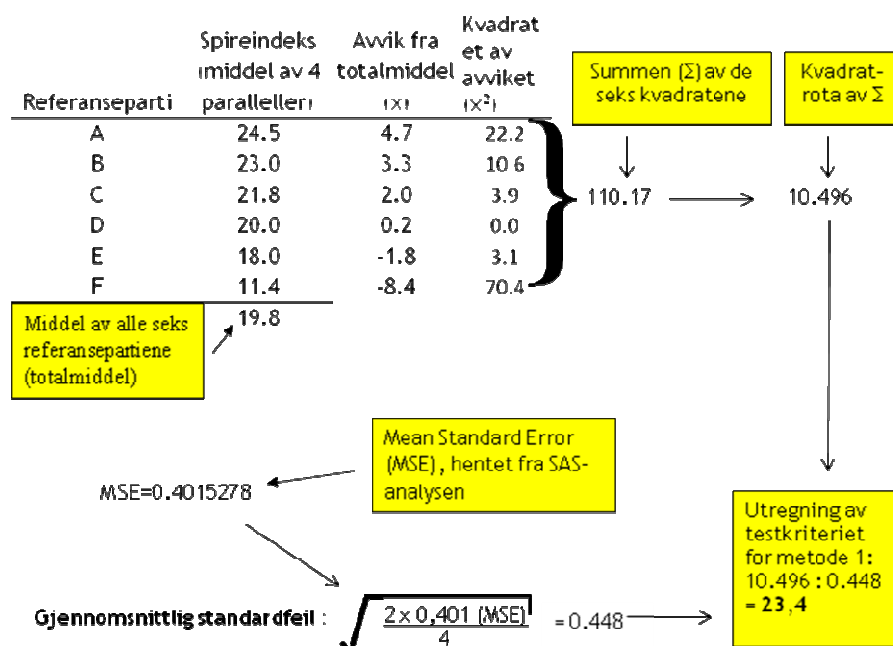
1. Spireindeks med telling hver dag fra dag nr 2 til dag nr 7, + dag nr 10
2. PEG-test, -0.15 MPa, telling etter 5 dager.
3. PEG-test, -0.15 MPa, telling etter 10 dager.
4. AA-test, 43 °C, 24 timer, telling etter 5 dager
5. AA-test, 43 °C, 24 timer, telling etter 10 dager
6. AA-test, 43 °C, 32 timer, telling etter 10 dager
7. AA-test, 43 °C, 48 timer, telling etter 10 dager
8. AA-test, 45 °C, 24 timer, telling etter 10 dager

For å finne den aller beste av disse livskrafttestene ble det, etter råd fra statistiker Kristian Kristensen ved Institutt for Genetik og Bioteknologi, Aarhus Universitet, i Danmark (2007) valgt ut tre ulike statistiske testkriterier.

Testkriterium 1:

For det første testkriteriet (1) var utgangspunktet antall spirer etter 5 / 7 eller 10 dager (evt. spireindeksen i spireindekstesten) for hver av de seks referansepartiene (middel av de fire seriene a 100 frø). Det ble først regnet et gjennomsnitt av disse seks middeltallene før kvadratroten til gjennomsnittet ble kalkulert. For å komme fram til selve sammenligningstallet, som er vist i tabell 6 og 8, ble kvadratrot til slutt dividert med den gjennomsnittlige standardfeilen for de ulike partiene som vist i eksempel 1.

Eksempel 1. Utregning av testkriterie 1 for spireindekstesten i timotei:



Testkriterium 2:

Også for testkriterium 2 var utgangspunktet spireevnen evt. spirehastighetene /spireindeksen for hver av de seks referansepartiene (middel av 400 frø).

Testverdien ble funnet ved først å regne ut differansen mellom de seks ulike middelverdiene (dvs. differansen mellom Parti 1 og Parti 2, Parti 1 og Parti 3, Parti 1 og Parti 4 osv.). Deretter ble gjennomsnittet av alle disse differansene dividert med den gjennomsnittlige standardfeilen for de ulike partiene som vist i eksempel 2.

Eksempel 2. Utrekning av testkriterium 2 for spireindekstesten i timotei:

Referanseparti	Spireindeks (middel av 4 paralleller)
A	24.5
B	23.0
C	21.8
D	20.0
E	18.0
F	11.4

De ulike referansepartienes spireindeks (ev. spireprosent) er utgangspunkt for utregningen.

I tabellen nedenfor er differansen mellom de seks ulike middelverdiene regnet ut. Eks. differansen mellom Parti A (24.5) og Parti B (23.0) = 1.5.

Referanseparti	A	B	C	D	E	F
A	-	1.5	2.7	4.5	6.5	13.1
B		-	1.3	3.0	5.0	11.6
C			-	1.8	3.7	10.4
D				-	2.0	8.6
E					-	6.6
F						-

Gjennomsnitt av alle differansene

5.486

MSE=0.4015278

Mean Standard Error (MSE), hentet fra SAS-analysen

Gjennomsnittlig standardfeil:

$$\sqrt{\frac{2 \times 0.401 (MSE)}{4}} = 0.448$$

Utrekning av testkriteriet for metode 2:
5.486 : 0.448 =
12.2

Testkriterium 3:

Utgangspunktet for det siste kriteriet (3) var den statistiske variansanalysen, hvor selve F-verdien ble benyttet som testkriterium.

Testkriteriene ga alle et mål på forskjeller i varians, og dermed på hvor godt de ulike livskrafttestene klarer å skille de ulike partiene fra hverandre. Høye verdier tilsier bra adskillelse.

3.4.1 Resultater

Hos timotei var det den forenkla spireindekstesten som kom best ut, uavhengig av testkriterier. Dårligst ut av de sju metodene var antall spirer etter 10 dager i PEG løsning. (tabell 6).

I rødkløver ble de høyeste verdiene for alle de tre testkriteriene kalkulert for spireevne etter forsert aldring i 24 t ved 45°C / 24 t (tabell (8))

Tabell 6. Sammenlikning av mest lovende livskrafttestene i timotei i henhold til tre ulike statistiske testkriterier (høyere tall indikerer bedre atskillelse).

Test-kriterium	Spire-indeks	Spire-indeks (3+5 dg)	PEG-test -0,60 MPa (7 dg)	PEG-test -0,60 MPa (10 dg)	AA-test 45°C i 56 t (7 dg)	AA-test 45°C i 56 t (10 dg)
1	23.4	24.4	21.1	14.7	15.9	17.4
2	12.2	12.7	11.2	7.8	8.7	9.4
3	219.6	238.7	177.4	86.0	101.4	121.6

Tabell 7. Sammenlikning av mest lovende livskrafttestene i rødkløver i henhold til tre ulike statistiske testkriterier (høyere tall indikerer bedre atskillelse).

Test-kriterium	Spire-indeks	PEG-test -0,15 MPa (7 dg)	PEG-test -0,15 MPa (10 dg)	AA-test 43°C i 24 t (5 dg)	AA-test 43°C i 24 t (10 dg)	AA-test 43°C i 32 t (10 dg)	AA-test 43°C i 48 t (10 dg)	AA-test 45°C i 24 t (10 dg)
1	7.6	14.3	10.6	13.1	17.9	13.8	14.9	27.0
2	3.3	7.0	5.7	7.2	9.9	7.4	8.1	12.9
3	23.1	71.7	44.6	68.2	128.0	76.1	89.1	225.3

3.5 Vurdering av de ulike testene - Anbefaling til Kimen

3.5.1 Timotei

I timotei var det flere av testene som godt klarte å skille de ulike referansepartiene fra hverandre. Best ut kom spireindekstesten (tabell 1). Denne testen, som klarte å skille alle de seks referansepartiene fra hverandre, er imidlertid arbeidskrevende fordi den må følges opp med tellinger hver dag. I praksis vil en forenkla spireindeks, hvor det telles opp spirer etter 3 og 5 dager, være mer anvendelig og gi tilstrekkelig informasjon for å skille "gode" og "dårlige" frøpartier fra hverandre med hensyn på spirekraft/lagringsevne. I henhold til testkriteriene kom faktisk denne forenkla testen bedre ut enn den fullstendige testen (tabell 6). En positiv faktor med den forenkla spireindekstesten er at den tar kort tid (5 dager) å utføre. Mer negativt kan det være at opptellinga av nye spirer ved sammenlikning av flere partier må (bør) gjøres av samme person slik at kriteriet for oppspiring (2 mm) konsekvent blir overholdt. Særlig ved telling etter 3 dager er det dessuten viktig at utlegging og telling blir gjort til samme tid på dagen, slik at det i størst mulig grad går 72 timer fra utlegging til telling. Et rimelig intervall synes å være 70-74 timer.

Også PEG-testen skilte referansepartiene brukbart fra hverandre (tabell 2), men den beste metoden (-0,60 MPa) kom likevel ikke så bra ut sammenlignet med de andre metodene iht. testkriteriene (tabell 7). Testen er arbeidskrevende, både fordi det må lages PEG-løsning og fordi skålene må innpakkes i lufttett folie som luftes med jevne mellomrom. I praksis anbefales derfor ikke denne testen.

I den forserte aldringstesten var det behandling av frøet ved 45 °C i 56 timer (dvs. 2 døgn og 8 timer) som best klarte å skille de ulike referansepartiene fra hverandre. Også sammenlignet med de andre testene kom denne metoden relativt bra ut (tabell 6). Både ved opptelling etter 7 og 10 dager klarte testen å skille fem av de seks partiene fra hverandre (tabell 4), men en slik forsert aldringstest krever imidlertid mer utstyr, tid og arbeid, og statistisk sett gir den heller ingen klare fordeler sammenlikna med forenkla spireindeks i timotei. I henhold til testkriteriene var sorteringen best når utvelgelsen var basert på opptelling etter 10 dager (tabell 6).

Ut fra en samlet vurdering anbefales det å bruke den forenkla spireindekstesten med opptelling av nye spirer (>2 mm) etter 3 og 5 dager for å skille ”gode” og ”dårlige” timoteipartier fra hverandre med hensyn på spirekraft/lagringsevne. Alternativt vil den forserte aldringstesten, hvor frøet blir behandlet i 45 °C i 56 timer før spireanalyse (opptelling av spirer etter 7 og 10 dager) være en god og sikker metode som lett lar seg gjennomføre i praksis på laboratoriet.

3.5.2 Rødkløver

I timotei klarte spireindekstesten kun å skille tre av de seks ulike referansepartiene fra hverandre (tabell 1). Spireindekstesten skåret også lavest iht. testkriteriene (tabell 7). Det dårlige resultatet gjør denne testen lite aktuell i rødkløver.

PEG-testen kom bedre ut, og klarte å skille fem av de seks partiene når PEG-konsentrasjonen var -0,15 MPa (tabell 3). Som for timotei (se 3.5.1) er imidlertid denne metoden arbeidskrevende og litt ”plundrete” i praksis, og anbefales av den grunn ikke. PEG-testen nådde heller ikke helt opp iht. testkriteriene (tabell 7).

I den forserte aldringstesten var det flere behandlinger som skilte bra mellom de ulike referansepartiene. Også i utenlandske forsøk har forsert aldring blitt brukt med godt resultat for å skille rødkløverpartier med noenlunde lik spireprosent. I disse forsøkene ble det imidlertid kun prøvd ut behandling ved 40 °C i 24 og 48 timer (Wang & Hampton 1989).

Når det fuktige rødkløverfrøet ble varmet i 24 timer ved 43 °C viste den påfølgende spireanalysen at fem av de seks referansepartiene kunne skilles fra hverandre både med hensyn til spirehastighet (5 dager) og endelig spireprosent (10 dager) (tabell 5). Det var også tilsvarende god adskillelse med hensyn på spireevne (fem av seks partier) etter 32 og 48 timer ved 43 °C, samt etter 24 t ved 45 °C. Når de ulike metodene ble satt opp mot hverandre, iht. testkriteriene (tabell 7), var det sorteringen med hensyn på spireevne etter forsert aldring i 24 timer ved 45 °C som kom best ut.

Ut fra dette vil den forserte aldringstesten med oppvarming av fuktig rødkløverfrø i 24 timer ved 45 °C være den mest egna behandlingen for å skille ”gode” og ”dårlige” frøpartier av rødkløver.

4. Etterord

Takk til seniorforsker Kristian Kristensen, Aarhus Universitet, for hjelp med de statistiske analysene, og til personalet ved Bioforsk Øst Landvik for nøyaktig utført forsøksarbeid. Arbeidet med spirekrafttestene ble finansiert med økonomisk støtte fra Norges forskningsråd gjennom det brukerstyrte prosjektet '173870- SAFE-SEED: Safe supply of climatically adapted forage seed through reduced storage losses'.

5. Referanser

- Abdalla, F.H, & E. H. Roberts. 1968. Effects of temperature, moisture and oxygen on induction of chromosome damage in seeds of barley, broad beans and peas during storage. *Annals of Botany* 32: 119-136.
- Delouche, J.C & Baskin, C.C. 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science & Technology* 1: 427-452.
- Harrington, J.F. 1972. Seed storage and longevity. I: Kozlowski, T.T. (red). *Seed Biology*. Academic Press, New York. S.145-246.
- Kristensen, Kristian. 2007. Personlig meddelelse
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2: 176-177.
- Michel, B.E. and M.R. Kaufmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.* 51:914-916.
- Roberts, E. H. 1986. Quantifying seed deterioration. In *Physiology of seed deterioration*. Eds: MacDonald, M.B & C.J. Nelson. *Crop Science Society of America*. s. 101-123.
- SAS Institute. 1990. *SAS/STAT User's Guide*. Version 6. Fourth edition. 890 s.
- Wang, Y.R. & J.G. Hampton. 1989. Red clover (*Trifolium pratense* L.) seed quality. *Proceedings Agronom Society NZ* 19: 63-69.