

Bestämning av knoppphärdighet på gran med elektrolytisk konduktivitet och NIR-spektroskopi

Johan Westin



Omslag: Ann Salomonsson och Johan Westin i labbet i Sävar. Foto: Jörgen Hajek.

Ämnesord: Gran, hårdighet, knoppar, NIR, *Picea abies*.

SkogForsk – Stiftelsen Skogsbrukets Forskningsinstitut

SkogForsk arbetar för ett långsiktigt, lönsamt skogsbruk på ekologisk grund. Bakom SkogForsk står skogsbolag, skogsägareföreningar, stift, gods, allmänningar, plant-skolor, SkogsMaskinFöretagarna m.fl., som betalar årliga intressentbidrag. Hela skogsbruket bidrar dessutom till finansieringen genom en avgift på virke som avverkas i Sverige. Verksamheten finansieras vidare av staten enligt särskilt avtal och av fonder som ger projektbundet stöd.

SkogForsk arbetar med forskning och utveckling med fokus på tre centrala frågeställningar: Skogsodlingsmaterial, Skogsskötsel samt Råvaruutnyttjande och produktionseffektivitet. På de områden där SkogForsk har särskild kompetens utförs även i stor omfattning uppdrag åt skogsföretag, maskintillverkare och myndigheter.

Serien **Arbetsrapport** dokumenterar långliggande försök samt inventeringar, studier m.m. och distribueras enbart efter särskild beställning.

Forsknings- och försöksresultat från SkogForsk publiceras i följande serier:

SkogForsk-Nytt: Nyheter, sammanfattningar, översikter.

Resultat: Slutsatser och rekommendationer i lättillgänglig form.

Redogörelse: Utförlig redovisning av genomfört forskningsarbete.

Report: Vetenskapligt inriktad serie (på engelska).

Handledningar: Anvisningar för hur olika arbeten lämpligen utförs.

ISSN 1404-305X

Förord

Det är många SkogForskare som har hjälpt till för att genomföra studien men speciellt vill jag tacka Programledare, Dr. och Dodge-ägare Lars-Göran Sundblad på SkogForsk i Umeå. Utanför SkogForsk ett speciellt tack till Ann Salomonsson på ANNOVA som har utfört knoppinsamlingar, NIR-mätningar och frystester. Ann har också bidragit med många konstruktiva synpunkter under projektets genomförande inklusive dataanalys och resultat sammanställning. Stort tack också till Föreningen Skogsträdsförädling som genom ekonomiskt stöd gjort studien möjlig att genomföra.

Umeå i april 2002

Johan Westin

Innehåll

Sammanfattning.....	3
Inledning.....	4
Syfte.....	5
Material och metoder.....	5
Resultat	7
Knopphärdighet.....	7
NIR-spektroskopi och multivariat analys.....	8
Enbart NIR-spektra från Skogforsk (SF) week 1, 2 och 3).....	11
Enbart NIR-spektra från Organisk kemi (OC) week 4 och 5.....	12
Mitotisk Index	15
Diskussion	15
Referenser.....	17

Sammanfattning

Projektet avsåg att utveckla metoder för bestämning av enskilda knoppars hårdighet. Ett syfte var att bestämma relativ hårdighet för enskilda granknoppar och undersöka hur hårdigheten förändras under hösten. Ett annat syfte var att undersöka om det finns information i NIR-spektra som skiljer hårdiga och icke-hårdiga granknoppar åt.

Undersökningen genomfördes hösten år 2001 i ett fältförsök med gran i Sävar, i vilket tio trädindivider med fem olika latitudursprung valdes. Vid fem tillfällen klipptes laterala skott från de översta grenvarven på varje individ. Totalt insamlades 504 knoppar från de tio individerna. Efter varje insamling togs först ett NIR-reflektionsspektra i våglängdsintervallet 400–2 500 nm för varje knopp. På grund av tekniska problem användes två NIR-utrustningar av olika märken, SkogForsks (SF) vid de första tre insamlingarna och Organisk kemis (OC) vid de sista två. En relativ hårdighetsbestämning gjordes av samma knoppar genom artificiell frystestning till fem olika temperaturer (mellan -5°C och -40°C) och därefter bestämning av skadeindex. Skadeindexet uttrycker relationen mellan relativa konduktivitet för den artificiellt frusna knoppen och relativa konduktivitet för kontrollknoppar (som hållits i 0°C) från samma individ.

Knopphårdighetsprocessen och sambandet mellan knoppspektra och knopp-hårdighet (skadeindex) analyserades med multivariata metoder (PLS/PCA). Vid analys av knoppspektra användes relativa reflektionsspektra i våglängdsområdet 400–2 500 nm, uppdelat i 1 050 klasser. Analysen av knoppspektra gjordes dels på hela materialet, d.v.s. med alla spektra från båda NIR-utrustningarna, dels på NIR-data från varje utrustning för sig.

Knopphårdighetsresultaten över hela frysserien visade på stora skillnader mellan de olika frystemperaturerna och när under hösten frysningen gjordes. Enbart en låg frystemperatur t.ex. -25°C hade troligtvis gett tydligare effekter av individtillhörighet. Det förefaller möjligt att bestämma den relativa hårdigheten för enskilda granknoppar med metoden och att på individnivå följa hur knopphårdigheten förändras under hösten. Resultaten visar också att knopp-härtningsförloppet i det här materialet kan hänföras till en relativt kort period, ca en månad, med tyngdpunkt i oktober månad.

NIR-studien antyder att skillnaderna i NIR-spektra verkligen har med knopparnas hårdighet att göra eftersom nordliga individer tidigt på hösten avviker från sydligare individer och omvänt sent på hösten. Den information i NIR-spektra som har med knopphårdighet att göra verkar finnas i våglängdsområdet 1 100–2 500 nm och låga frystemperaturer förbättrar sambandet mellan knopp-hårdighet och NIR-spektra. NIR-spektrat från de båda NIR-utrustningarna var väldigt olika och skillnaderna i NIR-spektra som hade med utrustning att göra var svår att korrigera för. NIR-spektroskopi i kombination med multivariat analys har en potential att bli en snabb och icke-destruktiv metod för att bestämma knopphårdighet, men beroendet av en specifik utrustning förefaller vara metodens svaghet i dagsläget.

Inledning

Ett av förädlingsmålen inom den nordsvenska granförädlingen är optimal klimatanpassning ur produktions- och skadesynpunkt. Optimal klimatanpassning innebär bl. a. att tillväxten avslutas vid en tidpunkt så att produktionen maximeras och skadorna minimeras. Urval av enskilda trädindivider kan innebära att individer med sen tillväxtavslutning, d.v.s. att celldelningen upphör sent, blir överrepresenterade i det selekterade materialet (Westin et al., 2000). Sen tillväxtavslutning innebär på gran en ökad risk för klimatrelaterade skador och produktionsbortfall på grund av en ökad frekvens knoppskador. Det här projektet avser att utveckla metoder för bestämning av enskilda knoppars hårdighet för att reducera skaderisken.

Inom förädlingsverksamheten testas individernas avkommor med genetiska tester inom det tänkta användningsområdet för att bl.a. minska risken för selektion av individer som härdar sent. Eftersom fältförsök är kostsamma kan ett mer resurseffektivt sätt vara att undvika att fälttesta individer som inte är hårdiga vid ett för området specifikt datum på hösten. För detta krävs metoder som klarar av att identifiera knopphårdigheten på icke-juvenila trädindivider. En metod för detta ska vara snabb och icke-destruktiv. Relativ hårdighet kan bestämmas med elektrolytisk konduktivitet i kombination med artificiell frystestning. Det är en metod som fungerar väl på såväl barr, rötter och knoppar, men metoden behöver anpassas för hårdighetsbestämning av enskilda knoppar. För att uppfylla kravet på snabbhet och icke-destruktivitet kan en NIR-tillämpning ha en stor potential. Det här projektet avser att utveckla metoder för hårdighetsbestämning av enskilda knoppar.

Genetiska tester av individavkommor inom det tänkta användningsområdet utesluter inte att individer med sen tillväxtavslutning blir överrepresenterade. Detta beror på att försökslokalen kan påverka urvalet genom att sambandet mellan tidpunkten för tillväxtavslutning (när celldelningen upphör) och skotttillväxtens längd (produktion) beror av både genetik och miljö. För individer med en genetiskt sen tillväxtavslutning kan det relativa bidraget av barranlag bildade under sensommaren vara betydande även om de till största delen bildas under högsommaren. Detta innebär att några veckors senare tillväxtavslutning för sådana individer kan resultera i relativt sett mer skotttillväxt i gynnsamma miljöer än i mindre gynnsamma miljöer.

Tydliga förädlingsmål är viktiga för en effektiv förädling. Genom att hålla isär skillnader i höjdtillväxt som har sin grund i skillnader i tillväxtperiodens längd från skillnader i tillväxtförmåga blir förädlingsmålet "ökad tillväxt" tydligare. Med kunskap om individernas knopphårdighet kan försöken etableras i för egenskapen "tillväxt" gynnsamma miljöer med reducerad risk för att individer med sen tillväxtavslutning blir överrepresenterade i det selekterade materialet. För att i framtiden göra egenskapen "tillväxt" ändå mer distinkt, kan utvärdering av tillväxtkomponenter (t.ex. barrantal på skotten) på unga individer i stället för höjdmätning i fältförsök vara ett alternativ. Långsiktiga fältförsök kan i stället inriktas på att utvärdera andra egenskaper som är betydelsefulla för optimal anpassning och virkeskvalitet.

Syfte

Att bestämma relativ hårdighet för enskilda granknoppar och undersöka hur hårdigheten förändras under hösten.

Att undersöka om det finns information i NIR-spektra som skiljer hårdiga och icke-hårdiga granknoppar åt.

Material och metoder

Undersökningen genomfördes i ett fältförsök (S23F8620459) med gran planterat år 1986 i Sävar (63,9°N). I försöket valdes hösten år 2001 tio trädindivider med fem olika latitudursprung; 58°N (individerna E581, E582), 60°N (individerna E601, E602), 62°N (individerna E621, E622), 64°N (individerna E641, E642) och 66°N (individerna E661, E662). Vid urvalet var kravet, förutom lämpliga latitudursprung, att det skulle finnas ett tillräckligt antal lämpliga skott på varje individ och att individen skulle ha ingått i en tidigare studie av celldelningsaktivitet (Westin et al. 2000). Vid fem tillfällen under hösten klipptes ca 10 laterala skott med tydliga knoppar från de 3–5 översta grenvarven på varje individ. Efter varje insamling genomfördes först NIR-spektroskopi på enskilda knoppar, därefter relativ hårdighetsbestämning av samma knoppar genom artificiell frystestning. Undersökningen genomfördes veckorna 37 (12/9), 39 (26/9), 41 (10/10), 44 (31/10) och 46 (14/11).

Vid varje insamlingstillfälle registrerades i lab.-miljö ett VIS/NIR-reflektionspektra per knopp i våglängdsintervallet 350(400)–2 500 nm (fortsättningsvis kallad NIR-spektra). Vid registreringen av spektra fördes toppknoppen upp genom ett cirkulärt hål i en svartmålad metallplatta. Valet av hål anpassades så att enbart knoppen och så lite som möjligt av det övriga skottet var synligt på ovan sidan av metallplattan. NIR-proben applicerades direkt mot knoppens ena sida så att ett spektrum kunde tas i ungefär 45° vinkel i förhållande till skottets längdaxel. På grund av tekniska problem med befintlig NIR-utrustning på SkogForsk (LabSpec Unit 4013, Analytical Spectral Devices Inc, CO, USA) användes under de två sista tillfällena en annan NIR-utrustning (Foss NIR-SYSTEMS 6500, Organisk kemi, Umeå Universitet). Det gavs ingen möjlighet att kalibrera utrustningarna och dessutom var det nödvändigt att använda två olika prober. Detta innebar att proben på organisk kemi (OC) var mycket större än den som fanns på SkogForsk (SF).

Knopphårdigheten bestämdes med ett skadeindex (Index of Injury, Flint et al, 1967). För varje knopp relaterades läckaget av joner (Konduktometer CG855, elektrod LF1100T, Schott Geräte GmbH) efter artificiell frystestning till det totala läckaget av joner från samma knopp efter kokning (relativ konduktivitet (Relative Conductivity, RC)). Som kontroll användes motsvarande relation i jonläckage hos ofrusna knoppar. Skadeindexet uttrycker därmed relationen mellan RC för den artificiellt frusna knoppen och RC för kontrollknoppar från samma individ.

Frysningen av de insamlade skotten utfördes i mörker till fem olika temperaturer ; -5°C, -10°C, -17°C, -25°C, -40°C. Nedfrysnings- och upptiningshastighet var 5°C/h och minimitemperaturen hölls i två timmar. Efter avslutat frysprogram preparerades knopparna för konduktivitetmätningar genom att skära loss toppknoppen från skottet vid det ställe på utsidan av knoppen där de

synliga barren på knoppens nederkant upphörde och knoppsfjällen började. Varje enskild knopp placerades därefter i ett provrör med 10 ml destillerat vatten och sattes på skakbord i inkubator (5°C). Första konduktivitmätningen (skadevärde) gjordes efter 3 dagar på skakning. Därefter kokades provrören i 60 min, kylades ned och sattes åter på skakning. Andra konduktivitmätningen (dödvärde) gjordes efter ytterligare 2 dagar på skakbord. Kontrollknopparna (3 stycken per individ och vecka, totalt 150 stycken) utsattes för samma behandling som övriga knoppar men i stället för frysning hölls de i 0°C. Totalt insamlades 504 knoppar från de 10 individerna (ca 50 knoppar per individ).

En reducerad faktoriell försöksdesign av ”screening”-typ utan interaktioner användes för att analysera knopphärdighetsprocessen (Modde 6.0, Umetrics AB). För att vid dataanalysen få en överblick över förhållandet mellan responsvariabler och hur alla faktorer påverkar responsvariablerna användes en PLS modell (Partial Least Squares). Vid analysen definierades individ (”Entry”, d.v.s. de 10 granindividerna), frystemperatur (Temp) och insamlingsvecka (Week) som faktorer (X-variabler) medan skadeindex (Index) och RC användes som responsvariabler (Y-variabler). Totalt 504 observationer varav 150 var kontroller (T-0).

Sambandet mellan knoppspektra och knopphärdighet undersöktes med multivariat dataanalys (Simca 7.01 Umetri AB). Vid analysen användes analys av principalkomponenter (PCA) och PLS modellering. En X-matris definierades bestående av relativa reflektionsspektra i våglängdsområdet 400–2 500 nm. Varje observation bestod av 1 050 observationer med en våglängdsbredd på 2 nm/klass (Ctr-scale). En Y variabel definierades bestående av Index (Skadeindex, %, UV-scale). Totalt gjordes 503 observationer varav 204 + 90 kontroller från 3 insamlingsveckor med SkogForsks NIR-utrustning (SF) och 149 + 60 kontroller från 2 insamlingsveckor med NIR-utrustningen från Organisk Kemi (OC). PCA av X-matrisen gjordes för att finna outliers och för att analysera data. PLS-analyser användes för att undersöka förhållandet mellan Y-variabler (RC och skadeindex) och X-matrisen (våglängdsvariablerna).

Vid den samlade analysen av hela materialet, d.v.s. med alla spektra från båda NIR-utrustningarna användes ortogonal signalkorrektion (Orthogonal Signal Correction, OSC). Motivet var att försöka ta bort så mycket som möjligt av den information som var relaterad till vilken typ av NIR-utrustning som användes, och inte till Y-variabeln i sig. OSC är en PLS modell där all information tas bort från X-blocket som är ortogonal till Y och resultatet visas som PLS-plottar, t.ex. scores, loading. OSC tar genom signal korrigering bort systematisk variation från X-blocket medan Y-blocket (Index) har kvar sin ursprungliga enhet (%). På motsvarande sätt användes också ortogonal signalkorrektion för en samlad bearbetning av NIR-spektra från knoppar frysta till –27 och –40°C.

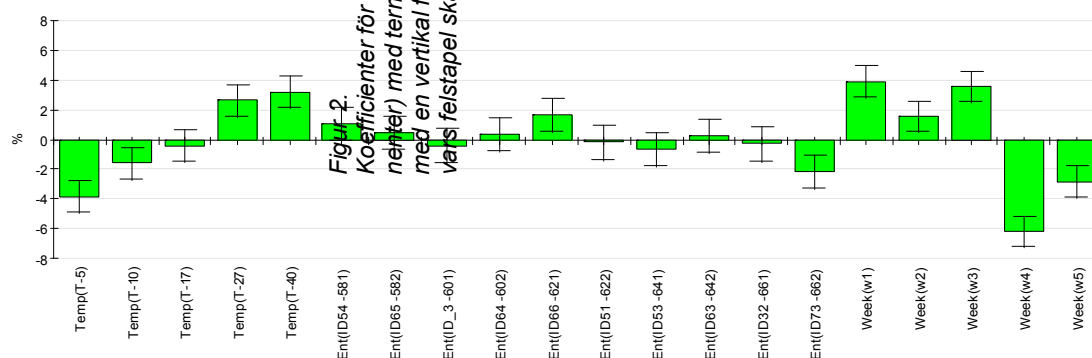
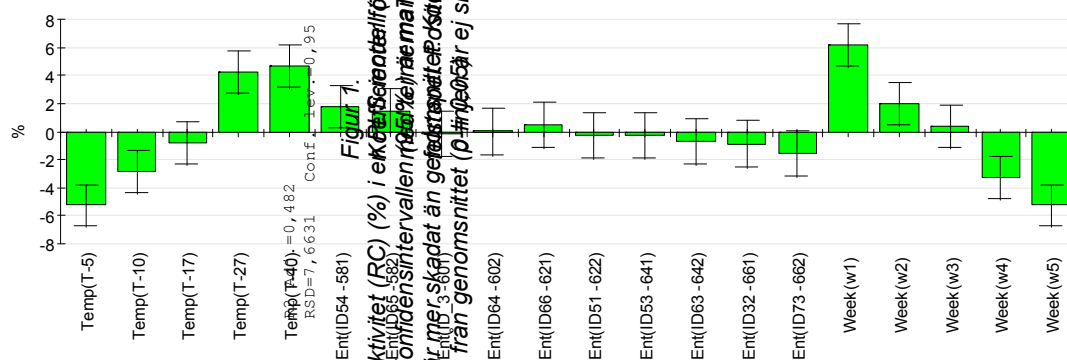
Vid analysen av NIR-data från varje utrustning för sig, d.v.s. SF resp. OC, användes Multiplicative Signal Correction (MSC) av spektrala värden. MSC är ett sätt att normalisera data och baseras på empiriska data där regressionen av spektrala värden (från närbesläktade prov) mot det spektrala medelvärde är approximativt linjärt.

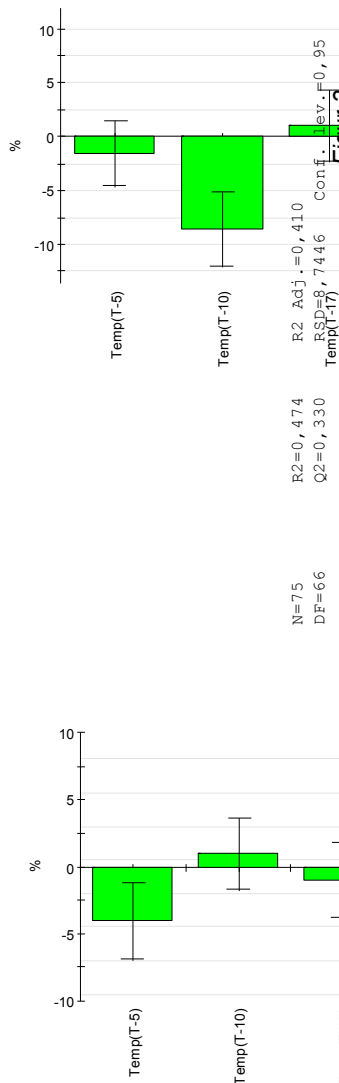
I en tidigare studie av celldelningsaktivitet i knoppar bestämdes ett mitotiskt index (MI) baserat på metoder utvecklade av Grob & Owens (1994); Sundblad et al. (1998). En mer fullständig beskrivning av det här använt material och metod finns redovisad i Westin et al. (2000).

Resultat

Knopphärdighet

Resultat från analysen av knopphårdighet med PLS-modellen för responsvariablerna Index respektive R_{max} visas i figur 1 och 2. De omskalade och centrerade koefficienterna i figurerna är normaliserade med hänsyn till variationen i Y, d.v.s. de är delade med standardavvikelsen i Y. Rättvisa jämförelser av knopphårdighet mellan enskilda knoppar vid enskilda temperaturer eller tidpunkter är svåra att göra. Detta eftersom de olika individerna vid ett visst frystillfälle inte behöver ha samma innehåll i antalet frystestade knoppar i de olika frystemperaturerna. En jämförelse om skillnader mellan sydligt och nordligt material kan fås genom att jämföra de två sydligaste (E581 och E582) (figur 3) och de två nordligaste (E661 och E662) (figur 4).





Figur 4. Koefficienter för de två nordligaste individerna (E661 och E662). Responssvaret i en PLS-modell (4 komponenter) i en PLS-modell (4 komponenter) med termerna Temp och Week. Varje komponent är markerad med en vertikal färg. Positiva värden är gröna, negativa värden är blåa. Koefficienter vars felstapel skär 0-linjen är ej signifikant (p > 0.05).

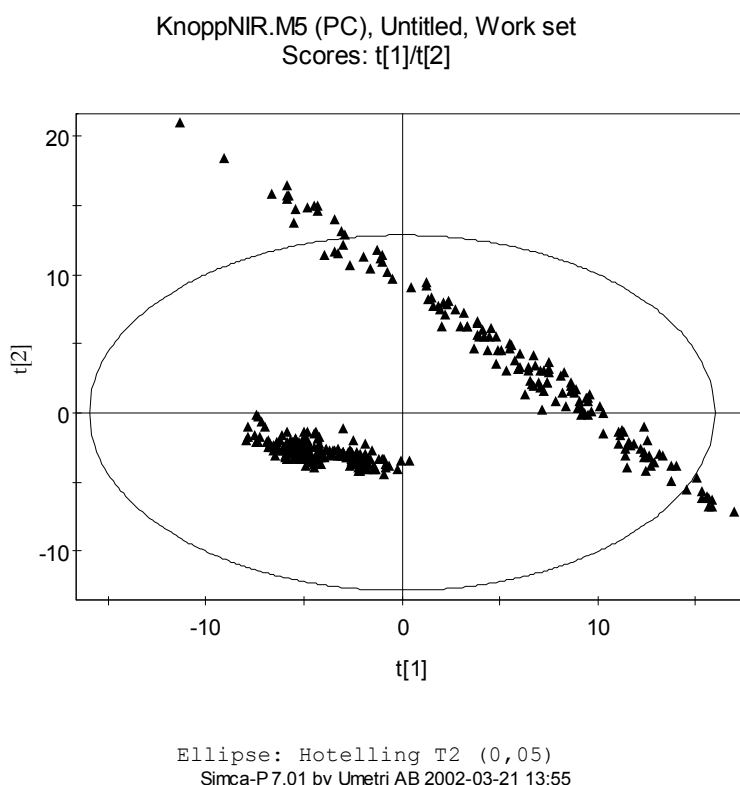
NIR-spektroskopi och multivariat analys

Hela materialet

Spektra från de två NIR-utrustningar uppvisade helt olika fördelning (figur 5). Som en konsekvens av de stora observerade skillnaderna mellan utrustningarna gjordes en signalkorrektion (OSC) av spektra för att analysera resultaten från både week 1–3 och 4–5 tillsammans. Genom OSC-signalkorrektion av hela materialet (d.v.s. alla frystempuraturer och individer) kvarstod mycket av den information som var relaterad till vilken NIR-utrustning som används (data ej visat). Motsvarande signalkorrektion med ett reducerade materialet med enbart

knoppar frysta till -27 och -40°C (OSC-low, 141 obs.) gav en relativt sett högre förklaringsgrad (tabell 1).

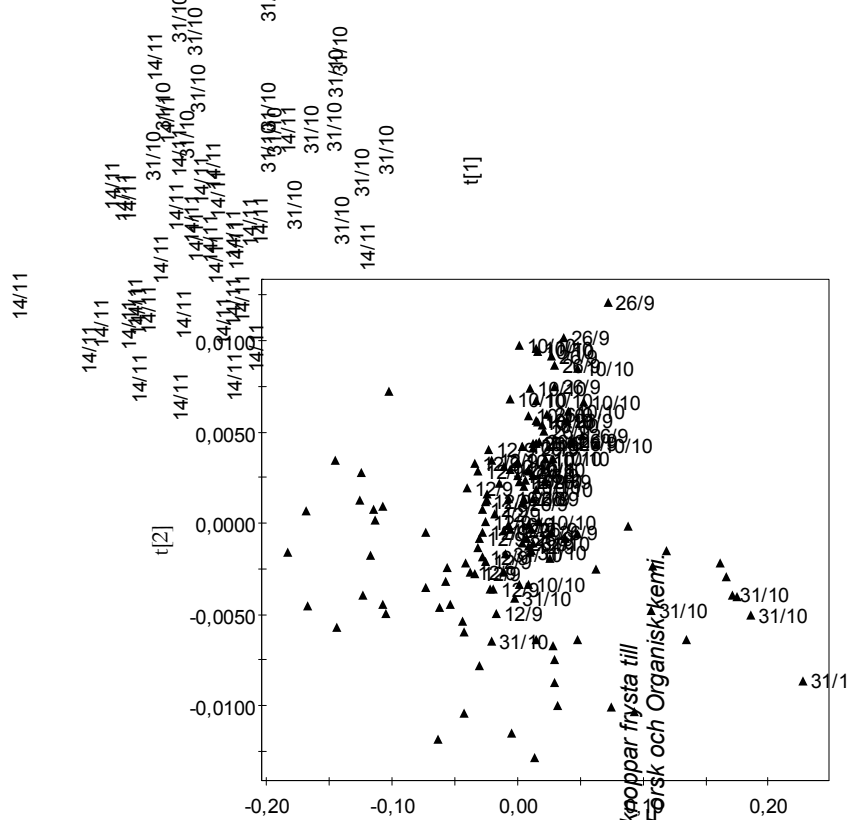
Med det reducerade materialet blev spridningen mindre mellan de två NIR-utrustningarna (figur 6). Flera värden från OC (d.v.s. 31/10 och 14/11) visar dock en avvikande fördelning. Prediktion av skadeindex baserat på det reducerade materialet visas i figur 7. Den fortsatta analysen av data gjordes genom att analysera utrustningarna var för sig, d.v.s. week 1–3 resp week 4–5.



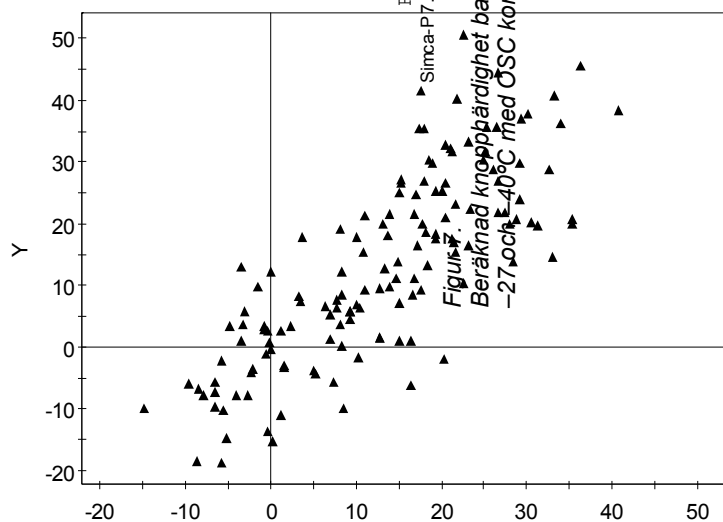
Figur 5.
Score-plot t1/t2. PCA analys på X-blocket med hela materialet utan signal korrektion. Den långa utsträckta övre svärmen av punkter representerar NIR spektra från Organisk kemi (OC) medan den mer samlade undre svärmen representerar SkogForsk (SF).

Tabell 1.
Resultatsammanställning för en PLS modell med signalkorrigerade (OSC) NIR-spektra $>1\ 100\ \text{nm}$ från både SkogForsk(SF) och Organisk kemi (OC). Enbart knoppar frusna till -27 och -40°C ($n = 141$).

Kom- ponent	R2X	R2X (cum)	Eig	R2Y	R2Y (cum)	Q2	Limit	Q2 (cum)	Sign	Iter
1	0,950	0,950	133,938	0,631	0,631	0,626	0,097	0,626	R1	1
2	0,039	0,989	5,489	0,003	0,634	-0,007	0,097	0,626	N4	1



Figur 6. Score-plot t_1/t_2 . PCA analys på X-blocket baserat på en kalibreringsmodell för knoppar frysta till -27 och -40°C med OC-korrigerade NIR data ($>1100\text{ nm}$) från både SkogForsk och Organisk kemi. Inmatningsdatum är angivet vid respektive punkt.



Enbart NIR-spektra från Skogforsk (SF) week 1, 2 och 3)

Flera olika modeller provades men här redovisas enbart resultat från två PLS-modeller. En modell med NIR spektra från hela materialet redovisas i tabell 2 och figur 8 samt en modell med spektra från enbart individer från 66°N (36 observationer) som redovisas i tabell 3 och figur 9.

Tabell 2.

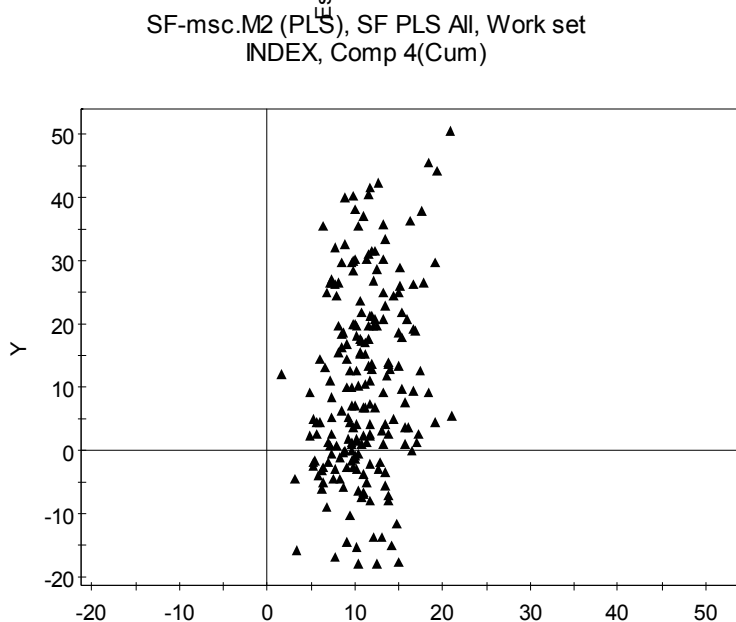
Resultatsammanställning för en PLS modell baserad på 204 observationer med 1 050 (MSC) NIR-spektra från SkogForsk(SF). Y = Skadeindex.

Komponent	R2X	R2X (cum)	Eig	R2Y	R2Y (cum)	Q2	Limit	Q2 (cum)	Sign	Iter
1	0,754	0,754	153,873	0,013	0,013	0,004	0,097	0,004	NS	1
2	0,087	0,841	17,693	0,018	0,031	-0,045	0,097	0,004	NS	1
3	0,096	0,937	19,594	0,014	0,046	-0,004	0,097	0,004	NS	1
4	0,021	0,958	4,334	0,010	0,056	-0,025	0,097	0,004	NS	1

Tabell 3.

Resultatsammanställning för en PLS modell baserad på 36 observationer med 700 (MSC) NIR-spektra från SkogForsk(SF). Enbart individer från 66N (E661 och E662) och våglängder större än 1 100 m. Y = Skadeindex.

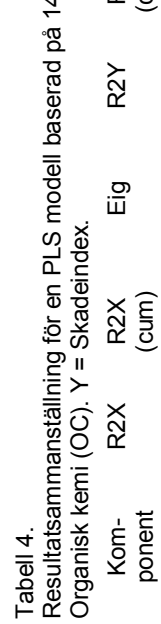
Komponent	R2X	R2X (cum)	Eig	R2Y	R2Y (cum)	Q2	Limit	Q2 (cum)	Sign	Iter
1	0,738	0,738	26,557	0,119	0,119	0,081	0,097	0,081	NS	1
2	0,107	0,845	3,859	0,128	0,247	0,101	0,097	0,174	R1	1
3	0,064	0,909	2,319	0,082	0,329	0,055	0,097	0,219	NS	1
4	0,066	0,976	2,385	0,040	0,369	0,021	0,097	0,235	NS	1
5	0,008	0,983	0,275	0,128	0,497	-0,030	0,097	0,235	NS	1
6	0,002	0,985	0,081	0,242	0,739	0,205	0,097	0,392	R1	1
7	0,003	0,989	0,123	0,037	0,777	-0,333	0,097	0,392	NS	1
8	0,001	0,990	0,034	0,108	0,885	-0,237	0,097	0,392	NS	1



RMSEE=14,5196
Simca-P 7.01 by Umetri AB 2002-04-18 14:07

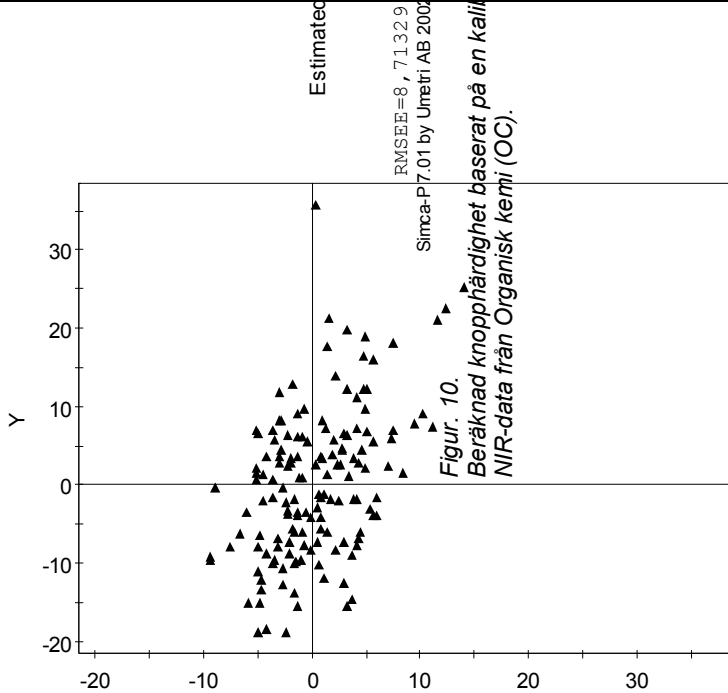
Figur 8.

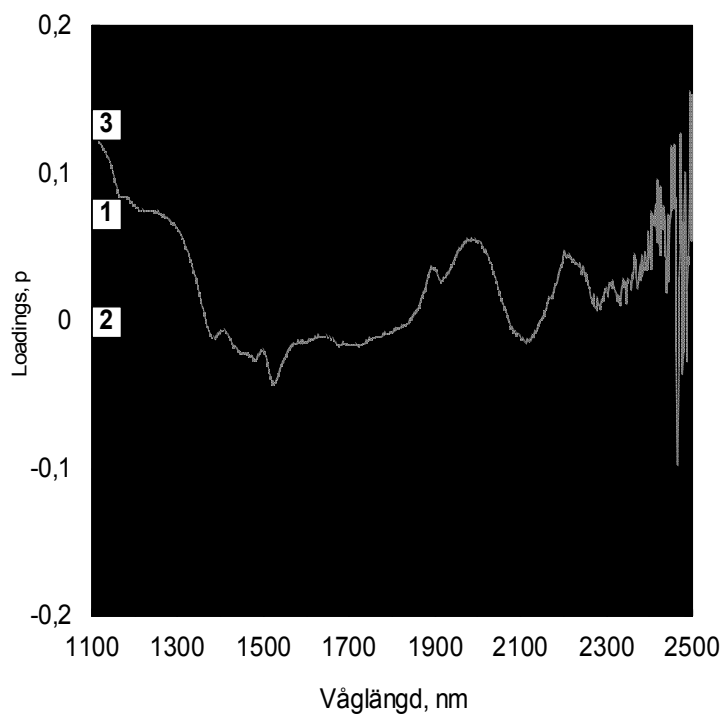
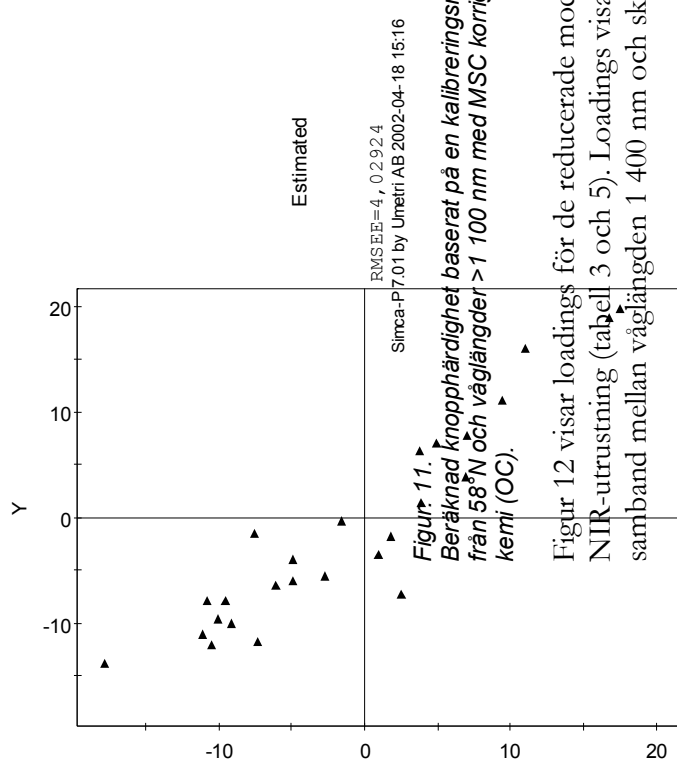
Beräknad knopphärdighet baserat på en kalibreringsmodell med samtliga MSC korrigerade NIR-data från SkogForsk (SF).



Tabell 5.
Resultatsammanställning för en PLS modell baserat på 26 observationer med 700 (MSC) NIR-spektra från SkogForsk(SF). Enbart individer från 58N (E58S) och E582) och våglängder större än 1 100 nm.
Y = Skadeindex.

Kom- ponent	R2X	R2X (cum)	Eig	R2Y	R2Y (cum)	Q2	Limit	Q2 (cum)	Sign	Iter
1	0,420	0,420	10,911	0,103	0,103	-0,093	0,097	0,000	NS	1
2	0,348	0,768	9,060	0,106	0,209	0,030	0,097	0,030	NS	1
3	0,082	0,850	2,138	0,210	0,420	0,131	0,097	0,157	R1	1
4	0,030	0,881	0,788	0,196	0,616	0,034	0,097	0,185	NS	1
5	0,012	0,892	0,304	0,161	0,777	-0,678	0,097	0,185	NS	1
6	0,031	0,924	0,819	0,061	0,838	0,004	0,097	0,189	NS	1
7	0,027	0,950	0,693	0,038	0,877	0,053	0,097	0,231	NS	1





Figur 12.
Loading vikter för X-blocket (>1 100 nm) i tre av de redovisade modellerna där NIR-spektra användes för att beräkna knopphårdigheten; 1. OSC spektra från SF och OC för knoppar frusna till -27°C och -40°C (komp. 1), 2. MSC spektra från SF, enbart individer från 66°N (komp. 6), 3. MSC spektra från OC, enbart individer från 58°N (komp. 3).

Mitotisk Index

MI data från den tidigare studien av celldelningsaktivitet i knoppar fanns för fem av de tio individerna. (E601, E602, E641, E642 och E662). För tre av de fem individerna fanns inga MI-data senare än dagnummer 255 (11/9), 266 (22/9) och dag 281 (7/10) (data ej visat).

Diskussion

Knopphärdighetsresultaten över hela frysserien visade som förväntat på stora skillnader mellan de olika frystemperaturerna och när under hösten frysningen görs (figur 1). Individerna rangordnade sig som förväntat med den högsta skadenivån, d.v.s. den lägsta knopphärdigheten hos de sydliga individerna och i stort sett allt lägre skadenivå ju nordligare ursprung. Koefficienterna för de olika individerna är dock små i förhållande till koefficienterna för de olika frystemperaturerna och vid vilken vecka frysningen utförts. Antagligen hade det varit lättare att separera de olika individerna åt om en lägre frystemperatur använts. Genom att använda enbart en låg frystemperatur t.ex. -25°C , skulle troligtvis tydligare effekter av individtillhörighet observerats.

Motsvarande sammanställning med variabeln RC visar inte på lika tydliga trender vad gäller när frysningar görs och individtillhörighet (figur 2). Resultaten antyder individskillnader i RC och att resultaten stabiliseras genom att använda ett index. En anledning till att använda ett skadeindex är att särskilja frysskador orsakade av artificiell frystestning från existerande skador orsakade av naturliga froster. Ytterligare en anledning är att ta bort individskillnader i jonläckage över tiden. Redan genom att använda RC reduceras skillnader i jonläckage som har sin grund i skillnader mellan individer i knoppstorlek. Däremot kan individskillnader i RC erhållas på grund av att individerna uppvisar olika läckage över tiden. Detta kan tolkas som en skillnad i härdighet om enbart RC används, med ett skadeindex används reduceras den risken. Tänkbara orsaker som kan ge upphov till olikheter i läckage över tiden kan vara skillnader i knoppform, snittytor, mängden lätttrörliga joner i knoppen.

Flera observerade skadeindex var negativa även om de flesta indexvärden var positiva (se y-värden t.ex. i figurerna 6, 8, 10). Ett skadeindex utesluter inte negativa värden. En tänkbar förklaring till negativa värden, när hela skott fryses, kan vara att vatten med lösta joner under frysprocessen aktivt transporteras ut från knoppen till en plats nedanför kronan (Sakai & Larcher, 1987; Hejnowicz & Obarska, 1995). När sedan knoppen skärs loss från skottet är jonläckaget efter frysning mindre än hos den ofrusna kontrollen.

De sammanställda resultaten med knopphärdighet visade att de två sydligaste individerna var mer skadade än de två nordligaste. Resultaten för de nordligaste i förhållande till de sydligaste individerna, d.v.s. ursprung mellan $58-66^{\circ}\text{N}$, visar att de flesta knoppar insamlade i början av september (week1, 12/9) inte var härdiga (figur 3 och 4). Däremot förefaller knoppar från samma individer vid mitten av november (week 5, 14/11) vara härdiga. Resultaten visar att med det använda materialet kan knopphärdningsförloppet hänföras till en relativt kort period, ca en månad, och med tyngdpunkt i oktober månad.

Signalkorrektion av NIR-spektra var nödvändig då spektrat från NIR-utrustningarna var väldigt olika (figur 5) men enbart OSC-kalibrering var inte tillräcklig för att kunna förklara variationen i knopphärdighet med NIR. Med

OSC för våglängder större än 1 100 nm och enbart de knoppar som frysts till låga temperaturer kunde en relativt stor andel av variationen i knopphårdighet förklaras (tabell 1, figur 6). Resultaten antyder att den information i NIR-spektra i det här materialet som har med knopphårdighet att göra finns våglängdsområdet 1 100–2 500 och att lägre frystemperaturer förbättrar sambandet knopphårdighet och NIR-spektra. En del observationer från OC avviker dock fortfarande från mönstret (figur 7), vilket kan bero på den använda NIR-utrustningen på OC eller den i förhållande till SF stora probe som användes på OC.

Datasetet från NIR-utrustningen på SkogForsk, SF visar att de observerade skillnaderna i knopphårdighet inte kan förklaras med NIR (tabell 2, figur 8). Detta är troligtvis ett resultat av de använda frystemperaturerna och individernas generellt sett låga hårdighetsnivå. Den stora spridningen i frystemperaturer, från -5°C ned till -40°C, resulterar i motsvarande spridning i observerad knopphårdighet. Spridningen har antagligen inget samband med knopparnas NIR-spektra att göra. Genom att enbart välja ut data från knoppar frusna till -5°C minskar spridningen i knopphårdighet och punktsvärmen i fig. 8. ligger närmare origo (data ej visat). Överlag är individernas hårdighetsnivå vid den här tiden på hösten låg (jämför figur 3 och 4). Genom att välja ut den nordligaste delen av materialet ökar förklaringsgraden avsevärt och förklaringen av knopphårdigheten med NIR-spektra förbättras (tabell 3, figur 9). Resultaten visar att de nordliga individernas NIR-spektra vid den här tidpunkten på hösten avviker från spektra från sydligare individer. Detta antyder också att skillnaderna i NIR-spektra verkligen har med knopparnas hårdighet att göra.

Datasetet från NIR-utrustningen på Organisk kemi, OC, visar på små observerade skillnader i knopphårdighet och motsvarande små skillnader i förklarad knopphårdighet med NIR (tabell 4, figur 10). Resultaten visar att de observerade skillnaderna i knopphårdighet inte kan förklaras med NIR. Detta är troligtvis ett resultat av individernas generellt sett höga hårdighetsnivå vid den här tiden på hösten (jämför figur 3 och 4). Genom att välja ut den sydligaste delen av materialet ökar förklaringsgraden avsevärt och förklaringen av knopphårdighet med NIR-spektra (Tab.5, Fig. 11) förbättras. Resultaten visar att de sydliga individernas NIR-spektra vid den här tiden på hösten avviker från spektra från nordligare individer. Detta antyder också att skillnaderna i NIR-spektra har med knopparnas hårdighet att göra.

Loading vikterna för X-blocken (1 100–2 500 nm) i tre redovisade modeller (figur 12) uppvisade som helhet inte på tydliga gemensamma drag. Loadings för spektra från SF med enbart individer från 66°N (linje 2) visar en tydlig negativ topp vid 1 400 nm. Våglängden 1 400 representerar integrerad information av vatten (Curran 1989). Motsvarande topp för våglängden 1 400 nm har noterats för prediktion av frosthårdighet hos både tall och gran (Sundblad et al. 2001). Det är möjligt att betydelsefull information för bestämning av knopphårdighet finns i våglängden. Det är troligt att knoppens vatteninnehåll är en betydelsefull faktor för knopphårdighet.

MI data från de studerade individerna var från tidpunkter alltför tidigt på hösten för att med ledning av när celldelningen avslutas bidra med information om knopphårdningen. Resultat från andra studier av MI antyder att provenienser från ca 66°N avslutar sin celldelning (MI = 0) vid ca den 1 oktober medan provenienser från ca 60°N avslutar sin celldelning vid ca den 1 november (Westin et al 2000, + opubl). Resultaten i den här studien visar att knopphär-

digheten utvecklas snabbt under främst oktober månad och att de nordliga individerna härdar före de sydliga. Det förefaller därför sannolikt att knopparnas hårdighet har att göra med hur länge celldelningen pågår i knoppen.

Spektra från de två NIR-utrustningar uppvisade helt olika fördelning (figur 5) och skillnaderna i NIR-spektra som hade med vilken utrustningarna var svår att korrigera för. Metoden förutsätter därför att en känd NIR-utrustning används för att bestämningen av knopphårdigheten med NIR-spektroskopi ska bli noggrann. Att resultaten är så beroende av vilken NIR-utrustning som används är inte bra och minskar metodens robusthet. Fortsatta undersökningar får utvisa om prediktion av knopphårdighet kan göras med hög precision, vilka våglängdsområden som innehåller mest information och om billigare, mer robust teknik kan användas för ändamålet.

Slutsatsen är att det är möjligt att bestämma den relativa hårdigheten för enskilda granknoppar från icke-juvenila individer med elektrolytisk konduktivitet och att på individnivå följa hur knopphårdigheten förändras under hösten. NIR-spektroskopi i kombination med multivariat analys har en potential att bli en snabb och icke-destruktiv metod för att bestämma knopphårdighet, men beroendet av en specifik utrustning förefaller vara metodens svaghet i dagsläget.

Referenser

- Curran, P.J. 1989. Remote sensing of foliar chemistry. *Remote Sens. Environ.* 30: 271–278.
- Grob, J. A. & Owens, J. N. 1994. Techniques to study the cell cycle in conifer shoot apical meristems. *Can. J. For. Res.* 24: 472–482
- Hejnowicz, A. & Obarska, E. 1995. Structure and development of vegetative buds, from the lower crown of *Picea abies*. *Ann. Sci. For.* 52 (5): 433–447.
- Sakai, A & Larcher, W. 1987. Frost survival of plants. *Ecological studies* 62. Springer-Verlag, ISBN 3-540-7332-3, pp. 321.
- Sundblad, L.-G., Andersson, M., Geladi, P., Salomonsson, A. & Sjöström, M. 2001. Fast, nondestructive measurement of frost hardness in conifer seedlings by VIS+NIR-spectroscopy. *Tree Physiol.* 21: 751–757.
- Westin, J., Sundblad, L.-G., Strand, M. & Hällgren, J.-E. 2000. Phenotypic differences between natural and selected populations of *Picea abies* II. Apical mitotic activity and growth related parameters. *Scand. J. For. Res.* 15: 500–509.