



## **Brytning av frövila hos *Lathyrus japonicus*, *Medicago sativa* och *Myrrhis odorata* med ultraljud och temperaturbehandling**

- En experimentell studie för optimering av genbanksbevarande

---

Elin Sebyhed

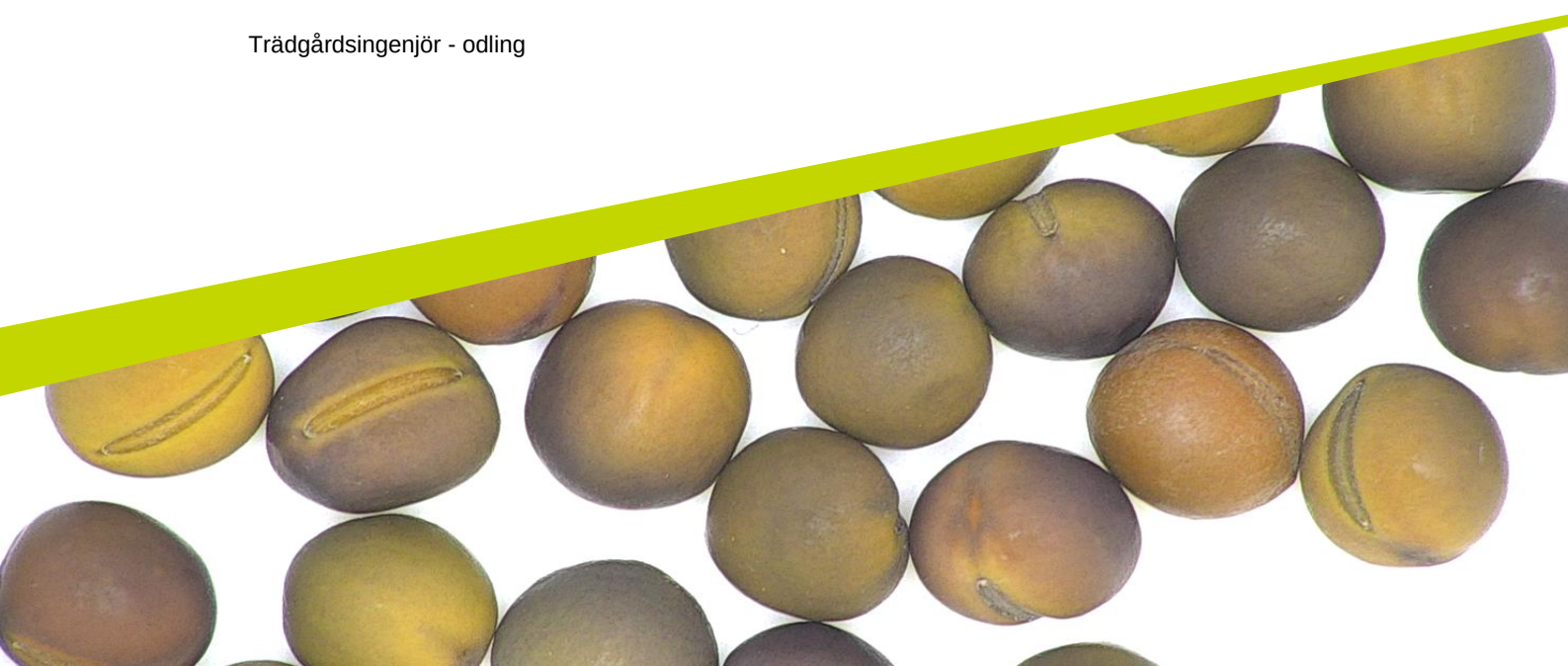
Examensarbete/Självständigt arbete • 15 hp

Sveriges lantbruksuniversitet, SLU

Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap

Institutionen för biosystem och teknologi

Trädgårdsingenjör - odling





*Varje frö vet sin tid*

*There is a crack in everything, that's how the light (water) gets in*

- *Leonard Cohen, Anthem*

# Brytning av frövila hos *Lathyrus japonicus*, *Medicago sativa* och *Myrrhis odorata* med ultraljud och temperaturbehandling

- En experimentell studie för optimering av genbanksbevarande

*Breaking seed dormancy of Lathyrus japonicus, Medicago sativa and Myrrhis odorata  
with ultrasonic and temperature treatment to enhance germination*

- An experimental study to optimize gene bank conservation

Elin Sebyhed

**Handledare:** Salla Marttila, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för  
växtskyddsbiologi

**Bitr. handledare:** Johan Axelsson NordGen

**Bitr handledare** Anna Palmé, NordGen

**Bitr. handledare:** Sofia Johansson, NordGen

**Examinator:** Kimmo Rumpunen, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för  
växtförädling

**Omfattning:** 15hp

**Nivå och fördjupning:** Grundnivå, G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i trädgårdsvetenskap

**Kurskod:** EX0844

**Program/utbildning:** Trädgårdsingenjörsprogrammet - odling

**Kursansvarig inst.:** Institutionen för biosystem och teknologi

**Utgivningsort:** Alnarp

**Utgivningsår:** 2025

**Omslagsbild:** Elin Sebyhed

**Upphovsrätt:** Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.

**Nyckelord:** Frövila, ultraljudsbehandling, temperaturbehandling,  
*Lathyrus japonicus*, *Medicago sativa*, *Myrrhis odorata*

**Sveriges lantbruksuniversitet**

Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap

Institutionen för biosystem och teknologi

## Sammanfattning

Studien undersöker om ultraljud och temperaturbehandling (frys -80°C + varmvatten 90°C) kan bryta frövilan hos tre vilda kultursläktingar, *Lathyrus japonicus*, *Medicago sativa* subsp. *falcata* och *Myrrhis odorata*. Syftet är att optimera bevarandet av dessa arter hos Nordiskt Genresurscenter (NordGen) där arterna har haft låg groningsframgång. Om ultraljud- eller temperaturbehandlingen visar på högre groning än nuvarande protokoll kan metoderna implementeras i NordGens verksamhet. Temperaturbehandlingen av både *Lathyrus japonicus* och *Medicago sativa* visade signifikanta resultat jämfört med kontrollbehandlingen, 89,4% (7,7% kontroll) respektive 41,4% (14,4% kontroll). Ultraljudsbehandlingen visade inga signifikanta resultat jämfört med kontrollbehandlingen hos alla arter. *Myrrhis odorata* hade 0 % groning i alla behandlingar. Resultatet från temperaturbehandlingen på arten *Lathyrus japonicus* uppnår NordGens interna mål för groning och blir därmed den rekommenderade metoden för denna art.

*Nyckelord:* Frövila, ultraljudsbehandling, temperaturbehandling, *Lathyrus japonicus*, *Medicago sativa*, *Myrrhis odorata*

## Abstract

This study aims to examine if ultrasonic and temperature treatment (freeze -80°C + hot water 90°C) can break the seed dormancy of three wild crop relatives, *Lathyrus japonicus*, *Medicago sativa* subsp. *falcata* and *Myrrhis odorata*. The purpose is to optimize gene bank conservation in the Nordic Genetic Resource Center (NordGen) where these species have had a low germination success. If the treatments accomplish better germination results than the current protocol at NordGen, these methods can be implemented. The temperature treatment accomplished significant germination results compared to control treatment, *Lathyrus japonicus* from 7,7% to 89.6% and *Medicago sativa* from 14.4% to 41.4%. The ultrasonic treatment didn't have any significant germination results compared to control treatments in all species. *Myrrhis odorata* had 0% germination in all treatments. The results of *Lathyrus japonicus* accomplish NordGens goal of germination and is therefore the recommended treatment for this species.

*Keywords:* Seed dormancy, ultrasonic treatment, temperature treatment, *Lathyrus japonicus*, *Medicago sativa*, *Myrrhis odorata*

## Innehåll

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabellförteckning .....</b>                                       | <b>8</b>  |
| <b>Figurförteckning .....</b>                                        | <b>9</b>  |
| <b>Förkortningar .....</b>                                           | <b>11</b> |
| <b>1. Introduktion .....</b>                                         | <b>12</b> |
| <b>2. Syfte.....</b>                                                 | <b>13</b> |
| <b>3. Litteraturgenomgång .....</b>                                  | <b>14</b> |
| 3.1 Varför bevarar genbanker vilda kultursläktingar? .....           | 14        |
| 3.2 De valda arterna.....                                            | 15        |
| 3.2.1 <i>Lathyrus japonicus</i> – Strandvial .....                   | 15        |
| 3.2.2 <i>Medicago sativa</i> subsp. <i>falcata</i> – gullusern ..... | 16        |
| 3.2.3 <i>Myrrhis odorata</i> – Spansk körvel .....                   | 17        |
| 3.3 Frövila.....                                                     | 17        |
| 3.3.2 Frövila hos de valda arterna .....                             | 19        |
| 3.4 Valda behandlingar för att bryta frövila .....                   | 21        |
| 3.4.1 Ultraljud .....                                                | 21        |
| 3.4.2 Temperaturbehandling.....                                      | 22        |
| <b>4. Metod &amp; material .....</b>                                 | <b>24</b> |
| 4.1 Accessioner.....                                                 | 24        |
| 4.2 Tetrazoliumtest.....                                             | 24        |
| 4.3 Behandlingar .....                                               | 25        |
| 4.3.1 Temperaturbehandling.....                                      | 26        |
| 4.3.2 Ultraljudsbehandling .....                                     | 26        |
| 4.5 Groningstester .....                                             | 27        |

|                                                     |           |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| 4.6 Statistisk analys.....                          | 30        |
| <b>5. Resultat .....</b>                            | <b>31</b> |
| 5.1 Tetrazoliumtest.....                            | 31        |
| 5.2 Groningstester – <i>Lathyrus japonica</i> ..... | 32        |
| 5.3 Groningstester - <i>Medicago sativa</i> .....   | 35        |
| 5.4 Groningstester - <i>Myrrhis odorata</i> .....   | 36        |
| <b>6. Diskussion .....</b>                          | <b>37</b> |
| 6.1 Försöket i backspegeln .....                    | 37        |
| 6.2 Temperaturbehandlingen .....                    | 38        |
| 6.3 Ultraljud .....                                 | 39        |
| 6.4 <i>Myrrhis odorata</i> .....                    | 41        |
| <b>7. Slutsats .....</b>                            | <b>42</b> |
| <b>Referenser.....</b>                              | <b>43</b> |
| <b>Tack 47</b>                                      |           |
| <b>Bilaga 1.....</b>                                | <b>49</b> |
| <b>Bilaga 2.....</b>                                | <b>52</b> |
| <b>Bilaga 3.....</b>                                | <b>53</b> |
| <b>Bilaga 4.....</b>                                | <b>57</b> |
| <b>Publicering och arkivering .....</b>             | <b>60</b> |

# Tabellförteckning

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabell 1. Olika typer av frövila, bakomliggande mekanism och metod för att bryta frövilan.<br>Källa: (Baskin & Baskin, 2004) ..... | 19 |
| Tabell 2. Översiktstabell med information om de valda arterna.....                                                                 | 21 |
| Tabell 3. Information om accessionerna som användes i denna studie för att undersöka<br>olika sätt att bryta frövila. ....         | 24 |
| Tabell 4. Behandlingar, replikat och antal frön per art. ....                                                                      | 25 |
| Tabell 5. Behandlingstider ultraljudbadet för de olika arterna.....                                                                | 27 |



# Figurförteckning

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figur 1. Bild på Strandvial. Foto: Agnieszka Kwiecień, Nova, Wikipedia commons.....                                                                                                                                                                                                                                           | 15 |
| Figur 2. Bild på <i>Medicago sativa</i> subsp. <i>falcata</i> . Foto: Stefan.lefnaer. Wikipedia .....                                                                                                                                                                                                                         | 16 |
| Figur 3. Bild på <i>Myrrhis odorata</i> . Foto: Egen bild.....                                                                                                                                                                                                                                                                | 17 |
| Figur 4. Sex replikat av <i>Medicago sativa</i> i varsitt provrör, precis uttagna ur -80°C frys. ..                                                                                                                                                                                                                           | 26 |
| Figur 5. a) Ultraljudsbadet Ultrasons 1L, J.P. SELECTA. b) <i>Medicago sativa</i> frön med en finmaskig sil ovanpå för att hållas på plats i ultraljudsbadet. ....                                                                                                                                                            | 26 |
| Figur 6. a) De olika replikaten av <i>Myrrhis odorata</i> placerade i inkubator. b) <i>Lathyrus japonicus</i> i veckat papper i plastbehållare c) <i>Myrrhis odorata</i> i plastlock med två filterpapper, d) <i>Medicago sativa</i> i petriskålar med två filterpapper. ....                                                 | 28 |
| Figur 7. Fördelning av behandlingar inom de olika blocken för <i>Lathyrus japonicus</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                | 28 |
| Figur 8. Fördelning av behandlingar inom blocken för <i>Medicago sativa</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                            | 29 |
| Figur 9. Fördelning av behandlingar inom blocken för <i>Myrrhis odorata</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                            | 29 |
| Figur 10. Andel infärgade frön, tetrazoliumtest. ....                                                                                                                                                                                                                                                                         | 31 |
| Figur 11. Infärgning tetrazoliumtest. a). Ej infärgad, <i>Medicago sativa</i> b) Röd infärgning <i>Medicago sativa</i> . 4c. Röd infärgning <i>Lathyrus japonicus</i> . 4d. Röd infärgning av <i>Myrrhis odorata</i> . ....                                                                                                   | 32 |
| Figur 12. Resultat från groningstester av arten <i>Lathyrus japonicus</i> . Kontrollgrupp och de olika behandlingarna; temperaturbehandling, ultraljud 2 minuter, ultraljud 30 minuter, ultraljud 60 minuter. Staplar markerade med samma bokstav indikerar att det ej fanns signifikant skillnad mellan behandlingarna. .... | 33 |
| Figur 13. a) Bild innan ultraljudsbehandling <i>Lathyrus japonicus</i> behandlingstid '60 minuter'. b) Bild efter ultraljud, samma frön. c) Förstorad bild på de uppsvällda fröna, <i>Lathyrus japonicus</i> efter ultraljudsbehandling '60 minuter'. d) Samma frön som i 13c. ....                                           | 33 |
| Figur 14. Temperatur i ultraljudsbad, innan och efter behandling av <i>Lathyrus japonicus</i> . De olika behandlingstiderna; 2 minuter, 30 minuter, 60 minuter. ....                                                                                                                                                          | 34 |

Figur 15. Resultat från groningstester av arten *Medicago sativa*. Kontrollgrupp och de olika behandlingarna; temperaturbehandling, ultraljud 2 minuter, ultraljud 7 minuter, ultraljud 12 minuter. Staplar markerade med samma bokstäver indikerar att det ej fanns signifikant skillnad mellan behandlingarna..... 35

# Förkortningar

| Förkortning | Betydelse                              |
|-------------|----------------------------------------|
| SLU         | Sveriges lantbruksuniversitet          |
| NordGen     | Nordiskt Genresurscenter               |
| ISTA        | International Seed Testing Association |
| TCC         | 2,3,5-trifenyltetrazoliumklorid        |
| ANOVA       | Analysis of variance                   |

# 1. Introduktion

Nordiskt genresurscenter (NordGen) har ett uppdrag under Nordiska ministerrådet att bevara och främja ett hållbart nyttjande av genetiska resurser inom Norden (NordGen, 2024). En stor del av arbetet går ut på att förvalta genetiskt material från skog, husdjur och växter. Växtsektionen är den del som kräver mest resurser och innehåller allt från gamla sorter av lantbruksgrödor till trädgårdsväxter, medicinalväxter, prydnadsväxter samt en del vilda kultursläktingar. För att uppnå så god hållbarhet som möjligt torkas fröna och placeras i frys och behöver övervakas med groningstester och uppförökas med jämna mellanrum.

I NordGens uppdrag att bevara vilda kultursläktingar finns utmaningar i själva uppförökningen av dessa. De är i högre grad anpassade till naturliga förhållanden jämfört med våra odlade grödor och kan vara mer utmanande att få att gro under kontrollerade förhållanden. Det är inte alltid känt vilken frövila en viss art har, vilket försvårar valet av behandling. Olika typer av frövila kräver olika behandlingar, exempelvis hormonell stimulans, mekanisk skada eller temperaturväxlingar (Baskin & Baskin 2014). Frövila är en evolutionär strategi som utvecklats under miljoner år för att säkerställa artens överlevnad, och för att bryta denna vila krävs ofta någon typ av yttre stimulans som efterliknar naturliga signaler.

För att optimera arbetet i frölaboratoriet hos NordGen avser de att uppdatera groningsprotokollen med rekommendationer om den mest effektiva behandlingen för arter med låg groning på grund av frövila.

## 2. Syfte

Syftet med studien är att undersöka om ultraljudbehandling och temperaturbehandling kan bryta frövilan och förbättra groningen hos arterna *Lathyrus japonicus*, *Medicago sativa* och *Myrrhis odorata* jämfört med en obehandlad kontrollgrupp.

Frågeställningar:

1. Har ultraljud- och temperaturbehandling någon effekt på groningen hos de studerade arterna jämfört med en obehandlad kontrollgrupp?
2. Har behandlingstidens längd i ultraljudsbadet någon effekt på groningen?
3. Kan någon av behandlingarna ha en negativ inverkan på frögroningen?
4. Finns det artberoende skillnader i hur frögroningen påverkas av behandlingarna?

### 3. Litteraturgenomgång

#### 3.1 Varför bevarar genbanker vilda kultursläktingar?

Vilda kultursläktingar (Crop wild relatives) definieras som föregångare eller släkt till dagens odlade grödor. Det kan vara samma art fast vild, eller en art i samma släkte (Aronsson et al., 2012). Två av arterna i denna studie betraktas som vilda kultursläktingar. *Lathyrus japonicus* är nära släkt med olika foderärter, exempelvis *Lathyrus sativus*. *Medicago sativa* subsp. *falcata* är en underart till den odlade foderväxten blåusern (*Medicago sativa*). *Myrrhis odorata* är däremot en medicinalväxt och bevaras på grund av sin kulturella betydelse.

Domesticeringen av våra grödor är en process som har möjliggjort att vi idag kan föda en så stor befolkning som jorden har (Dempewolf et al., 2017). Den innebär att människan har valt ut egenskaper gynnsamma för odling exempelvis ökad avkastning, förbättrad smak eller snabbare mognad och i den processen har grödorna förlorat egenskaper som är viktiga för överlevnad i naturliga miljöer. Moderna sorter inom lantbruket besitter idag en liten genetisk variation jämfört med lantsorter och vilda växter (Dempewolf et al., 2017). Genotyper med resistens mot olika växtsjukdomar, förmåga att hantera biotisk eller abiotisk stress har förädlats bort men kan finnas kvar hos deras vilda föregångare eller vilda släktingar (Dempewolf et al., 2017).

Typexempel på när en vild släkting har varit betydande inom växtförädlingen av en odlad gröda, är bland annat den vilda potatisen *Solanum demissum* Lindl som besitter gener med resistens mot potatisbladmögel (*Phytophthora infestans*) (Díaz-García et al. 2024). Växtsjukdomen potatisbladmögel triggade bland annat i gång den stora svälten på Irland under 1840-talet och är idag fortfarande besvärlig inom lantbruket på grund av patogenens förmåga att anpassa sig (Yoshida et al., 2013).

I takt med att klimatet förändras förväntas lantbruksgrödorna bli mer utsatta för extremväder och andra klimatrelaterade påfrestningar (Jarvis et al., 2008; FAO,

2016) samtidigt som flera av de vilda kultursläktingarna själva riskerar att utrotas med ett förändrande klimat (Fitzgerald et al., 2019). De vilda kultursläktingarna anses vara underrepresenterade i bevarandeprogram och i vissa fall är deras betydelse varken känd eller värderad (Ford-Lloyd et al., 2011). Om vilda arter utrotas är det i sig en förlust men innebär också att egenskaper som kan vara värdefulla inom växtförädling för att anpassa matproduktion i stundande klimatförändringar går förlorade (Jarvis et al., 2008). Prioritet är givetvis att bevara dem i dess naturliga habitat, men lagring i genbanker kan också vara nödvändigt.

## 3.2 De valda arterna

I samråd med NordGen valdes arterna *Lathyrus japonicus*, *Medicago sativa* och *Myrrhis odorata* ut till försöket eftersom de uppvisat låg grobarhet under optimala groningsförhållanden, vilket indikerar frövila. Arterna behövde också finnas tillgängliga i större mängd för att kunna utföra försöken.

### 3.2.1 *Lathyrus japonicus* – Strandvial

*Lathyrus japonicus* växer i princip runt hela Sveriges kust vid stränderna och är vanlig till sällsynt på sand-, grus- och klapperstenstränder vid havet (Mossberg, 2003). Den klassificeras som inhemsk då den kom spontant till Sverige innan 1800-talet (SLU Artdatabanken, 2025). Blommorna är i klasar på 5–12 violetta blommor, som sedan övergår till blåviolett senare på säsongen.

Stjälken är oftast liggande med klänge och breda stipler och växtsättet syns i figur 1. Blommorna är 15–20 mm långa, baljan 3–5 cm och de runda ärtorna flyter i vatten (Mossberg, 2003).



Figur 1. Bild på Strandvial. Foto: Agnieszka Kwiecień, Nova, Wikipedia commons

### 3.2.2 *Medicago sativa* subsp. *falcata* – gullusern



Figur 2. Bild på *Medicago sativa* subsp. *falcata*. Foto: Stefan.lefnaer. Wikipedia

*Medicago sativa* subsp. *falcata* eller gullusern, är en underart till blålusern (*Medicago sativa*) vilka tidigare betraktades som skilda arter. Blålusern är en fodergröda som blivit förvildad och är idag ganska vanligt förekommande i landskapet, bland annat vid väg- och åkerkanter (Mossberg, 2003; Tyler & Lundquist, 2007). *Medicago sativa* blev aktivt införd i Sverige innan 1800 och klassas därför som en inhemsk växt (SLU

Artdatabanken, 2025) men kommer ursprungligen från sydvästra Asien (Mossberg, 2003). Gullusern är något mindre vanlig men återfinns vild i Sverige främst på

solöppna, torra och relativt näringsrika marker såsom betesmarker, bryn, vägkanter, gamla avstjälningsplatser. Den har använts som foderväxt och kan vara kvarstående eller förvildad (Tyler & Lundquist, 2007). Gullucern blir cirka 20–50 cm med liggande till uppstigande stjälk (figur 2), blommorna gula i en 1–2,5 cm lång klase (Mossberg, 2003). Det är en ärtväxt och har förmågan att bilda symbios med kvävefixerande bakterier.

I denna studie används frön från accession *Medicago sativa* subsp. *falcata*. Men eftersom blålusern och gullusern går under samma art, kommer jag i resterande rapport benämna den *Medicago sativa* där underarterna är inkluderade.



### 3.2.3 *Myrrhis odorata* – Spansk körvel



Figur 3. Bild på *Myrrhis odorata*. Foto: Egen bild.

*Myrrhis odorata*, eller spansk körvel som den kallas, är en förvildad trädgårdsväxt och ganska vanligt förekommande i Sverige. Den var aktivt införd innan år 1800 (SLU Artdatabanken, 2025), och kommer ursprungligen från bergen i Central- Sydeuropa (Carlson-Nilsson & Aloisi, 2022). Den återfinns bland annat vid torpruiner, gammal bebyggelse, vägkanter, parker och betesmarker där jorden är mullrik och frisk (Mossberg, 2003). *Myrrhis odorata* är en perenn växt där bladverket växer till sig första året, för att sedan blomma andra året. Hela plantan har använts som krydda då den har en stark aromatisk anisdoft (Mossberg, 2003), och som läkeväxt eftersom den är karminativ

(främjar matspjälkningen) och expektorant (slemlösande) (Carlson-Nilsson & Aloisi, 2022). *Myrrhis odorata* är till utseendet lik hundkäx (figur 3), men har ljusare gröna blad och mjuka, trekantiga finhåriga blad (Mossberg, 2003). Blomställningen består av 4–20 strålar och får få frukter i varje småflock. Fröna är ganska stora, mellan 15–25 millimeter med relativt kort hållbarhet. De skördas när de blivit bruna och hårda och kan dröja något innan de börjar gro (Carlson-Nilsson & Aloisi, 2022).

## 3.3 Frövila

Frövila innebär att fröet, efter mognad och trots optimala förhållanden, inte gror (Baskin & Baskin, 2004). Anpassningarna består av inneboende mekanismer, eller en kombination av mekanismer som fördröjer groningen. Det finns olika

*typer* och *nivåer* av frövila och är ett resultat av evolutionära anpassningar för överlevnad (Baskin et al., 2000).

Frövila är avgörande för växter i naturen eftersom den bland annat förhindrar att fröet börjar gro innan vintern är slut i tempererade klimat, eller att fröet börjar gro på moderplantan där rötterna inte har kontakt med jorden och följaktligen ingen chans att hämta näring (Baskin & Baskin, 2014). Inom lantbruksproduktion kan både avsaknad av frövila, eller ojämn och för djup frövila vara problematisk (Tuan et al., 2018). Det kan resultera i axgroning eller ojämn uppkomst av grödorna i fält och följaktligen leda till ekonomiska förluster.

Genbanker har liknande problematik, men av fler skäl. Deras uppgift är att bevara den genetiska variationen hos friskt utsäde, då är det av vikt att hela den livskraftiga variationen förökas upp, inte bara de som gror snabbast på grund av avsaknad av frövila. En ytterligare aspekt är att få tillförlitliga resultat i de groningstester som utförs regelbundet. Om flertalet frön inte gror på grund av frövila, kan det misstolkas som livsoduglighet och leda till onödig uppförökning. Det kräver mer resurser, när det som egentligen behövs är en mer effektiv metod att bryta frövilan på.

Mekanismerna som ligger bakom frövilan har visat skilja sig mycket mellan olika växttyper, medan nära släktingar innebär liknande frövila. Baskin & Baskin (2004) har sammanställt en klassificering av de olika typerna av frövila. Här nedan finns informationen i tabellform för att ge en överblick över fenomenet.

Tabell 1. Olika typer av frövila, bakomliggande mekanism och metod för att bryta frövilan. Källa: (Baskin & Baskin, 2004)

| Frövila                     | Fysisk                                                                                                  | Fysiologisk                                                                                               | Morfologisk                                                                                                    | Morfofysiologisk                                                                          | Fysiologisk + fysisk                                                                                              |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Typ                         | Yttre frövila                                                                                           | Inre frövila                                                                                              | Inre frövila                                                                                                   | Inre frövila                                                                              | Inre frövila                                                                                                      |
| Mekanism                    | Innebär att ett eller flera lager av pallisadceller, som är ogenomträngliga för vatten, omgärdar fröet. | Tillväxtregulatorer är inblandade. Förhållandet mellan tillväxthormoner och frövila-inducerande hormoner. | Embryot är underutvecklat, inte frövila <i>per se</i> .                                                        | Har ett underutvecklat embryo tillsammans med fysiologisk frövila.                        | Utöver fysisk frövila är embryot i fysiologisk vila.                                                              |
| Metod för att bryta frövila | Kemisk eller mekanisk rispning kan bryta frövilan.                                                      | Rispning, temperaturbehandling /stratifiering eller tillväxthormon kan hjälpa.                            | Behöver inte nödvändigtvis en behandling för att bryta frövila, men tillräcklig tid för embryot att utvecklas. | Behöver oftast en behandling för att bryta frövila, samt längre period för att börja gro. | Kan behöva behandling för att bryta den fysiska frövilan eller stratifiering för att bryta fysiologiska frövilan. |

### 3.3.2 Frövila hos de valda arterna

En översiktstabell med information om frövilan hos de valda arterna visas nedan i tabell 2. Två av de valda arterna i denna studie, *Lathyrus japonicus* och *Medicago sativa* har precis som många andra i familjen *Fabaceae*, en fysisk frövila (Morrison, 1998; Baskin et al., 2000). Graden av den fysiska frövila beror förutom på genetiken också på geografisk plats, utvecklingstid, temperatur och relativ fuktighet (Tiryaki & Topu, 2014). Ett frö med hårt fröskal kan överleva länge i jorden, särskilt i ogynnsammare miljöförhållanden (Wang et al., 2023).

Vid fysisk frövila fungerar det vattenimpermeabla fröskalet som en mekanisk barriär som förhindrar vattenupptagning (imbibition). För att fröet ska kunna gro

behövs någon typ av nötning, i naturliga förhållanden kan detta vara temperaturväxlingar, eld eller någon annan typ av naturlig nötning som ger upphov till att vatten kan tränga igenom (Baskin et al., 2000). Vattnen behöver tränga in i fröets vävnader för att embryot ska börja svälla och fröet kunna påbörja transporten av hormoner och näringsämnen som behövs för att initiera groningen. Imbibitionen bidrar också till att mjuka upp fröskalet, vilket minskar motståndet för rotdelen att tränga igenom och börja gro. När fröskalet hos arter med fysisk frövila har blivit vattenpermeabelt, är det en irreversibel process (Hamley, 1932). Det skiljer sig något från exempelvis fysiologisk frövila vilket kan återinträda i en andra frövila efter att den blivit bruten (Baskin & Baskin, 2014).

Frön av arten *Medicago sativa* är kända för att bestå av en andel hårda och vattenimpermeabla fröskal, det vill säga en fysisk frövila. Samtidigt som en andel frön inom samma population inte har någon frövila alls och gror vid tillgång på vatten och värme. Wang et al. (2023) undersökte fysiologiska skillnader mellan undergrupper av de hårda fröna. Resultatet visade att vissa frön trots risping, fortfarande inte grodde. Dessa frön uppvisade signifikant högre nivåer av flavonoider, lipider och hormoner och framför allt frövila-inducerade växthormonet abskisin (ABA). ABA är ett växthormon delaktigt i frövilan, där det har ett antagonistiskt förhållande med tillväxthormonet gibberellin (GA) som i stället stimulerar groningen (Tuan et al., 2018). De mätningar av hormonförhållandet i fröna som Wang et al. (2023) utförde, indikerar att en andel av de hårda fröna har en fysiologisk frövila, utöver den fysiska och därmed kombinerad. 24,5% av de undersökta fröna hade fysiologisk frövila utöver den fysiska frövila, totalt 8 % enligt Wang et al. (2023).

Resultatet (Wang et al., 2023) visar ett exempel på hur *typ* och *nivå* av frövila inom samma population kan skilja sig åt. En möjlig tolkning att det är en anpassningsstrategi för växter i oberäkneliga klimat, där de producerar frön av varierande storlek, morfologi och fröviletyp (Loades et al., 2023).

I Lhotská's (1977) försök att bryta frövila hos *Myrrhis odorata* med olika temperaturbehandlingar, var de kallare temperaturerna mest framgångsrika. Det högsta gröningsresultatet uppnåddes när de utsattes för temperaturer på -3°C nattetid och +5°C dagtid. Först efter 59 dagar började det första fröet gro i studien och de flesta av de som grodde gjorde det mellan dag 70–90.

Resultatet indikerar enligt Lhotská (1977) att *Myrrhis odorata* har ett underutvecklat embryo som behöver tid på sig att utvecklas. Hypotesen stärks av att arten har ett litet embryo i förhållande till fröets storlek 1:10 (Lhotská, 1977). Underutvecklat embryo kan innebära morfologisk frövila eller morfofysiologisk frövila (Baskin & Baskin, 2014). Flera arter inom växtfamiljen *Apiaceae* besitter någon form av underutvecklat embryo och en del av dem har också fysiologisk frövila (Baskin & Baskin, 2014; Zhang et al., 2019). I NordGens nuvarande protokoll ligger *Myrrhis odorata* 57 dagar i 4°C kyla och tar oftast uppåt 50 dagar i inkubator att börja gro.

Tabell 2. Översiktstabell med information om de valda arterna.

| Latin                                        | Trivialnamn   | Familj          | Livscykel | Frövila                                  |
|----------------------------------------------|---------------|-----------------|-----------|------------------------------------------|
| <i>Lathyrus japonicus</i>                    | Strandvial    | <i>Fabaceae</i> | Annuell   | Fysisk                                   |
| <i>Medicago sativa</i> subsp. <i>falcata</i> | Gullusern     | <i>Fabaceae</i> | Perenn    | Fysisk, fysiologisk, avsaknad av frövila |
| <i>Myrrhis odorata</i>                       | Spansk körvel | <i>Apiaceae</i> | Perenn    | Underutvecklat embryo                    |

### 3.4 Valda behandlingar för att bryta frövila

#### 3.4.1 Ultraljud

Ultraljud är en typ av energi som skickar ut ljudvågor med en frekvens större än 20 kHz (Ensminger, 2008; Moosavi et al., 2018). Ljudvågorna kan överföras i luft och vatten och ohörbart för det mänskliga örat. Ultraljudsbehandling som metod för att bryta frövila har visat sig lovande i flera studier (Nazari et al., 2014;

Venâncio & Martins, 2019; Huang et al., 2024). I NordGens fall har ultraljudsbehandlingen potential att åstadkomma en mer enhetlig behandling än exempelvis rispning med sandpapper eftersom de metoder medför en risk att skada fröna och ge upphov till abnormala fröplantor. Ultraljudet skulle även kunna minska behovet av att använda syntetiska växthormoner eller andra kemikalier såsom kaliumnitrat för groning (Moosavi et al., 2018).

Hypoteserna bakom ultraljudets påverkan på frön bygger på att ljudvågorna skapar snabba tryckväxlingar i vattenmiljön (Kavak, 2024). Dessa växlingar mellan högt och lågt tryck leder till att mikroskopiska gasbubblor bildas och sedan kollapsar, en process kallad kavitation. Vid kavitationen frigörs energi i form av chockvågor samt lokalt högt tryck och värme, vilket tros kunna påverka fröskalet mekaniskt (Moosavi et al., 2018). Främst genom mikrosprickor i fröskalet som ger upphov till permeabilitet, påskyndar vattenupptaget och därmed bryter därmed den fysiska frövilan. López-Ribera & Vicient (2017) rapporterar att frön som genomgått ultraljudsbehandling hade en större andel av porer i fröskalet än kontrollgruppen. Det stärker hypotesen att om att ultraljudets kavitation skapar mikrosprickor på fröskalet, vilket påskyndar imbibitionen och resulterar i högre groning.

Yaldagard et al. (2008) menar vidare att kavitation, genom bubblorna som växer och kollapsar i högtryckscykler även kan orsaka en form av stress i fröets celler som leder till fysiologiska förändringar.

Även om de bakomliggande mekanismerna ännu inte är fullt klarlagda, visar resultaten från flera studier (Moosavi et al., 2018; Venâncio & Martins, 2019; Nazari et al., 2014) att ultraljudsbehandling har en positiv effekt på groningen hos vissa arter.

### 3.4.2 Temperaturbehandling

Frysning-upptining som metod för att bryta frövila hos *Fabaceae* arter med hårda fröskal har varit känd och nyttjad sedan 1930-talet. Men på senare tid har Tiriyaki och Topu (2014) utvecklat metoden genom att lägga till varmvattnet efteråt. De

kallar behandlingen *freeze-thaw scarification + hot water* och är en av de valda metoderna denna studie. I deras försök testas metoden på *Lupinus albus* och *Trifolium pratense* med olika temperaturer, tider och jämförs med endast frysning och endast värmebehandling. Behandlingen på 1 dag i frys (-80°C) och 5 sekunder varmvattnet (90°C) uppnådde högst groning. Groningstiden förkortades och blev mer enhetlig också.

Tiryaki och Topu (2014) menar att det finns potential för att den skulle fungera för fler arter med hårda fröskal inom familjen *Fabaceae*. I dagsläget nyttjar NordGen temperaturbehandling som metod för att bryta frövila hos klöver-arter (*Trifolium*) och har ett intresse av att utforska vilka andra arter denna metod skulle vara framgångsrik på. Därav föll valet av metod på temperaturskiftningen från 24 timmar i -80°C till 90°C i fem sekunder.

Mekanismerna som tros ligga bakom effekten av behandlingen handlar om sprickor i fröskalet som uppstår vid expansion och kontraktion av fröet vid större temperaturskiftningar (Baskin & Baskin, 2004; Zeng et al., 2005). Om fröet har ett tjockt skal, är det enligt Tiryaki & Topu (2014) möjligt att höra ett sprickande ljud när de förs ned i det varma vattnet efter att ha varit i frysen.

## 4. Metod & material

Hela experimentets gång genomfördes i NordGens frölaboratorium.

### 4.1 Accessioner

NordGen bevarar sina frön i så kallade accessioner, det innebär en fröinsamling med ett unikt identifieringsnummer. Dessa frön är av samma sort och från samma tid och plats. Det kan alltså finnas många accessioner av samma sort bevarade, men insamlade vid olika tillfällen och platser. Nedan i tabell 3 följer den information som fanns tillgänglig i NordGens databas om accessionerna.

Tabell 3. Information om accessionerna som användes i denna studie för att undersöka olika sätt att bryta frövilä.

| Art                                          | Accession | Generation | Insamlingsdatum | Insamlingsland | Fyndplats    | Typ   | Antal individer |
|----------------------------------------------|-----------|------------|-----------------|----------------|--------------|-------|-----------------|
| <i>Medicago sativa</i> subsp. <i>falcata</i> | NGB132088 | 2          | 8/27/2014       | Danmark        | Sandvig      | Vild  | 200             |
| <i>Myrrhis odorata</i>                       | NGB20313  | 2          | 1/1/2008        | Finland        | Kälviä       | Odlad | Data saknas     |
| <i>Lathyrus japonicus</i>                    | NGB23643  | 2          | 10/18/2011      | Sverige        | Mossbystrand | Vild  | 1000            |

### 4.2 Tetrazoliumtest

Ett tetrazoliumtestet utfördes enligt instruktioner från ISTA:s working sheets (2011) (bilaga 1) för att ge en indikation på om fröna i accessionerna var livskraftiga och värda att gå vidare och göra behandlingarna på. I tetrazoliumtestet användes kemikalien 2,3,5-trifenyltetrazoliumklorid (TTC) för att utröna om fröna var livskraftiga, det vill säga om de uppvisar metabolisk aktivitet kopplad till respirationen (Elias, 2012). Tetrazoliumvätska blandades enligt NordGens egna recept (bilaga 2). Då ett specifikt protokoll för *Myrrhis odorata* inte fanns



tillgängligt valdes en närliggande släkting, i det här fallet *Anethum graveolens* (dill) som också hör till familjen *Apiaceae*.

Metoden bygger på förekomsten av enzymet dehydrogenase, som är aktivt i fröets cellandning (Elias, 2012). TTC fungerar som en elektronacceptor och reduceras i närvaron av metaboliskt aktiva celler vilket leder till att den färglösa vätskan TTC omvandlas till den rödfärgade föreningen formazan. Infärgas embryot i rött bedöms det som livskraftigt (Elias, 2012).

I detta arbete görs en avgränsning att bara bedöma om *någon* vävnad i fröet metaboliserar snarare än exakt hur livskraftigt fröet är då bedömningen kräver fördjupade kunskaper i ämnet. Testet gav ändå en god indikation på om det var rimligt att gå vidare med valda accessioner utfördes på ett stickprov bestående av 20 frön från varje art.

### 4.3 Behandlingar

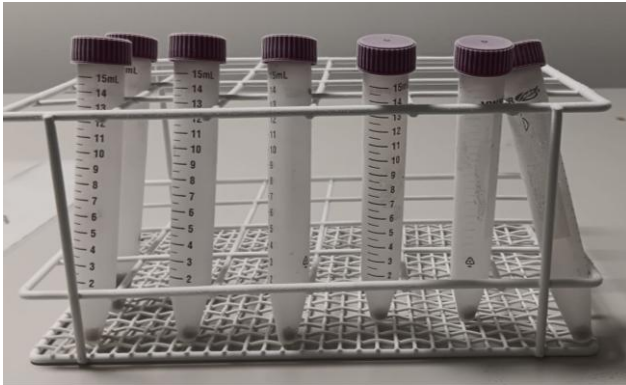
Frön av arterna *Lathyrus japonicus* och *Myrrhis odorata* fördelades ned till replikat med en randomiseringsmaskin. Behandlingarna av *Medicago sativa* utfördes på nytt på grund av en felkälla. De vägdes i stället upp och därför blev replikaten i ett mer ungefärligt antal frön, med 50 frön som riktmärke. Totalt var det 6 replikat per behandling och art och 50 frön i varje replikat, vilket visas i tabell 4.

Tabell 4. Behandlingar, replikat och antal frön per art.

| Behandling           | Replikat | Antal frön per replikat | Frön per behandling |
|----------------------|----------|-------------------------|---------------------|
| Ultraljud (tid 1)    | 6        | 50                      | 300                 |
| Ultraljud (tid 2)    | 6        | 50                      | 300                 |
| Ultraljud (tid 3)    | 6        | 50                      | 300                 |
| Temperaturbehandling | 6        | 50                      | 300                 |
| Kontroll             | 6        | 50                      | 300                 |
| <b>Totalt</b>        |          |                         | <b>1500</b>         |

#### 4.3.1 Temperaturbehandling

Sex replikat per art lades i provrör, och placerades i frys vid  $-80^{\circ}\text{C}$  i 24 timmar. Omedelbart efter att provrören plockats ut ur frysen (figur 4) sänktes de ned i ett  $90^{\circ}\text{C}$  varmt vattenbad i fem sekunder.



*Figur 4. Sex replikat av Medicago sativa i varsitt provrör, precis uttagna ur  $-80^{\circ}\text{C}$  frys.*

#### 4.3.2 Ultraljudsbehandling

Ultraljudsbadet (Ultrasons 1L, J.P. SELECTA s.a.) som användes visas i figur 5a. Behandlingen utfördes med en vågfrekvens på 40 kHz i ett vattenbad med 500 ml kranvatten. Temperaturen innan och efter behandlingen noterades för samtliga replikat eftersom vattenbadets temperatur stiger när ultraljudet är i gång.



5a



5b

*Figur 5. a) Ultraljudsbadet Ultrasons 1L, J.P. SELECTA. b) Medicago sativa frön med en finmaskig sil ovanpå för att hållas på plats i ultraljudsbadet.*

För samtliga arter användes en finmaskig sil för att centrera och hålla dem på plats (figur 5b) i ultraljudsbadet där bubblorna dyker upp. Troligtvis har mikrobubblorna och kavitationen bäst chans att träffa fröna där och ger en mer jämförbar effekt mellan replikaten.

De olika behandlingstiderna redovisas i tabell 5. För arterna *Medicago sativa* och *Myrrhis odorata* valdes tider på 2, 7 och 12 minuter. Längre behandlingstider valdes för *Lathyrus Japonicus* på 30 minuter och 60 minuter för att undersöka hur de skulle påverkas av längre tid i ultraljudsbadet. Valet grundade sig i att de enligt NordGens erfarenhet har upplevts som hårda och när ultraljudet provkördes innan själva studien var fröna till synes oberörda av längre behandlingstider.

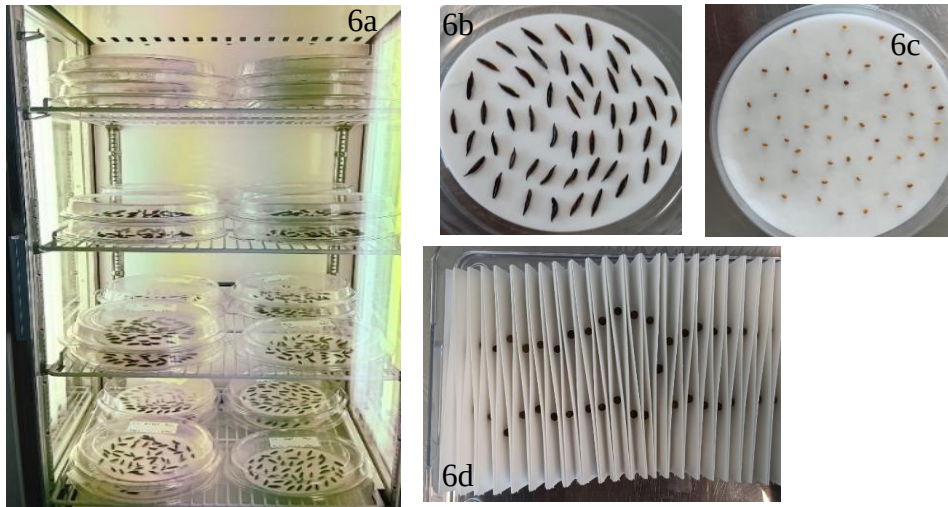
Tabell 5. Behandlingstider ultraljudbadet för de olika arterna.

| Art                       | Tid 1 | Tid 2  | Tid 3  |
|---------------------------|-------|--------|--------|
| <i>Lathyrus japonicus</i> | 2 min | 30 min | 60 min |
| <i>Medicago sativa</i>    | 2 min | 7 min  | 12 min |
| <i>Myrrhis odorata</i>    | 2 min | 7 min  | 12 min |

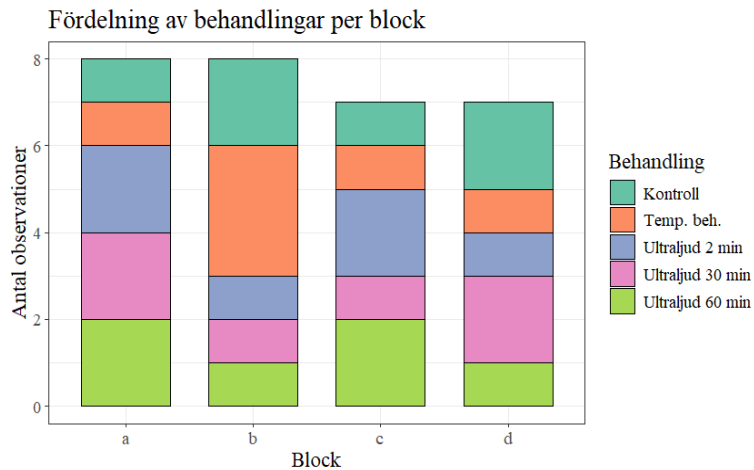
#### 4.5 Groningstester

Efter behandlingarna placerades fröna på filterpapper i olika behållare för att genomgå groningstester. *Myrrhis odorata* (figur 6b) placerades i större plastlock med två filterpapper, *Medicago sativa* placerades i petriskålar med två filterpapper (figur 6c) och *Lathyrus japonicus* i plastburkar med ett veckat papper (figur 6d). Två filterpapper användes för att bättre hålla fukten vid groningstesterna hos *Myrrhis odorata* och *Medicago sativa*. För *Lathyrus japonicus* användes endast ett papper eftersom det på grund av sin veckade form höll fukten tillräckligt bra. I inkubatorn hade *Medicago sativa* och *Lathyrus japonicus* inställningen på 20°C dygnet runt medan *Myrrhis odorata* stod på 20°C mellan 05.00-17.00 och 10°C resterande tid, också detta enligt NordGens standard för arterna. I inkubatorn placerades de olika replikaten i en randomiserad blockdesign, där varje block (hylla) innehöll minst ett replikat från varje

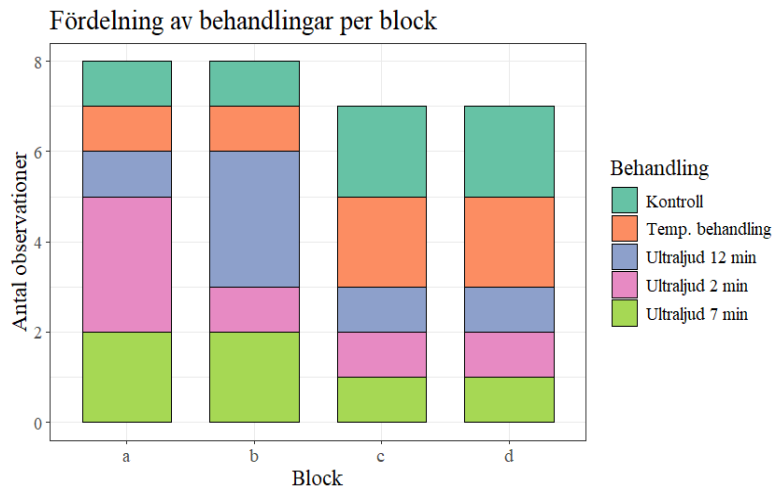
behandling (figur 7-9). Varje hylla i inkubatorn utgjorde ett block (figur 6a), och en separat randomisering utfördes för varje art.



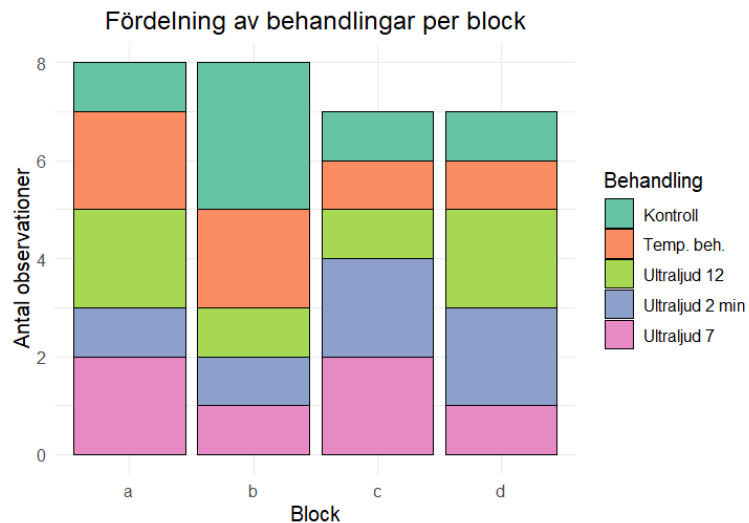
Figur 6. a) De olika replikaten av *Myrrhis odorata* placerade i inkubator. b) *Lathyrus japonicus* i veckat papper i plastbehållare c) *Myrrhis odorata* i plastlock med två filterpapper, d) *Medicago sativa* i petriskålar med två filterpapper.



Figur 7. Fördelning av behandlingar inom de olika blocken för *Lathyrus japonicus*.



Figur 8. Fördelning av behandlingar inom blocken för *Medicago sativa*.



Figur 9. Fördelning av behandlingar inom blocken för *Myrrhis odorata*.

Under groningstesterna bedömdes fröerna som grodda eller icke grodda/döda. En avgränsning gjordes att *inte* bedöma om de var normala och friska enligt ISTA:s (2009) bedömningskriterier på grund av arbetets kortare omfattning. Vid avläsningen bedömdes frön vars rot börjat komma ut som grodd.

Sista avläsningen utfördes dag 28 för *Myrrhis odorata* och *Lathyrus japonicus*.

Under groningstesterna var det efter två veckors tid i inkubatorn, väldigt låg groning hos arten *Medicago sativa* i samtliga behandlingar, inklusive kontrollgruppen. Fröna lämnades i inkubatorn vid ett längre tillfälle utan

bevattning under de helgdagar som inföll under försöket och hann torka ut. De var av misstag placerade i petriskålar utan att ha ett skyddande lager av plast omkring sig för att hålla fukten bättre. Möjligtvis gav detta upphov till att en del frön dog vilket innebär en betydande felkälla. Därför togs beslutet att helt göra om behandlingarna för *Medicago sativa*, lägga dem i plastpåsar och inte lämna dem lika länge utan vatten. Den första omgången övergavs och den nya gav resultat, redan efter en vecka hade fler frön grott i de olika behandlingarna. För de två andra arterna upplevdes inte samma uttorkningsgrad, de låg i andra behållare som höll fukten bättre.

Fröna övervakades i övrigt varannan till var tredje dag och vattnades vid behov. Vid större tillväxt av mögel byttes filterpapperen ut för att undvika att angreppet skulle drabba fler frön i replikaten och ge missvisande resultat.

## 4.6 Statistisk analys

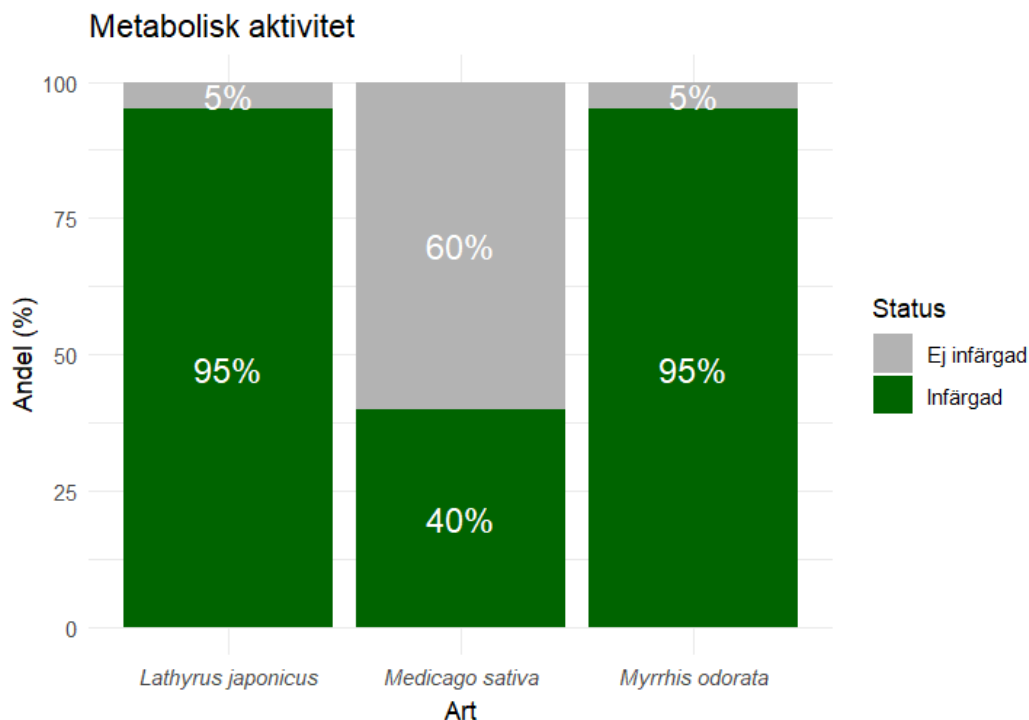
Den statistiska analysen genomfördes i R studios (4.4.2). *Generalized linear model* (GLM) användes med binomialfördelningsfunktion, eftersom utfallet var grodd/ ej grodd, med konfidensintervall på 95%. Testet modellerade efter behandling och blockeffekter. Sedan användes ANOVA-funktionen i R för analys av modellen, och avslutningsvis utförs en multipel jämförelse med funktionen *emmeans* som korregerar enligt Tukey's metod. Koden som användes finns i redovisad i bilaga 3.

## 5. Resultat

### 5.1 Tetrazoliumtest

Resultatet från tetrazoliumtestet visade att 95% av fröna av arterna *Lathyrus japonicus* och *Myrrhis odorata* var infärgade (figur 10). Det innebär att de hade metaboliserande vävnad (figur 11b-11d) och goda möjligheter att gro. Dessa två accessioner var därför värda att gå vidare och göra behandlingarna på.

*Medicago sativa* hade endast 40% infärgade frön. Även om tillvägagångssättet grundade sig på ISTA:s (2011) instruktioner (bilaga 1), missades en anmärkning om att punktera fröna om de var hårda och vid undersökning av de frön som inte var infärgade var dessa avsevärt hårdare än de andra. Troligtvis har tetrazoliumvätskan inte kunnat tränga in i frön (figur 11a), snarare än att de var livsodugliga. Därför togs även denna accession vidare i behandlingarna.



Figur 10. Andel infärgade frön, tetrazoliumtest.

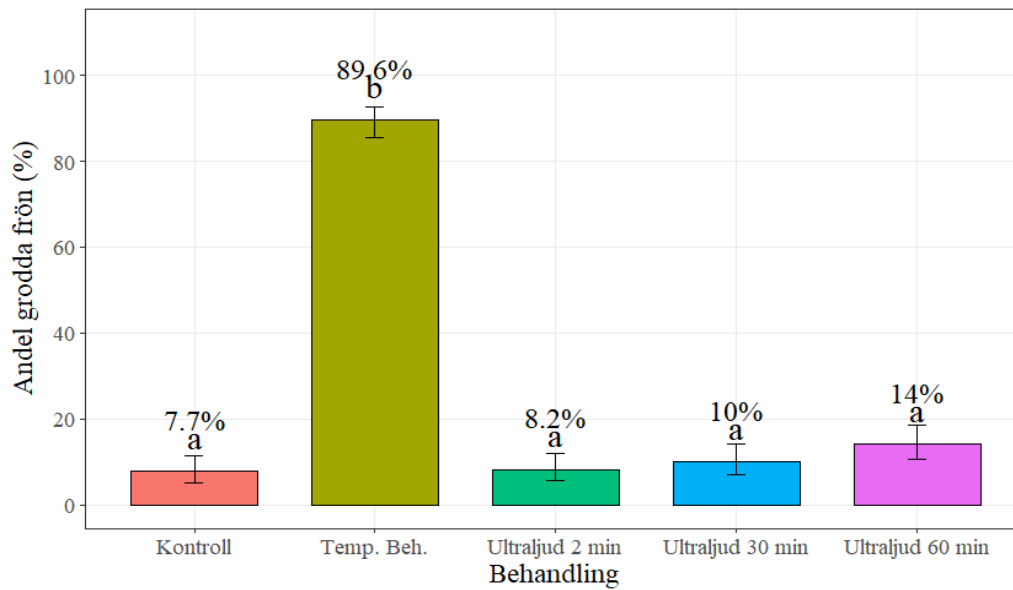


Figur 11. Infärgning tetrazoliumtest. a). Ej infärgad, *Medicago sativa* b) Röd infärgning *Medicago sativa*. 4c. Röd infärgning *Lathyrus japonicus*. 4d. Röd infärgning av *Myrrhis odorata*.

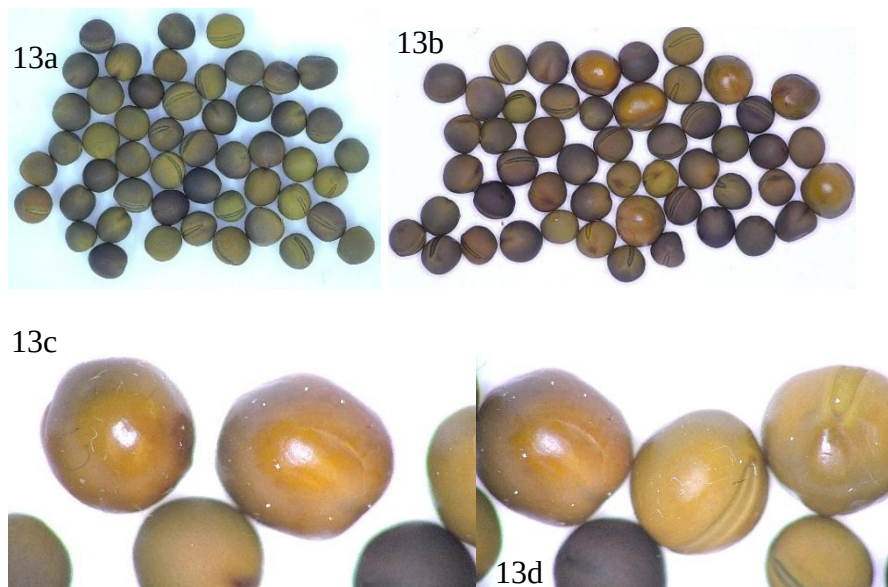
## 5.2 Groningstester – *Lathyrus japonicus*

Behandlingarna hade en effekt på utfallet av groningstesterna inom arten *Lathyrus japonicus*, vilket blir synligt i figur 12. Temperaturbehandlingen visade en signifikant skillnad ( $p = <0,0001$ ) med groning på 89,6% jämfört med endast 7,7% av kontrollgruppen. I GLM-modellen fanns även en signifikant skillnad ( $p = 0,0163$ ) mellan behandling 'ultraljud 60 min' och kontrollgrupp, men skillnaden var inte signifikant vid den multipla jämförelsen i post-hoc testet ( $p = 0,1146$ ). Andelen grodda frön var i procentenheter nästan dubbelt så många hos gruppen 'ultraljud 60 min' (14%) än hos kontrollgruppen (7,7%). I övrigt visade ingen av ultraljudsbehandlingarna någon signifikant skillnad från kontrollgruppen.





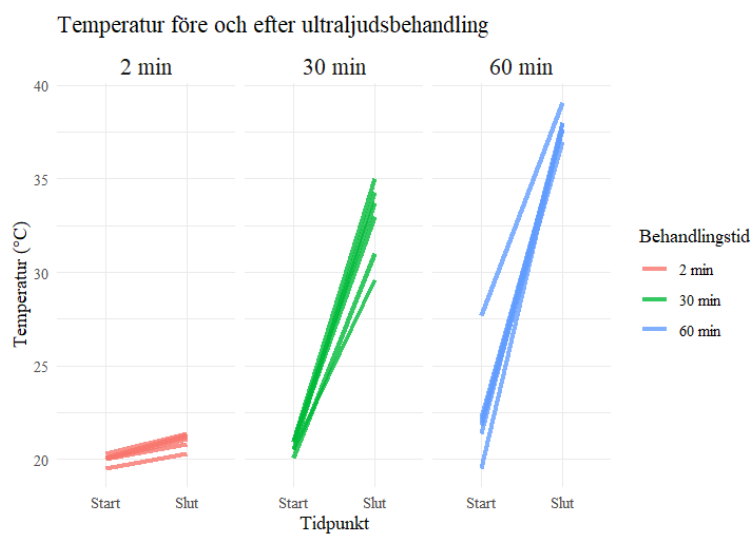
Figur 12. Resultat från groningstester av arten *Lathyrus japonicus*. Kontrollgrupp och de olika behandlingarna; temperaturbehandling, ultraljud 2 minuter, ultraljud 30 minuter, ultraljud 60 minuter. Staplar markerade med samma bokstav indikerar att det ej fanns signifikant skillnad mellan behandlingarna.



Figur 13. a) Bild innan ultraljudsbehandling *Lathyrus japonicus* behandlingstid '60 minuter'. b) Bild efter ultraljud, samma frön. c) Förstorad bild på de uppsvällda fröna, *Lathyrus japonicus* efter ultraljudsbehandling '60 minuter'. d) Samma frön som i 13c.

En förändring syns på *Lathyrus japonicus* frön innan (figur 13a) och efter (figur 13b) ultraljudsbehandlingen där 6 av fröna har svällt upp och blivit större. De strukturer som är synliga i de förstörande bilderna (figur 13c-13d) på fröna skulle kunna vara små sprickor eller porer orsakade av ultraljudsbehandlingen, vilket tidigare beskrivits av López-Ribera & Vicient (2017). Någon systematisk analys av detta utfördes inte i studien.

När ultraljudet är i gång alstrar det energi och värme i vattnet (Ensminger, 2008). Det blir påtagligt från mätningarna av vattentemperaturen i ultraljudsbadet innan och efter behandling. Temperaturen stiger mer vid ökad behandlingstid och visas i figur 14 från mätningar på de olika behandlingstiderna av arten *Lathyrus japonicus*. Starttiden ligger runt 20–25°C för i princip samtliga replikat, 2 minuter behandlingstid resulterar endast i några graders stigning medan 60 minuter ger temperaturer uppåt 36–38°C.

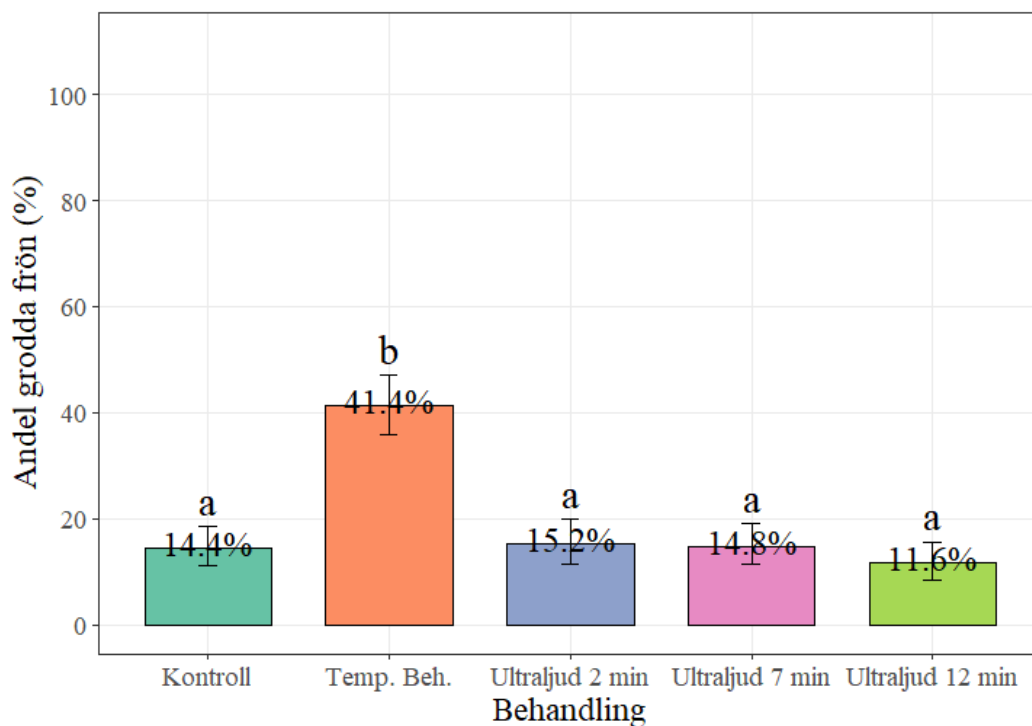


Figur 14. Temperatur i ultraljudsbad, innan och efter behandling av *Lathyrus japonicus*. De olika behandlingstiderna; 2 minuter, 30 minuter, 60 minuter.

Vid analys av GLM-modellen med ANOVA-funktionen framkom att blockens effekt för *Lathyrus japonicus* var begränsad. Behandlingarna förklarade en stor del av variationen i resultatet ( $p = <0,0001$ ) medan block inte visade någon signifikant effekt (0,4537).

### 5.3 Groningstester - *Medicago sativa*

Temperaturbehandlingen hade också en signifikant ( $p = <0,0001$ ) effekt på groningen hos *Medicago sativa* där 41,4% av fröna grodde jämfört med 14,4 % från kontrollgruppen (figur 15). Det fanns ingen signifikant skillnad mellan ultraljudsbehandlingarna och kontrollen i försöken på *Medicago sativa*. Den längre behandlingstiden 'ultraljud 12 min' hade lägst resultat i groningenstesterna på 11,6% och alltså mindre än kontrollgruppen på 14,4%.



Figur 15. Resultat från groningenstester av arten *Medicago sativa*. Kontrollgrupp och de olika behandlingarna; temperaturbehandling, ultraljud 2 minuter, ultraljud 7 minuter, ultraljud 12 minuter. Staplar markerade med samma bokstäver indikerar att det ej fanns signifikant skillnad mellan behandlingarna.

När ANOVA-funktionen applicerades på GLM-modellen av *Medicago sativa*, visade den en signifikant effekt av både block ( $p = 0,00056$ ) och behandling ( $p = <0,0001$ ) som förklarande faktor.

## 5.4 Groningstester - *Myrrhis odorata*

*Myrrhis odorata* hade 0% groning i samtliga behandlingar. Ingen effekt av behandlingarna kan konstateras i studien på denna art. Därför redovisas inget resultat, men möjliga anledningar till detta tas upp i diskussionen.

## 6. Diskussion

Syftet med studien var att undersöka om ultraljud och temperaturbehandlingen kan bryta frövila hos tre arter och ge upphov till högre groningen än respektive kontrollgrupp.

### 6.1 Försöket i backspegeln

Vid utförandet av tetrazoliumtestet i syfte att undersöka om fröna hade aktiv vävnad och därmed goda chanser att gro, blev utfallet att 60 % av *Medicago sativas* stickprov inte var infärgade alls. Dessa fröer var väldigt hårda att skära i med kniv och öppna upp för att undersöka infärgningen. Troligtvis hade fröna behövt punkteras för att säkerställa att tetrazoliumlösningen kunde tränga in och färga in fröet, förutsatt att aktiv vävnad fanns närvarande. Om försöket hade upprepats, skulle denna åtgärd ha genomförts för att ge ett mer tillförlitligt resultat av hur många frön som faktiskt var livsdugliga.

Bevattningen utgjorde en möjlig felkälla då de vattnades efter behov när filterpapper började torka ut och inte fick exakt samma mängd vatten. Det ansågs inte genomförbart att vattna med bestämda mängder eftersom det innebär en risk att vissa petriskålar blir vattendränkta.

Huruvida försöket var i behov av en blockuppdelning är inte helt entydigt. För arten *Lathyrus japonicus* fanns ingen blockeffekt medan de statistiska testerna visade en viss blockeffekt för *Medicago sativa*. Frågan är vad blockeffekten berodde på. Baserat på fördelningen av behandlingar inom blocken (Figur 7-9) menar jag att den mest troliga förklaringen är att den är obalanserad snarare än en faktisk blockeffekt. Fördelningen inom *Medicago sativa* var något mer obalanserad än *Lathyrus japonicus*. I framtiden kan det finnas en poäng med att använda fullständigt balanserade blockförsök för att inte dra felaktigt slutsatser om en eventuell blockeffekt.

Eftersom avgränsningen gjordes att endast bedöma fröna som grodd/ icke-grodd går det inte att uttala sig om eventuell negativ effekt på kvaliteten av groddarna.

Vissa *Medicago sativa* frön kom ut med hjärtbladen först, vilket enligt ISTA:s evaluerings protokoll (2009) klassas som icke-normal. Det tyder det på att alla som i studien klassas som grodda möjligen inte hade klarat den standarden som ISTA (2009) har. Inte heller här gjordes någon systematisk genomgång.

## 6.2 Temperaturbehandlingen

För att besvara frågeställningen om temperaturbehandlingen har haft en effekt på arterna, visar resultatet hos både *Lathyrus japonicus* och *Medicago sativa* förbättrad groning jämfört med respektive kontrollgrupp. Groningsresultatet för *Lathyrus japonicus* blev högt (89,6%) och det finns därför anledning för NordGen att uppdatera groningsprotokollet med behandlingen. För *Medicago sativa* var resultatet signifikant bättre än kontrollgrupp, men 41,4% är fortfarande långt ifrån ett högt resultat. Det är en lovande metod men behöver jämföras med resultatet från NordGens nuvarande metod. Eventuellt hade resultatet blivit högre om arten hade fått gro lika länge i inkubator som de övriga arterna, 28 dagar i stället för 14. Behandlingarna på *Medicago sativa* utfördes på nytt eftersom fröna torkade ut och troligtvis dog den första omgången.

Det kan också finnas ett samband mellan resultatet i tetrazoliumtestet (figur 10) och resultatet från groningstestet (figur 15). De 60% av fröna som inte infärgades i tetrazoliumtestet kan ha varit döda och därmed en möjlig förklaring till att groningstesterna inte resulterade i högre groning än 41,4% för temperaturbehandlingen.

Det är också möjligt att accessionen *Medicago sativa* hade en liknande frövila som Wang et al. (2023) rapporterat om. Det vill säga en variation av *typ* av frövila inom samma population, där en del saknar frövila, en andel uppvisar fysisk frövila och vissa har en kombinerad form av frövila. Utifrån denna studie går det inte att säga vilken frövila behandlingen påverkade och kanske hade den en påverkan på groningen hos frön utan frövila. Intressant hade såklart varit att rispa fröna efteråt för att undersöka hur många som var döda och hur många där behandlingen inte lyckats bryta frövilan. Det finns anledning att experimentera med fler metoder för

denna art och troligtvis behöver *Medicago sativa* något ytterligare i behandlingsväg för att bryta frövilan.

Temperaturbehandlingsresultat hos de olika arterna, besvarar frågeställningen om eventuella artberoende skillnader i respons på behandling. Medan de har haft en positiv effekt på groningen hos *Medicago sativa* och *Lathyrus japonicus*, gav de ingen effekt hos *Myrrhis odorata*. Resultatet är i linje med rekommendationen från Tiriyaki & Topu (2014) som menar att det finns goda chanser att behandlingen fungerar på fler arter inom just familjen *Fabaceae* med fysisk frövila, vilket både *Lathyrus japonicus* och *Medicago sativa* har medan *Myrrhis odorata* i stället har ett underutvecklat embryo.

### 6.3 Ultraljud

Ingen tydlig skillnad gick att utröna mellan kontrollgruppen och de som fått behandling i ultraljudsbad hos någon art. Flera undersökningar (Nazari et al., 2014; Chiu, 2015; Sharififar et al., 2015; Venâncio & Martins, 2019) har visat att ultraljud kan förbättra groningen hos arter tillhörande samma familj som de som undersöks i denna studie. Exempelvis försöket på den närliggande släktingen till *Medicago sativa*, *Medicago scutellata* som uppnådde god effekt på groningen med 96,66% och signifikant skild från kontroll med en behandlingstid på 7 minuter (Nazari et al., 2014). Frågan är om ultraljudsmetoden inte har någon påverkan på arterna i studien eller om det finns brister i tillvägagångssättet. Möjligtvis är metodologin i försöket inte är förfinad exempelvis vad gäller typ av ultraljud, frekvens och hur man kan säkerställa att fröna 'träffas' av kavitationsbubblorna.

Enligt Nogueira et al. (2024) krävs en intensitet på över 10 W/cm<sup>2</sup> för att inducera kollapsen av mikrobubblorna som ska ha en mekanisk påverkan på fröskalet. I föreliggande studie uppgick endast ultraljudintensiteten till 0,41 W/cm<sup>2</sup> (50 W fördelat över en yta på 11 cm x 11 cm). Det är därför möjligt att mikrobubblorna inte nådde den kollapsfas som krävs för att utöva de mekaniska

skador som tidigare studier har dokumenterat (López-Ribera & Vicient, 2017; Nogueira et al., 2024).

Ingen signifikant skillnad noterades mellan ultraljudets olika behandlingstider hos någon av de undersökta arterna. Frågeställningen om behandlingstidens effekt besvaras därför negativt, i denna studie hade behandlingstid ingen mätbar inverkan på groningen. Hos arten *Lathyrus japonicus* var det visserligen inledningsvis en signifikant skillnad ( $p = 0,0163$ ) i groningen hos 'ultraljud 60 min' jämfört med kontrollgruppen i den generaliserade linjära modellen, men uteblev vid den multipla jämförelsen. Det hade varit intressant att testa ännu längre behandlingstider för att se om skillnaden blivit tydligare.

Någon uppenbar negativ effekt på groningen kan inte konstateras i någon av behandlingarna, förutom den längsta tiden hos *Medicago sativa* (12 minuter). Behandlingen resulterade i något lägre groning (11,6%) än respektive kontrollgrupp (14,4%), dock inte signifikant lägre. Nazari et al. (2014) visade att längre behandlingstider på 9 minuter drastiskt försämrade groningsresultat jämfört med 7 minuter hos den närliggande släktingen *Medicago scutellata*. Möjligtvis har längre behandlingstider i ultraljudet för *Medicago sativa* en negativ effekt på fröna.

En inneboende aspekt av att nyttja ultraljudsbadet som metod (Ultrasons 1L, J.P. SELECTA s.a.) är att temperaturen stiger eftersom det alstrar energi och värme (Ensminger, 2008). *Lathyrus japonicus* hade en väldigt lång behandlingstid och därmed inte särskilt förvånande att också temperaturen stiger när ultraljudet har längre tid på sig att alstra denna energi och värme. Likväl är det något som potentiellt påverkar fröna eftersom temperatur kan fungera som en yttre signal för fröet (Baskin & Baskin, 2004). Även om det inte var en felkälla som kunde ha undvikas inom ramen för försöksupplägget, kan det ändå ha påverkat resultatet och möjligen bidragit till att behandlingen 'ultraljud 60 min' resulterande i högre groning än de andra ultraljudsbehandlingar hos *Lathyrus japonicus*.



## 6.4 Myrrhis odorata

Av denna art var det ingen groning hos någon av behandlingarna eller kontrollgruppen. Baserat på tidigare studier (Lhotská, 1977) och NordGens egen erfarenhet är det inte särskilt förvånande då groningen vanligen kommer i gång först i gång efter cirka 50–80 dagar. NordGens frölaboratorium vittnar om liknande tidsåtgång. I detta experiment på grund av snäv tidsram hann de endast vara inne i 28 dagar. Det är därför en relativt kort tid att dra slutsatser om att behandlingarna, då inget frö från kontrollen grodde heller. Men uppenbart är att behandlingarna inte lyckades bryta frövilan och hinna gro på 28 dagar.

Ultraljudsbehandlingen och temperaturbehandlingen på *Myrrhis odorata* var lite av en chansning, en av de få studier som hittades på just den arten handlar om kalla och alternerande temperaturer, med lång inkubationstid för groningstesterna. Sharififar et al. (2015) utförde ultraljudsbehandling på en art i samma växtfamilj, *Cuminum cyminum* och fann en signifikant effekt av ultraljudsbehandlingen på 7 minuter med 80% groning jämför med kontroll på 40%. Samtidigt visade Fateh et al. (2012) på hur ultraljudsbehandling på en annan släkting *Foeniculum vulgare* resulterade i sämre groning än kontrollgrupp och ju längre tid de var i ultraljudsbadet desto lägre groning. Ultraljudsbehandlingen är kanske inte lämplig för alla arter. Om testen utfördes på nytt, kan det vara en idé att lägga till köldperioden enligt NordGens standardprotokoll på 57 dagar, och placera ultraljudsbehandlingen *efter*. I syfte att undersöka om groningen kunde påskyndas jämfört med de cirka 50 dagar de tar innan fröna börjar gro (Lhotská, 1977), vilket ofta innebär mögeltillväxt. Eftersom *Myrrhis odorata* har ett underutvecklat embryo verkar det fortfarande behöva längre tid och temperaturbehandling som tillåter det att utvecklas.

## 7. Slutsats

Temperaturbehandling genom djupfrysning vid  $-80^{\circ}\text{C}$  i 24 timmar med efterföljande varmvattenbehandling  $90^{\circ}\text{C}$  gav ett signifikant och högt groningsresultat hos *Lathyrus japonicus* på 89,5% jämfört med kontrollgruppens 7%. Även hos *Medicago sativa* hade temperaturbehandlingen en signifikant effekt på groningen, 41,4% jämfört med 14,4% hos kontrollgruppen.

Ultraljudsbehandlingen visade ingen signifikant effekt i groningstesterna hos någon av arterna. Inget frö i någon behandlingsgrupp av arten *Myrrhis odorata* grodde, och ingen effekt av behandlingarna kunde påvisas.

# Referenser

- Aronsson, M., Black-Samuelsson, S., Edqvist, M., Persson, E., Ståhlberg, D. & Weibull, J. (2012). Kulturväxtsläktingar: något att bry sig om. *Svensk botanisk tidskrift*. p.309
- Baskin, C.C. & Baskin, J.M. (2014). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. 2nd edition. Elsevier/AP.
- Baskin, J.M. & Baskin, C.C. (2004). Baskin, J.M. & Baskin, C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed science*, 2004 (14 (1)), 1-16. <https://doi.org/10.1079/SSR2003150>.
- Baskin, J.M., Baskin, C.C. & Li, X. (2000). Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, 15 (2), 139–152. <https://doi.org/10.1046/j.1442-1984.2000.00034.x>
- Carlson-Nilsson, U. & Aloisi, K. (2022). Cultivation Manual: Medicinal and Aromatic Plants in the Nordic and Baltic Region. *Nordiska ministerrådet, Nordisk Genressourcecenter (NordGen)*. urn:nbn:se:norden:org:diva-12490
- Chiu, K.Y. (2015). Ultrasonication-enhanced seed germination and microbial safety of sprouts produced from selected crop species. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88 (1). <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2015.088.017>
- Dempewolf, H., Baute, G., Anderson, J., Kilian, B., Smith, C. & Guarino, L. (2017). Past and Future Use of Wild Relatives in Crop Breeding. *Crop Science*, 57 (3), 1070–1082. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.10.0885>
- Díaz-García, G., Enciso-Maldonado, G.A., Díaz-García, L.A., Legaria-Solano, J.P., Bamberg, J. & Lozoya-Saldaña, H. (2024). Field Screening of *Solanum demissum* Confirms its late Blight Resistance in the Toluca Valley, Mexico. *American Journal of Potato Research*, 101 (2), 122–131. <https://doi.org/10.1007/s12230-024-09945-7>
- Elias, S.G. (red.) (2012). *Seed testing: principles and practices*. Michigan State University Press.
- Ensminger, D. (2008). *Ultrasonics: Data, Equations and Their Practical Uses*. 1st ed. Taylor & Francis Group.
- FAO (red.) (2016). *Climate change, agriculture and food security*. FAO. (The state of food and agriculture; 2016)
- Fateh, E., Noroozi, H., Farbod, M. & Gerami, F. (u.å.). Assessment of Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed germination characteristics as influenced by ultrasonic waves and magnetic water. *European Journal of Experimental Biology*, 2012, 2 (3), 662–666
- Fitzgerald, H., Palmé, A., Asdal, Å., Endresen, D., Kiviharju, E., Lund, B., Rasmussen, M., Thorbjörnsson, H. & Weibull, J. (2019). A regional

- approach to Nordic crop wild relative *in situ* conservation planning. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 17 (2), 196–207.  
<https://doi.org/10.1017/S147926211800059X>
- Ford-Lloyd BV, Schmidt M, Armstrong SJ, Barazani O, Engels J, Hadas R, Hammer K, Kell S, Kang D, Khoshbakht K, Li Y, Long C, Lu B, Ma K, Nguyen VT, Qiu L, Ge S, Wei W, & Zhang Z and Maxted N (2011). Crop Wild Relatives—Undervalued, Underutilized and under Threat? *BioScience*, 61 (7), 559–565. <https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.7.10>
- Hamley, D.H. (1932). Softening of the seeds of *Melilotus alba*. *Botanical Gazette*, 1932 (93), 345–375
- Huang, S., Ashraf, U., Duan, M., Ren, Y., Xing, P., Yan, Z. & Tang, X. (2024). Ultrasonic seed treatment improved seed germination, growth, and yield of rice by modulating associated physio-biochemical mechanisms. *Ultrasonics Sonochemistry*, 104, 106821.  
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106821>
- ISTA (2009). ISTA Handbook on Seedling Evaluation. *ISTA Germination Committee*. Third edition with amendments 2009. The International Seed Testing Association (ISTA).
- ISTA (2011). ISTA Working Sheets on Tetrazolium testing. 1st edition 2003 including supplements 2013 uppl. The International Seed Testing Association (ISTA).
- Jarvis, A., Lane, A. & Hijmans, R.J. (2008). The effect of climate change on crop wild relatives. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 126 (1–2), 13–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.01.013>
- Kavak, S. (2024). Ultrasonic Treatments to Enhance Seed Germination and Related Parameters. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 2024 (11(4)), 234–238
- Kwiecień, A. (2020). *Lathyrus japonicus* Groszek nadmorski 2020-07-03 04.jpg [bild]. Wikimedia Commons. Tillgänglig via:  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lathyrus\\_japonicus\\_Groszek\\_nadmorski\\_2020-07-03\\_04.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lathyrus_japonicus_Groszek_nadmorski_2020-07-03_04.jpg) [Hämtad: 20 maj 2025]. (u.å.).
- Lefnaer, S. (2016). *Medicago falcata* sl1.jpg [bild]. *Wikipedia commons*. [Wikimedia Commons].  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Medicago\\_falcata\\_sl1.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Medicago_falcata_sl1.jpg) [2025-05-20]
- Lhotská, M. (1977). Notes on the ecology of germination in *Myrrhis odorata*. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 12 (2), 209–213.  
<https://doi.org/10.1007/BF02854695>
- Loades, E., Pérez, M., Turečková, V., Tarkowská, D., Strnad, M., Seville, A., Nakabayashi, K. & Leubner-Metzger, G. (2023). Distinct hormonal and morphological control of dormancy and germination in *Chenopodium album* dimorphic seeds. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1156794.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1156794>

- López-Ribera, I. & Vicient, C.M. (2017). Use of ultrasonication to increase germination rates of *Arabidopsis* seeds. *Plant Methods*, 13 (1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0182-6>
- Moosavi, S.A., Siadat, S.A., Poshtdar, A. & Direkvand, F. (2018). Ultrasonic Assisted Seed Priming to Alleviate Aging Damages to Milk Thistle (*Silybum marianum*) Seeds. *Notulae Scientia Biologicae*, 10 (2), 275–281. <https://doi.org/10.15835/nsb10210261>
- Morrison, D. (1998). The Role of the Lens in Controlling Heat-induced Breakdown of Testa-imposed Dormancy in Native Australian Legumes. *Annals of Botany*, 82 (1), 35–40. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0640>
- Mossberg, B. (2003). *Den nya nordiska floran*. Wahlström & Widstrand.
- Nazari, M., Sharififar, A. & Asghari, H.R. (2014). Medicago Scutellata Seed Dormancy Breaking by Ultrasonic Waves. *Plant breeding and seed science*, 69 (1), 15–24. <https://doi.org/10.1515/plass-2015-0002>.
- Nogueira, A., Puga, H., Gerós, H. & Teixeira, A. (2024). Seed germination and seedling development assisted by ultrasound: gaps and future research directions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104 (2), 583–597. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12994>
- NordGen (2024). Vårt arbete. <https://www.nordgen.org/sv/vart-arbete/>
- Sharififar, A., Nazari, M. & Asghari, H.R. (2015). Effect of ultrasonic waves on seed germination of *Atriplex lentiformis*, *Cuminum cyminum*, and *Zygophyllum eurypterum*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2 (3), 102–104. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.05.003>
- SLU, A. (u.å.). SLU Artdatabanken (2025). Artfakta: spansk körvel (*Myrrhis odorata*). <https://artfakta.se/taxa/223349> [2025-04-25]. *Spansk körvel*. [2025-04-25]
- SLU Artdatabanken, A. (u.å.). Artfakta: spansk körvel (*Myrrhis odorata*). <https://artfakta.se/taxa/223349> [2025-04-29]
- Sundgren, L. (2017). *Vildvuxet: mat och huskurer från naturen*. Bonnier Fakta.
- Tuan, P.A., Kumar, R., Rehal, P.K., Toora, P.K. & Ayele, B.T. (2018). Molecular Mechanisms Underlying Absciscic Acid/Gibberellin Balance in the Control of Seed Dormancy and Germination in Cereals. *Frontiers in Plant Science*, 9, 668. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00668>
- Tyler, T. & Lundquist, K. (2007). *Floran i Skåne: arterna och deras utbredning*. Lunds botaniska förening.
- Venâncio, R.S.D.S. & Martins, A.C.G. (2019). Overcoming dormancy of *Senna multijuga* seeds with an ultrasonic probe the comparison with ultrasound and sulfuric acid baths. *Ciência Rural*, 49 (9), e20180904. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180904>

- Wang, X., Zhang, H., Song, R., Sun, M., Liu, P., Tian, P., Mao, P. & Jia, S. (2023). Multiple omics datasets reveal significant physical and physiological dormancy in alfalfa hard seeds identified by multispectral imaging analysis. *The Crop journal*, 2023 (11), 1458-1468. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2023.03.003>
- Yaldagard, M., Mortazavi, S. & Tabatabaie, F. (2008). Influence of ultrasonic stimulation on the germination of barley seed and its alpha-amylase activity. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7 (No. 14)
- Yoshida, K., Schuenemann, V.J., Cano, L.M., Pais, M., Mishra, B., Sharma, R., Lanz, C., Martin, F.N., Kamoun, S., Krause, J., Thines, M., Weigel, D. & Burbano, H.A. (2013). The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *eLife*, 2, e00731. <https://doi.org/10.7554/eLife.00731>
- Zeng, L.W., Cocks, P.S., Kailis, S.G. & Kuo, J. (2005). The role of fractures and lipids in the seed coat in the loss of hardseededness of six Mediterranean legume species. *The Journal of Agricultural Science*, 143 (1), 43–55. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005034>.

## Tack

Jag vill rikta ett stort tack till NordGens frölaboratorium för gott samarbete, engagemang och stöd under arbetets gång. Tack till Johan Axelsson för hjälp med försöksupplägg och idéarbete och till Sofia Johansson för allt praktiskt stöd under experimentet, inte minst när det gällde att lista ut hur man genomför ett vetenskapligt försök med det nyinköpta ultraljudsbadet. Ett varmt tack också till Anna Palmé för råd kring skrivande och litteratur och till hela NordGens personal för fikastunderna. Jag vill tacka Jan-Eric Englund för värdefulla synpunkter på den statistiska analysen och slutligen, stort tack till min handledare Salla Marttila för kloka råd och stöttning under processens gång.



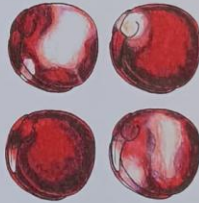


# Bilaga 1

ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing, Vol. I 1<sup>st</sup> Edition, 2003

|                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>1. Species / Genus</p> <p>2. Instruments</p> <p>3. Pretreatment</p> <p>4. Preparation before staining</p> <p>5. Staining</p> <p>6. Preparation for evaluation</p> <p>7. Evaluation (maximum area of unstained, flaccid and/or necrotic tissue permitted)</p> <p>8. Remarks</p> | <p><i>Lathyrus</i>, Fabaceae; Vetchling, Platterbse</p> <p>Seed tissue (longitudinal section)</p> <p>Beakers (4 x 50 ml), razor blades, dissecting needle, dissecting needle (lancet tip), scalpel, filter paper, forceps, support for evaluation, binocular</p> <p>Soak 18 hours between wet paper at 20°C</p> <p>Not necessary (only if there are hard coated seeds)</p> <p>6 hours, 30°C, 1,0 % TZ-solution</p> <p>Remove seed coat to expose embryo</p> <p>½ radicle, measured from the radicle tip, ½ distal area of cotyledons (opposite of the root)</p> <p>If the viability of hard seeds is to be determined, the seed coat can be incised at distal end of cotyledons and soaked between wet paper (18 hours)</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Fig. 1: Preparation step (s) Fig. 2: Evaluation, examples of non-viable seeds

*Lathyrus*

## 1. Species / Genus

**Medicago**, Fabaceae; Medick, Schneckenklee, Luzerne

Seed tissue (lateral view)

## 2. Instruments

Beakers (4 x 50 ml), razorblades, dissecting needle, dissecting needle (lancet tip), scalpel, filter paper, forceps, support for evaluation, binocular

## 3. Pretreatment

Soak 18 hours in water at 20°C

## 4. Preparation before staining

Leave seed intact

## 5. Staining

18 hours, 30°C, 1,0 % TZ-solution

## 6. Preparation for evaluation

Remove seed coat to expose embryo

## 7. Evaluation (maximum area of unstained, flaccid or necrotic tissue permitted)

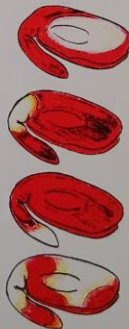
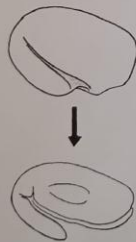
 $\frac{1}{2}$  radicle, measured from the radicle tip,  $\frac{1}{2}$  distal area of cotyledons,  $\frac{1}{2}$  if superficial

## 8. Remarks

If the viability of hard seeds is to be determined, the seed coat can be incised at distal end of cotyledons and soaked in water (4 hours)

Fig. 1: Preparation step (s)

Fig. 2: Evaluation, examples of non-viable seeds



Medicago

## 1. Species / Genus

*Anethum graveolens*, Apiaceae; Dill, Dill

Seed tissue (lateral view)

## 2. Instruments

Beakers (4 x 50 ml), little bowl, razorblades, dissecting needle, dissecting needle (lancet tip), scalpel, support for preparation (rubber), filter paper, forceps, support for evaluation, binocular

## 3. Pretreatment

Soak 18 hours in water at 20°C

## 4. Preparation before staining

Cut longitudinally through  $\frac{1}{2}$  of endosperm at the distal end

## 5. Staining

18 hours, 30°C, 1.0 % TZ-solution

## 6. Preparation for evaluation

Spread into two halves and observe cut surface of embryo and endosperm

## 7. Evaluation (maximum area of unstained, flaccid and/or necrotic tissue permitted)

None

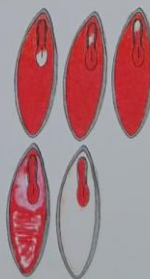
## 8. Remarks

None

Fig. 1: Preparation step (s)



Fig. 2: Evaluation, examples of non-viable seeds

*Anethum graveolens*

## Bilaga 2

### **Recept Tetrazoliumlösning:**

Lösning 1:

9,078 gram Kaliumdivätefosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) löses i 1 liter avjoniserat vatten.

Lösning 2:

11,876 gram Dinatriumvätefosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) löses i 1 liter avjoniserat vatten.

Buffrad lösning:

200 ml av lösning 1 och 300 ml av lösning 2 blandas

Tillsätt 5 gram tetrazoliumsalt (2.3.5 Trifenyltetrazoliumklorid)

## Bilaga 3

### *Lathyrus japonicus*:

```
> data$tr <- relevel(factor(dat$tr), ref = "E")
> mod2 <- glm(cbind(x, n - x) ~ tr + bl, data = dat, family =
"binomial")
Call:
glm(formula = cbind(x, n - x) ~ tr + bl, family = "binomial",
    data = data)
Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -2.47638    0.27153  -9.120  <2e-16 ***
trA          0.06810    0.30703   0.222   0.8245
trB          0.28330    0.29042   0.975   0.3293
trC          0.66819    0.27813   2.402   0.0163 *
trD          4.63541    0.29076  15.943  <2e-16 ***
blb          0.20956    0.24083   0.870   0.3842
blc         -0.19952    0.25097  -0.795   0.4266
bld         -0.02331    0.24949  -0.093   0.9256
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 785.970  on 29  degrees of freedom
Residual deviance:  35.963  on 22  degrees of freedom
AIC: 148.3

Number of Fisher Scoring iterations: 4

> anova(mod2)
Analysis of Deviance Table

Model: binomial, link: logit
Response: cbind(x, n - x)
Terms added sequentially (first to last)

      Df Deviance Resid. Df Resid. Dev Pr(>Chi)
NULL                                29      785.97
tr      4      747.39          25      38.58  <2e-16 ***
bl      3        2.62          22      35.96   0.4537
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> emmeans(mod2, pairwise ~ tr, type = "response")
$emmeans
      tr      prob      SE    df asymp.LCL asymp.UCL
E  0.0773 0.0154 Inf    0.0520      0.113
A  0.0823 0.0162 Inf    0.0556      0.120
B  0.1001 0.0176 Inf    0.0705      0.140
C  0.1405 0.0205 Inf    0.1048      0.186
D  0.8962 0.0186 Inf    0.8537      0.927
```

Results are averaged over the levels of: bl  
Confidence level used: 0.95  
Intervals are back-transformed from the logit scale

```
$contrasts
contrast odds.ratio      SE  df null z.ratio p.value
E / A      0.9342 0.28700 Inf    1 -0.222 0.9995
E / B      0.7533 0.21900 Inf    1 -0.975 0.8664
E / C      0.5126 0.14300 Inf    1 -2.402 0.1146
E / D      0.0097 0.00282 Inf    1 -15.943 <.0001
A / B      0.8064 0.23400 Inf    1 -0.742 0.9466
A / C      0.5488 0.14900 Inf    1 -2.210 0.1759
A / D      0.0104 0.00306 Inf    1 -15.521 <.0001
B / C      0.6805 0.17600 Inf    1 -1.485 0.5720
B / D      0.0129 0.00362 Inf    1 -15.504 <.0001
C / D      0.0189 0.00500 Inf    1 -15.028 <.0001
```

Results are averaged over the levels of: bl  
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5  
estimates  
Tests are performed on the log odds ratio scale

```
> cld(emmeans(mod2, ~ tr, type = "response"), Letters = letters)
tr  prob      SE  df asymp.LCL asymp.UCL .group
E   0.0773 0.0154 Inf    0.0520    0.113  a
A   0.0823 0.0162 Inf    0.0556    0.120  a
B   0.1001 0.0176 Inf    0.0705    0.140  a
C   0.1405 0.0205 Inf    0.1048    0.186  a
D   0.8962 0.0186 Inf    0.8537    0.927  b
```

### *Medicago sativa:*

```
> dat1$tr <- relevel(factor(dat1$tr), ref = "E")
> mod3 <- glm(cbind(x, n - x) ~ tr + bl, dat1, family =
"binomial")
```

Call:  
glm(formula = cbind(x, n - x) ~ tr + bl, family = "binomial",  
data = dat1)

```
Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -2.14144      0.20767 -10.312 < 2e-16 ***
trA           0.05951      0.22565   0.264 0.791990
trB           0.02833      0.21919   0.129 0.897160
trC          -0.25240      0.23477  -1.075 0.282336
trD           1.43087      0.18879   7.579 3.48e-14 ***
blb           0.20534      0.20301   1.011 0.311800
blc           0.49701      0.19493   2.550 0.010784 *
bld           0.74317      0.19159   3.879 0.000105 ***
---
```

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 168.331 on 29 degrees of freedom  
Residual deviance: 27.829 on 22 degrees of freedom

AIC: 158.68

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```
> anova(mod3)
```

Analysis of Deviance Table

Model: binomial, link: logit

Response: cbind(x, n - x)

Terms added sequentially (first to last)

|      | Df | Deviance | Resid. Df | Resid. Dev | Pr(>Chi)      |
|------|----|----------|-----------|------------|---------------|
| NULL |    |          | 29        | 168.331    |               |
| tr   | 4  | 123.014  | 25        | 45.317     | < 2.2e-16 *** |
| bl   | 3  | 17.488   | 22        | 27.829     | 0.0005609 *** |

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> emmeans(mod3, pairwise ~ tr, type = "response")
```

\$emmeans

| tr | prob  | SE     | df  | asympt.LCL | asympt.UCL |
|----|-------|--------|-----|------------|------------|
| E  | 0.144 | 0.0188 | Inf | 0.1112     | 0.185      |
| A  | 0.152 | 0.0212 | Inf | 0.1148     | 0.198      |
| B  | 0.148 | 0.0196 | Inf | 0.1134     | 0.190      |
| C  | 0.116 | 0.0181 | Inf | 0.0848     | 0.156      |
| D  | 0.414 | 0.0285 | Inf | 0.3591     | 0.470      |

Results are averaged over the levels of: bl

Confidence level used: 0.95

Intervals are back-transformed from the logit scale

\$contrasts

| contrast | odds.ratio | SE     | df  | null | z.ratio | p.value |
|----------|------------|--------|-----|------|---------|---------|
| E / A    | 0.942      | 0.2130 | Inf | 1    | -0.264  | 0.9989  |
| E / B    | 0.972      | 0.2130 | Inf | 1    | -0.129  | 0.9999  |
| E / C    | 1.287      | 0.3020 | Inf | 1    | 1.075   | 0.8194  |
| E / D    | 0.239      | 0.0451 | Inf | 1    | -7.579  | <.0001  |
| A / B    | 1.032      | 0.2330 | Inf | 1    | 0.138   | 0.9999  |
| A / C    | 1.366      | 0.3340 | Inf | 1    | 1.275   | 0.7068  |
| A / D    | 0.254      | 0.0515 | Inf | 1    | -6.755  | <.0001  |
| B / C    | 1.324      | 0.3100 | Inf | 1    | 1.200   | 0.7514  |
| B / D    | 0.246      | 0.0482 | Inf | 1    | -7.154  | <.0001  |
| C / D    | 0.186      | 0.0397 | Inf | 1    | -7.881  | <.0001  |

Results are averaged over the levels of: bl

P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates

Tests are performed on the log odds ratio scale

```
> cld(emmeans(mod3, ~ tr, type = "response"), Letters = letters)
```

| tr | prob  | SE     | df  | asympt.LCL | asympt.UCL | .group |
|----|-------|--------|-----|------------|------------|--------|
| C  | 0.116 | 0.0181 | Inf | 0.0848     | 0.156      | a      |
| E  | 0.144 | 0.0188 | Inf | 0.1112     | 0.185      | a      |
| B  | 0.148 | 0.0196 | Inf | 0.1134     | 0.190      | a      |
| A  | 0.152 | 0.0212 | Inf | 0.1148     | 0.198      | a      |
| D  | 0.414 | 0.0285 | Inf | 0.3591     | 0.470      | b      |





## Bilaga 4

Rådata. Slutavläsning groningstester efter 28 dagar, *Lathyrus japonicus*

| x  | n  | tr               | bl |
|----|----|------------------|----|
| 1  | 49 | Ultraljud 2 min  | a  |
| 6  | 50 | Ultraljud 2 min  | d  |
| 5  | 50 | Ultraljud 2 min  | c  |
| 6  | 50 | Ultraljud 2 min  | b  |
| 4  | 49 | Ultraljud 2 min  | c  |
| 2  | 50 | Ultraljud 2 min  | a  |
| 3  | 50 | Ultraljud 30 min | a  |
| 3  | 50 | Ultraljud 30 min | c  |
| 6  | 50 | Ultraljud 30 min | b  |
| 6  | 50 | Ultraljud 30 min | d  |
| 6  | 50 | Ultraljud 30 min | d  |
| 6  | 49 | Ultraljud 30 min | a  |
| 5  | 50 | Ultraljud 60 min | d  |
| 3  | 48 | Ultraljud 60 min | c  |
| 12 | 50 | Ultraljud 60 min | b  |
| 11 | 50 | Ultraljud 60 min | a  |
| 8  | 50 | Ultraljud 60 min | c  |
| 2  | 50 | Ultraljud 60 min | a  |
| 46 | 50 | Temp. Beh.       | b  |
| 40 | 47 | Temp. Beh.       | c  |
| 46 | 50 | Temp. Beh.       | b  |
| 43 | 50 | Temp. Beh.       | d  |
| 44 | 50 | Temp. Beh.       | b  |
| 48 | 49 | Temp. Beh.       | a  |
| 7  | 50 | Kontroll         | a  |
| 1  | 51 | Kontroll         | b  |

|   |    |          |   |
|---|----|----------|---|
| 4 | 50 | Kontroll | c |
| 3 | 49 | Kontroll | d |
| 5 | 49 | Kontroll | b |
| 4 | 50 | Kontroll | d |

Rådata. Slutavläsning groningenster efter 16 dagar, *Medicago sativa*

| x  | n  | tr               | bl |
|----|----|------------------|----|
| 10 | 53 | Ultraljud 2 min  | c  |
| 5  | 54 | Ultraljud 2 min  | a  |
| 6  | 56 | Ultraljud 2 min  | a  |
| 7  | 53 | Ultraljud 2 min  | a  |
| 9  | 53 | Ultraljud 2 min  | d  |
| 8  | 52 | Ultraljud 2 min  | b  |
| 13 | 57 | Ultraljud 7 min  | d  |
| 7  | 59 | Ultraljud 7 min  | c  |
| 9  | 62 | Ultraljud 7 min  | a  |
| 4  | 52 | Ultraljud 7 min  | a  |
| 9  | 61 | Ultraljud 7 min  | b  |
| 7  | 58 | Ultraljud 7 min  | b  |
| 5  | 53 | Ultraljud 12 min | b  |
| 10 | 60 | Ultraljud 12 min | d  |
| 5  | 52 | Ultraljud 12 min | a  |
| 4  | 64 | Ultraljud 12 min | b  |
| 6  | 55 | Ultraljud 12 min | b  |
| 8  | 51 | Ultraljud 12 min | c  |
| 32 | 48 | Temp. Beh.       | c  |
| 22 | 42 | Temp. Beh.       | d  |
| 16 | 53 | Temp. Beh.       | c  |
| 30 | 54 | Temp. Beh.       | d  |

|    |    |            |   |
|----|----|------------|---|
| 17 | 60 | Temp. Beh. | a |
| 17 | 54 | Temp. Beh. | b |
| 6  | 62 | Kontroll   | c |
| 8  | 62 | Kontroll   | a |
| 11 | 58 | Kontroll   | c |
| 11 | 56 | Kontroll   | b |
| 8  | 54 | Kontroll   | d |
| 10 | 52 | Kontroll   | d |

## Publicering och arkivering

JA, jag, **Elin Sebyhed** har läst och godkänner avtalet för publicering samt den personuppgiftsbehandling som sker i samband med detta

# Signature page

This document has been electronically signed  
using eduSign.

eduSign