

# **Schlussbericht über das Projekt: Homogenitätsprüfung bei Grassaatgutmischungen im Hinblick auf eine Standardisierung**

**Prof. Dr. M. Kruse und C. Reinhardt, Universität Hohenheim 350D**

Dieser Schlussbericht enthält eine Darstellung der im Abrechnungszeitraum durchgeführten Maßnahmen und der erzielten Ergebnisse. Die Gliederung erfolgt entsprechend der im Antrag aufgeführten Teilprojekte.

## **1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens**

Das **Ziel** des Vorhabens ist die Erstellung und Validierung einer wissenschaftlich begründeten Verfahrensvorschrift zur Beprobung von Saatgutmischungen im Rahmen der amtlichen Saatgutverkehrskontrolle. Die erarbeitete Verfahrensvorschrift soll sowohl in die Internationalen Vorschriften für die Prüfung von Saatgut der ISTA als auch in die Methodensammlungen der an der Saatgutverkehrskontrolle beteiligten Dienststellen aufgenommen werden.

Die sich aus diesem Ziel ergebenden **Aufgabenstellungen** sind:

1. Erstellen einer Übersicht über die in Deutschland gehandelten Saatgutmischungen, deren Zusammensetzung und Konfektionierung und Auswahl typischer Mischungen
2. Bestimmung der Inhomogenität der unter guter fachlicher Praxis produzierten typischen Saatgutmischungen
3. Bestimmung geeigneter Methoden für die Beprobung und die Probenreduktion bei Saatgutmischungen
4. Auswertung der Ergebnisse und Erstellung eines Methodenentwurfs
5. Einbringen des Methodenentwurfs in die Gremien der ISTA zur Aufnahme in die ISTA Vorschriften.

## 1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Folgende Arbeitsabschnitte wurden geplant:

1. Erstellung von Übersichten zu den in den Wirtschaftsjahren 2005/06 und 2006/07 zugelassenen Mischungsbetrieben, zu den Verfahren der Erstellung von Saatgutmischungen und Parteeigenschaften zur Ermittlung repräsentativer Typen von Saatgutmischungen.
2. Auswahl von etwa 25 repräsentativen Saatgutmischungspartien und deren Beprobung mit etwa 20 Erstproben, die getrennt voneinander hinsichtlich der wichtigen Saatgutbeschaffenheitsmerkmale untersucht werden, um die Heterogenität innerhalb der Saatgutmischungspartien zu bestimmen.
3. Entwicklung einer Bildanalyse-gestützten Schnell-Methode zur Bestimmung der Zusammensetzung von Untersuchungsproben von Grassaatgutmischungen hinsichtlich der morphologisch deutlich verschiedenen Samenarten.
4. Prüfung der für art- bzw. sortenreine Saatgutpartien verwendeten Probenahme- und Probenteilungsgeräte auf ihre Eignung für Grassaatgutmischungen.
5. Statistische Analyse der Ergebnisse der Heterogenitätsprüfungen hinsichtlich der Fließeigenschaften der Komponenten, Entmischungseffekten und Trends zur Ableitung von Bewertungsparametern für die Entwicklung eines optimierten Probenahmeplans zur Beprobung von Saatgutmischungen.
6. Erstellung einer Verfahrensvorschrift zur Probenahme bei Saatgutmischungen, insbesondere bei Grassaatgutmischungen.
7. Validierung des entwickelten Verfahrens in einer internationalen Validierungsstudie und Aufnahme der Methode in die ISTA-Vorschriften und weitere nationale oder EU Vorschriften.

Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte war wie folgt geplant:

### 1. Umfrage zu Saatgutmischungen

Ziel: Ermittlung der Anzahl und der Zusammensetzung der pro Jahr in Deutschland gehandelten Mischungen zur Auswahl repräsentativer Mischungen für die Analyse in Arbeitspaket 3.

Inhalte: Es wird eine Umfrage an die Saatgutankennungsstellen zum Inverkehrbringen von Saatgutmischungen gestartet mit dem Ziel, folgende Daten zu erheben:

- Anzahl der Mischungspartien pro Wirtschaftsjahr

- Zusammensetzungen der Mischungen (Mischungsanteile der Arten/Sorten)
- Verwendungszwecke der Mischungen
- Größe der Mischungspartien
- Packungsgröße der Mischungspartien
- Anzahl der Packungen je Mischungspartie

Diese Daten der Anerkennungsstellen aus den Wirtschaftsjahren 2005/06 und 2006/07 werden in einer gemeinsamen Datenbank zusammengefasst. Der Umfang der in Deutschland inverkehrgebrachten Saatgutmischungen wird daraus abgeleitet, insbesondere der Umfang bei den Grassaatgutmischungen. Weiterhin werden etwa 25 Mischungen identifiziert, die die Gesamtheit der Mischungen bestmöglich repräsentieren können. Die erforderliche Anzahl hängt von der Vielgestaltigkeit der Mischungen sowie von dem Untersuchungsaufwand, der sich wiederum aus der Anzahl und der Identität der Mischungskomponenten ergibt, ab.

Geplante Erledigung: April bis September 2008.

## 2. Einrichtung des optimalen Arbeitsplatzes

Ziel: Für die Untersuchung der gezogenen Mischungsproben soll ein optimierter Arbeitsplatz eingerichtet werden.

Inhalte: Die Bestimmung der Zusammensetzung der Mischungsproben erfolgt durch die klassische Trennung der Probe in die Komponenten anhand der samendiagnostischen Merkmale, wie dies in der Routine der Saatgutuntersuchung erfolgt. Diese Untersuchungstätigkeit ist das Nadelöhr des Projektes. Die optimierte Einrichtung des Arbeitsplatzes soll die Arbeitsgeschwindigkeit bei gleichbleibend hoher Arbeitsqualität sicherstellen. Es ist deshalb vorgesehen, einen Arbeitsplatz in eine vorhandene Laborbank zu integrieren. Die Arbeitsfläche soll höhenverstellbar eingerichtet werden und mit einem Lichtkasten als Diaphanoskop ausgestattet werden. Zur zusätzlichen Beleuchtung werden Kaltlichtlampen installiert. Die Untersuchung der Proben soll durch automatisierte Zuführung in einer transparenten Schüttelrinne in das Blickfeld eines Binokulars beschleunigt werden.

Die Geräte werden beschafft und der Arbeitsplatz soll mit der/dem Mitarbeiterin/Mitarbeiter zusammen ergonomisch gestaltet und mit Unterstützung der technischen Zentrale der Universität Hohenheim im Fachgebiet eingerichtet werden.

Geplante Erledigung: April bis Juni 2008

### 3. Untersuchung von Saatgutmischungen

Ziel: Ziehung von je etwa 20 Erstproben aus etwa 25 Saatgutmischungspartien sowie Ermittlung der Reinheit, des Besatzes und der Artzusammensetzung sowie der Tausendkornmasse und der Keimfähigkeit der Komponenten.

Inhalte: Die in Arbeitspaket 1 ermittelten repräsentativen Mischungen, die jährlich wieder von neuem erzeugt werden, werden im laufenden Saatgutverkehr mittels der Mischungsanträge an die Anerkennungsstellen ausfindig gemacht und beprobt. Hierbei werden von bis zu 20 Stellen je Partie Proben von mind. etwa 100 g entnommen und getrennt gehalten nach Hohenheim zur Untersuchung geschickt. Drei Verfahren werden hierfür gewählt:

1. Es sollen größere Mischungsbetriebe kontaktiert werden, bei denen dann Mitarbeiter der Anerkennungsstellen oder der Saatgutverkehrskontrollstellen die Mischungen während oder nach der Erstellung beproben.
2. Weiterhin sollen die identifizierten Mischungen im Saatgutmarkt in den konfektionierten Packungen ausfindig gemacht werden und durch Mitarbeiter der Saatgutverkehrskontrollen beprobt werden. Hierfür werden entsprechend viele Packungen angestochen oder, was wohl die Regel sein dürfte, geöffnet und von Hand beprobt werden. Die Packungen müssen dann dem Partieinhaber abgekauft werden.
3. Der wissenschaftliche Mitarbeiter des Projektes wird Mischungsbetriebe selbst aufsuchen und Mischungspartien beproben. Hierbei sollen gezielt unterschiedliche Mischungsverfahren erfasst werden, d.h. unterschiedliche Mischbehälter bzw. Zumischverfahren, die in den Mischungsbetrieben angewandt werden. Auch sollen hierbei Möglichkeiten der automatischen Beprobung solcher Mischungspartien mit den Firmen erörtert und ggf. erste Geräte eingebaut werden, die dann für weitere Beprobungen verwendet werden.

Die so gewonnenen Erstproben der Mischungspartien werden an das Fachgebiet an der Universität Hohenheim übermittelt, dort mittels Riffelteiler (18 Kanalteiler) reduziert und dann bezüglich Reinheit, Besatz, Artzusammensetzung, Tausendkornmasse und Keimfähigkeit untersucht. Die Ergebnisse werden in einer Datenbank zusammengetragen.

Bei der Untersuchung kann, sofern erfolgreich etabliert, die bildanalyse-gestützte Schnellbestimmungsmethode für die Bestimmung der Artzusammensetzung verwendet werden. Hierdurch soll sich der Untersuchungsaufwand verkürzen.

Geplante Erledigung: Juli 2008 bis August 2010

#### 4. Vorbereitung und Teilnahme am ISTA Kongress

Ziel: Ein Zwischenbericht mit den Ergebnissen aus der ersten Hälfte der untersuchten Mischungsproben soll als Vortrag zum ISTA Kongress 2010 in Köln eingereicht werden.

Inhalte: Die Ergebnisse aus Arbeitspaket 3 werden zunächst ausgewertet hinsichtlich der Variation der Qualitätsmerkmale zwischen den 20 Erstproben einer Mischungspartie. Hier werden übliche Dispersionsparameter sowie die in den ISTA Vorschriften für art-reine Partien vorgesehenen H- und R-Tests angewendet. Ebenfalls werden Trendanalysen durchgeführt, um festzustellen, ob während der Herstellung einer Mischung systematische Effekte zu einer schematischen Veränderung insbes. der Mischungszusammensetzung führen. Aus diesen Ergebnissen soll dann durch Simulationen der Einfluss auf die Repräsentativität einer Einsendungsprobe, die nach dem üblichen ISTA Probenahmeplan gezogen wird, aufgezeigt werden. Hieraus soll vor allem der zu erwartende Standardfehler der Einsendungsprobe errechnet werden, der dann in die für die Saatgutuntersuchung üblichen Toleranztabellen eingerechnet werden soll. So kann unmittelbar der Einfluss der Heterogenität der Saatgutmischungspartien auf die Zuverlässigkeit der Untersuchungsergebnisse aufgezeigt werden. Zusätzlich werden die in Arbeitspaket 6 ermittelten Abweichungen durch akzeptable Probenahme und Probenteilungsverfahren in die Berechnung der Toleranztabellen einbezogen. Hierdurch werden dann alle Fehlerquellen adäquat in die Bemessung der erwarteten Zuverlässigkeit der Kontrollergebnisse von Saatgutmischungen einbezogen.

Geplante Erledigung: Januar bis Juli 2010.

#### 5. Entwicklung der Schnellbestimmungsmethode

Ziel: Entwicklung einer Methode, die mittels einer digitalen Bildaufnahme und einer Bildverarbeitungssoftware erlaubt, Mischungskomponenten mit morphologisch deutlich verschiedenen Samen eindeutig voneinander zu unterscheiden und deren Mischungsanteile zu schätzen.

Inhalte: Für die Untersuchung der Mischungsproben von etwa 3,5 g (etwa 2500 Samen) ist geplant, diese auf der Oberfläche eines Lichtkastens auszustreuen. Es ist hierfür eine DIN-A3 große Fläche erforderlich damit sich die Samen nicht

gegenseitig berühren. Die Fläche mit den Samen wird gescannt. Das einem Computer übermittelte Bild wird danach einer zu erstellenden Bildverarbeitungssoftware übergeben, die die Objekte identifiziert und ihre Größe und Gestalt quantifiziert. Anhand eines Datenbankabgleichs wird dann für jedes Objekt eine Zuordnung zu einer der deklarierten Arten vorgenommen. Mittels standardmäßig vorgegebener durchschnittlicher Tausendkornmassen der Arten bzw. Sorten werden dann die Mischungsanteile der Komponenten als Masseprozentwerte geschätzt.

Für diese Untersuchung werden insgesamt etwa 500 Proben notwendig sein, von artreinen bis hin zu Mischungen mit bis zu 7 Komponenten, die mit dieser Schnellbestimmungsmethode untersucht werden. Anschließend ist eine Nachkontrolle mit der unter Arbeitspaket 3 beschriebenen klassischen Untersuchungsmethode notwendig. Aus dem Vergleich der beiden Ergebnisse ergibt sich dann die Leistungsfähigkeit der Schnellbestimmungsmethode hinsichtlich Treffsicherheit und Reproduzierbarkeit. Wenn diese ausreichend ist, d.h. die Abweichungen bei der Schätzung der masseprozentmäßigen Zusammensetzung der Mischung etwa 5 % Abweichungen von der wahren Zusammensetzung nicht überschritten werden, kann die Methode für weitere Untersuchungen in diesem Projekt verwendet werden.

Geplante Erledigung: Juli 2008 bis März 2009

## 6. Untersuchung zur Eignung von Probenahme und Probenteilungsgeräten

Ziel: Bestimmung der für die Probenahme und –teilung von Grassaatgutmischungen geeigneten Geräte.

Inhalte: Für die Probenahme und Probenteilung sind für Saatgut nach den ISTA Vorschriften verschiedene Geräte verwendbar, deren Anwendung für artreine Ware validiert ist. Hierzu gehören beispielsweise die Nobbe-Probestecher. Dieser Stecher hat eine oval geformte Öffnung, durch das Saatgut hindurch in das Innere des Stechers gelangt und entnommen wird. Die zu klärende Frage ist, ob durch diese Öffnung bei der üblichen Handhabung des Stechers ein Selektionseffekt zugunsten der kleinsamigen, gutfließenden Mischungskomponenten und zu Ungunsten der großsamigen schwerfließenden Mischungskomponenten entsteht und wenn ja, wie groß die Öffnung und damit auch der Durchmesser des Stechers bei Grassaatgutmischungen mindestens sein muss, damit dieser Selektionseffekt vernachlässigt werden kann.

Zur Klärung dieser Frage werden mit kommerziellem, artreinem Saatgut Mischungen bekannter Zusammensetzung erstellt, abgefüllt und dann mit den verschiedenen Geräten beprobt. Vorgesehen sind der Nobbe-Probenstecher, der Stockprobenstecher sowie der Rohrprobenstecher, jeweils in verschiedenen Größen, insgesamt etwa neun verschiedene Geräte sowie die Probenahme von Hand. Die so gezogenen Proben werden dann vornehmlich mit der in Arbeitspaket 5 entwickelten Schnellbestimmungsmethode, aber auch mit der klassischen Methode nach Arbeitspaket 3 auf ihre Zusammensetzung hin untersucht und mit der bekannten wahren Zusammensetzung verglichen. Gleiches wird mit Probenteilungsgeräten durchgeführt. Hier werden etwa 100 g Proben von Mischungen mit bekannter Zusammensetzung erstellt und mittels der nach den ISTA-Vorschriften für artreine Ware zugelassenen Probenteilern (Riffelteiler, Zentrifugalteiler, Rotationsprobenteiler, Handhalbierungs- und Löffelmethode) auf eine Probengröße von etwa 5 g reduziert. Die Zusammensetzung der 5 g-Probe, die je Mischung 10fach wiederholt erstellt wird, wird dann wiederum bestimmt und mit der wahren Zusammensetzung verglichen. Insgesamt werden so etwa 15 verschiedene Geräte mit je 10 Wiederholungen an mindestens 5 verschiedenen Mischungen geprüft, so dass insgesamt etwa 750 Proben untersucht werden müssen. Die Ergebnisse werden hinsichtlich Treffsicherheit und Wiederholbarkeit ausgewertet. Bei den jeweils zuverlässigen Verfahren werden die immer noch auftretenden Abweichungen quantifiziert und in die Erstellung der Toleranztabellen in Arbeitspaket 4 einbezogen. Geplante Erledigung: Mai 2009 bis November 2010

## 7. Erstellung der Methodenvorschrift

Ziel: Formulierung eines Änderungsvorschlags für die ISTA Vorschriften.

Inhalte: Entsprechend der Vorgaben der ISTA soll eine Methodenvorschrift formuliert werden, die als Ergänzung der relevanten Kapitel der ISTA Vorschriften die Aufnahme der Mischungen in das Methodenbuch erreicht. Hier sind Änderungen von Kapitel 2 Probenahme, Kapitel 3 Reinheitsuntersuchung, Kapitel 4 Besatzuntersuchung und Kapitel 5 Toleranzen notwendig sofern nicht ein separates Kapitel für Mischungen vorzuziehen ist. Dies muss zunächst mit dem Vorsitzenden des Vorschriften-Ausschusses der ISTA geklärt werden. Die Abfassung des Textes und dessen Abstimmungsverfahren innerhalb der relevanten Ausschüsse für Probenahme und Reinheitsuntersuchung gehören zu den Aufgaben in diesem

Arbeitspaket. Die Frist für das Einreichen von Änderungsvorschlägen bei der ISTA liegt üblicherweise im November für die Aufnahme in die ISTA Vorschriften im nachfolgenden Jahr.

Geplante Erledigung: August bis November 2010

#### 8. Validierung der Methode

Ziel: Entsprechend der Vorgaben der ISTA durch das ISTA Method Validation Handbook soll in einer internationalen Validierungsstudie die entwickelte Methode validiert werden.

Inhalte: Zunächst müssen die Formalia geklärt werden, d.h. ein Projektleiter (in diesem Fall der wiss. Mitarbeiter) durch das ISTA Komitee benannt, ein Testplan erstellt und genehmigt, Gutachter benannt sowie die Teilnehmer an dieser Validierungsstudie gefunden werden. Es wird mit etwa 20 Teilnehmern auf allen Kontinenten gerechnet. Danach sind Mischungsproben für die Teilnehmer vorzubereiten, die dann mit den entsprechenden Anweisungen und Formblättern an die Teilnehmer mit der Bitte verschickt werden, die Proben mittels der in der erstellten Methode zugelassenen Probenteilern auf die Untersuchungsprobengröße zu reduzieren und die Artenzusammensetzung zu bestimmen. Die Ergebnisse werden dann nach Hohenheim übermittelt und ausgewertet. Das Ergebnis dieser Auswertung wird eine Schätzung für den experimentellen Fehler der Probenreduktion und der Untersuchungsmethode sein. Dieser experimentelle Fehler wird dann zu der in Arbeitspaket 3 ermittelten Variation der Einsendungsprobe durch die Inhomogenität der Saatgutmischungspartien hinzugezählt. Diese Summe ergibt dann die Gesamtvariation, die bei einer Internationalen Mehrfachbeprobung und der Untersuchung auftreten würde. Dieses Ergebnis fließt dann in die Erstellung der Endfassung der Methodenvorschrift ein.

Geplante Erledigung: November 2010 bis Januar 2011

#### 9. Einreichen der Methode an die ISTA

Ziel: Einreichen des erstellten Methodenvorschlags für die validierte Methode an die ISTA und Aufnahme in die ISTA Vorschriften.

Inhalte: Die Ergebnisse der Validierungsstudie aus Arbeitspaket 8 sowie die Änderungsvorschläge, die in Arbeitspaket 7 aus den technischen Ausschüssen der ISTA zu dem Entwurf der Methodenvorschrift eingingen, müssen in die



Methodenvorschrift eingearbeitet werden. Der Text ist dann in die für das Einreichen als Änderungsvorschlag notwendige Form zu überarbeiten. Gleichzeitig ist der Validierungsreport von den Gutachtern prüfen zu lassen und von den technischen Ausschüssen genehmigen zu lassen.

## 1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Probenahme bei Saatgutmischungen ist in den in der EU verbindlichen Internationalen Vorschriften für die Prüfung von Saatgut (ISTA Vorschriften) nicht enthalten. Der Ausschuss für Probenahme und Partiegrößen der ISTA, welcher für die Weiterentwicklung der Probenahme zuständig ist, hat die Probenahme von Saatgutmischungen in die langfristige Planung eingestellt. Aktuell wird aber in keinem der 72 Mitgliedsländer der ISTA an diesem Thema gearbeitet.

Die Vorschriften für die Prüfung von Saatgut der „Association of Official Seed Analysts (AOSA)“, die in den USA und in Kanada erstellt wurden, schließen zwar die Probenahme von Saatgutmischungen ein, die Regelungen zur Probenahme insgesamt sind aber hinsichtlich der Vorgaben für die Methoden und Geräte sehr viel lascher als die in der EU gültigen ISTA-Vorschriften und der spezielle Teil zu Saatgutmischungen basiert auf veralteten Daten von 1959-62. Aufgrund der zwischenzeitlich weiterentwickelten Saatgutaufbereitungs- und Saatgutmischungs-technologie sowie der unterschiedlichen Rahmenbedingungen sind diese AOSA-Vorschriften somit nicht auf EU- oder gar nationale Verhältnisse übertragbar.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen zur Probenahme bei Saatgutmischungen liegen nur sehr wenige vor. Gregoire und Barabas (2004) veröffentlichten einen in dem Softwarepaket Excel implementierten und nicht mit praktischen Daten gestützten Vorschlag zur statistischen Bewertung von Untersuchungsergebnissen zur Zusammensetzung von Saatgutmischungen. Sie gingen hierbei allerdings von einer alleinigen Zufallsstreuung der Komponenten innerhalb der Mischungspartien aus, was nach aktuellem Kenntnisstand bereits bei art- und sortenreinen Saatgutpartien von Grassaatgut eine nicht gerechtfertigte Annahme darstellt (Kruse 1999).

Wissenschaftliche Untersuchungen zur Homogenität von Grassaatgutmischungen außer der Arbeit von Miles (1963), aus der die Vorschriften der AOSA hervorgegangen sind, sind nicht bekannt. In einem Übersichtsartikel hat Coster (1993) die Homogenität von art- bzw. sortenreinen Saatgutpartien betrachtet und kam zu dem Schluss, dass vor allem bei großen Saatgutpartien von Arten mit schwer fließendem Saatgut mit deutlicher Heterogenität zu rechnen ist. Auswirkungen auf die Repräsentativität einer Einsendungsprobe hat er in seine Diskussion nicht einbezogen.

## 2. Material und Methoden

### 1. Umfrage zu Saatgutmischungen

Eine Umfrage wurde gestartet mit dem Ziel, Saatgutmischungen, die in den Wirtschaftsjahren 2005/06 und 2006/07 in Deutschland in Verkehr gebracht wurden, zu erfassen. Die Anfrage richtete sich an die Saatgutankennungsstellen der einzelnen Bundesländer und ihren Aufzeichnungen von Mischungsanträgen. Folgende Daten sollten erhoben werden:

- Anzahl der Mischungspartien pro Wirtschaftsjahr
- Anzahl der Mischungspartien pro Bundesland
- Zusammensetzungen der Mischungen (Mischungsanteile der Arten/Sorten)
- Verwendungszweck der Mischungen
- Größe der Mischungspartien
- Verpackungsgrößen

Die Kontaktaufnahme mit den einzelnen Anerkennungsstellen für landwirtschaftliches Saat- und Pflanzgut in Deutschland erfolgte zwischen Juni und August 2008. Auf dem Sommertreffen der Anerkennungsstellen in Nossen (05.06.2008) wurden die betreffenden Anerkennungsstellen um ihre Mithilfe gebeten. Alle Anerkennungsstellen, bis auf die Anerkennungsstelle für Baden-Württemberg, haben ihre Unterstützung angeboten und Mischungsanträge aus den Wirtschaftsjahren 2005/06 und 2006/07 bzw. Kalenderjahren als Kopie, Original oder Datei überlassen. Nur in Baden-Württemberg werden Mischungsanträge nicht archiviert. Eine Liste der Mischungsbetriebe wurde von der Anerkennungsstelle in Baden-Württemberg zur

Verfügung gestellt. Diese Mischungsbetriebe wurden direkt angeschrieben und um Mithilfe gebeten. Nach der Kontaktaufnahme hatte der Großteil der Mischungsbetriebe ihre archivierten Mischungsanträge zu Verfügung gestellt. Bei nur wenigen wurde die Mithilfe verweigert.

Die erfassten Mischungsanträge wurden nach den obigen Kriterien ausgewertet und in einer Datenbank gesammelt. Vor der eigentlichen Auswertung der Datenbank wurden die Datensätze noch einmal geprüft und gegebenenfalls, wenn möglich, korrigiert, und wenn nicht möglich, gelöscht. Entfernt wurden fehlerhafte Datensätze (Unstimmigkeiten in der Gesamtsumme, fehlerhafte Angaben), seltene sowie komplexe Mischungen wie Blumenmischungen oder Mischungen für Rekultivierungsmaßnahmen mit mehr als 12 Arten bzw. Sorten. Datensätze, die ausschließlich aus sehr seltenen Arten (Arten-Gruppe „Rest“) bestanden, wurden ebenfalls entfernt. Im letzten Bereinigungs-schritt wurden reine Sortenmischungen entfernt. Die Samen der einzelnen Sorten lassen sich nicht an Hand morphologischer Merkmale sicher unterscheiden. Somit können diese Mischungen während einer Reinheitsuntersuchung nicht in ihre Sorten bzw. Mischungskomponenten getrennt werden. Das Ziel, die Schwankungen von Mischungskomponenten innerhalb von Mischungspartien zu bestimmen, wird mit diesen Mischungen nicht erreicht.

Die komplexen Mischungszusammensetzungen und die zahlreichen Arten und Sorten machen eine Auswertung der Daten sehr schwierig. Für die Vereinfachung der Auswertung wurden die Arten in Arten-Gruppen zusammengefasst je nach der Möglichkeit einer Trennung an Hand morphologischer Merkmale. Diese Gruppierung diente im Wesentlichen einer besseren Überschaubarkeit und Vereinfachung der Vielfältigkeit der Mischungen. Diese Einteilung folgt ebenfalls nach der Laborpraxis bei Reinheitsuntersuchungen. Eine ähnliche Gruppierung wurde in dem ISTA/ISF Experiment on herbage seed lot size; technical protocol, Dezember 2005 durchgeführt. In diesem Experiment wurden, im Gegensatz zu diesem Projekt, nur zwei Arten-Gruppen unterschieden. Die darin vorgeschlagene Gruppierung in nur zwei Gruppen wurde ausgeweitet, um die Arten nach ihren Fließeigenschaften, der praktikablen morphologischen Trennbarkeit in einer Reinheitsuntersuchung und der Bedeutung im Handel dieser Gruppen besser zu berücksichtigen. Daraus resultierte die Einteilung in sechs Arten-Gruppen. Sehr seltene Arten wurden nur als „Rest“ (Gruppe R) definiert, die nicht weiter berücksichtigt wurden.

Die Gruppe A (großsamige Gräser) beinhaltet verschiedene großsamigen Weidelgräser und Schwingeln. Die Gruppe B beinhaltet ausschließlich die zwei Arten Rot- und Schafschwingel. Sie sind von ihrer morphologischen Eigenschaften von der Gruppe A trennbar, sind aber in ihrer Form und Größe der Arten in Gruppe A sehr ähnlich. Die Gruppe C beinhaltet alle Rispengräser. Diese sind in der Samengröße wesentlich kleiner als die Weidelgräser und die Schwingelarten, aber mit derselben Form. Die übrigen Gruppen sind hinsichtlich Samengröße und Fließeigenschaften sehr verschieden und deshalb für die Entstehung von Heterogenität von größerem Interesse. Die kleinkörnigen Leguminosen (Gruppe D) zeigen aufgrund ihrer glatten Oberfläche und der runden Form sehr gute Fließeigenschaften, was ähnlich auch für das Wiesenlieschgras (Gruppe E) gilt. Das Wiesenlieschgras ist im Gegensatz zu den kleinkörnigen Leguminosen bespelzt. Ausschließlich die kleinkörnigen Leguminosen sind von den hier besprochenen Arten in den ISTA Vorschriften als leicht fließend gekennzeichnet (ANONYMUS 2008). In dem ISTA/ISF Experiment on herbage seed lot size (ANONYMUS 2005) wurde das Wiesenlieschgras zu den Weidelgräsern als „bespelzt“ (chaffy), und somit schwer fließend gestellt, obwohl es von seiner runden Form her den kleinkörnigen Leguminosen ähnelt. Samen der Straußgräser (Gruppe F) bilden in der Reihe der ausgewählten Arten eine Sonderrolle. Sie sind bespelzt und haben die längliche Form von typischen Gräsern, sind aber in ihrer Größe sehr winzig. Durch ihre Winzigkeit können sie leichter in Hohlräume wandern als größere Komponenten und wären aus diesem Grund für eine Separierung vermutlich anfällig. Auch ist die wirtschaftliche Bedeutung dieser Arten nicht auf den ersten Blick sichtbar. Durch die Sonderrolle in der Größe und der doch vorhandenen wirtschaftlichen Bedeutung wurde das Straußgras als eine Art-Gruppe definiert.

Nach der Vereinfachung der vielzähligen Arten mussten die komplexen Zusammensetzungen der Arten innerhalb der Mischungen vereinfacht werden. Dazu wurden die Mischungszusammensetzungen in sich ähnelnden Mischungsklassen eingeteilt. Ohne diese weitere Vereinfachung in Mischungsklassen wäre die Anzahl der Kombinationen noch zu unübersichtlich.

Alle diese Vorarbeiten sollen helfen, sicherzustellen, dass die zu untersuchenden 25 Mischungspartien, die Arten-Gruppen und auch die Kombinationen der Arten-Gruppen aus dem Handel annähernd widerspiegeln.

## 2. Entwicklung einer Bildanalyse-gestützten Schnell-Methode

Die Schnell-Methode beinhaltet die Erfassung und Identifizierung von Samen an Hand ihrer morphologischen Merkmale (Form, Größe, Länge ...) durch die Nutzung eines Flachbettscanners und entsprechender Computerprogramme. Die zu entwickelnde Schnell-Methode soll bei der Bestimmung der Zusammensetzung von Proben aus den anderen Teilprojekten eingesetzt werden. Eine automatisierte Erkennung soll die Untersuchung erheblich beschleunigen.

### 2.1. Bilderfassung

Die Bilderfassung beginnt mit der optimalen Erfassung der Samenmerkmale. Für die Abbildung der Samen wurde ein Scanner (Typ Epson 10000xl) mit einer DIN-A3 großen Fläche und einem Holzrahmen auf der Glasfläche genutzt. Der Holzrahmen soll verhindern, dass das Saatgut verloren geht. Eingestellt wurde die Auflösung des Scanners auf 240 dpi bei einer 8 bit-Graustufe.

### 2.2. Bilderkennung mit der Software ImageJ

Für die Identifizierung der Samen wurde das freeware Computerprogramm ImageJ verwendet. Dieses Programm gibt gleichzeitig verschiedene Form-Parameter der erfassten Objekte wieder, die für die Klassifizierung verwendet werden konnten. Das Computerprogramm verarbeitet nur 8 bit-Graustufen Bilder und unterscheidet keine Farben. Der Grenzwert der Erfassungsdichte wurde bei allen Bildern auf 230 festgesetzt.

Folgende Parameter wurden erfasst bzw. nachträglich berechnet:

- Fläche (Area),
- Umfang (Perim),
- Länge (Major) und Breite (Minor),
- Summe aus Länge und Breite;
- Quotient zw. Breite und Länge;
- Durchmesser (Ferret)
- Kreisform (Rund/Circ)

Die erhaltenen Werte wurden zum besseren Vergleich und zur Kontrolle der Plausibilität von der Einheit Pixel in SI-Einheiten (cm und cm<sup>2</sup>) umgerechnet. Die erhaltenen Datensätze aus der Bilderkennung wurden direkt in eine Excel-Datei

exportiert. Falsch erfasste Objekte wie Dreck und Staub (Fläche unter 0,002 cm<sup>2</sup>) auf der Scannerfläche sowie der Rand (Fläche über 2 cm<sup>2</sup>) wurden aus den Datensätzen automatisch im SAS-Programm entfernt.

## 2.3. Anlernung der automatischen Erkennung

### 2.3.1. Anlernung bzw. Erstellung der Lerndatensätze

Für die Klassifizierung von Samen in unbekanntem Proben muss eine mathematische Formel erstellt werden, die aus den erfassten Parametern die Zugehörigkeit der einzelnen Samen zu Referenzarten beschreibt. Durch Lerndatensätze mit definierten Samen einer Art konnte mit Hilfe des SAS Programms und der logistischen Regression (SAS-Prozedur: `proc logistic`) die notwendige mathematische Formel für die Klassifizierung berechnet werden. Diese Prozedur vergleicht die Zielart mit der gesamten Mischung (binär: Zugehörigkeit oder nicht). Dafür musste dem SAS Programm mit Hilfe der Lerndatensätze die Zielart vorgegeben werden und auch alle weiteren Arten. Diese Formel kann für jeden Fall einzeln bestimmt werden bzw. muss bestimmt werden, um eine möglichst hohe Erkennungswahrscheinlichkeit zu erreichen (z.B. Rotklee aus einer Mischung aus Weidelgras, Rotklee und Lieschgras). Für andere Mischungen, in der die Zielart vorkommt, könnte diese Formel eigentlich verwendet werden. Allerdings würde die Genauigkeit je nach Mischung erheblich sinken. Die erstellte mathematische Formel gibt einen Wert für jedes Objekt aus. Ein negativer Wert zeigt ein Samen der Zielart an (positive Werte des Konterparts).

Ausschließlich für die graphische Veranschaulichung der Unterschiede zwischen den Arten und der Darstellung der Trennungswahrscheinlichkeit wurde auf Grund der Einschränkung der logistischen Regression zusätzlich die Cluster-Analyse (SAS-Prozedur: `proc candisc` mit `%plotit`) verwendet. Die Cluster Analyse kann alle Arten gleichzeitig miteinander vergleichen, gibt dagegen nicht direkt die notwendige mathematische Formel für jeden der einzelnen Arten an.

In diesem Projekt wurden in Anlehnung der Ergebnisse aus der Umfrage von 12 Arten Lerndatensätze angefertigt. Von jeder dieser Arten wurden etwa 1000 reine Samen eingescannt. Die Samen wurden dazu aufwendig einzeln auf die Scannerfläche gelegt und abgescannt. Diese Vorgehensweise war notwendig, da bei der Bilderkennung mit ImageJ Samen, die sich berühren, nicht als individuelle Samen

erkennbar sind. Beim Auflegen der Samen auf die Scanner-Fläche wurde darauf geachtet, dass die Samen nicht selektiert werden. Reine Karyopsen, Spelzfrüchte mit oder ohne Grannen, Mehrfachspelzfrüchte wurden nicht bevorzugt oder getrennt. Der Anteil an Karyopsen oder Spelzfrüchte, wenn vorhanden, wurde so belassen, wie er in der betreffenden Charge vorkam.

Arten für die Lerndatensätze (wenn nichts anderes vermerkt: Bezug von der Fa. BSV):

- *Agrostis capillaris* L. (Rotes Straußgras; Abk.: rStr)
- *Alopecurus pratensis* L. (Wiesenfuchsschwanz; Abk.: WFU)
- *Arrhenatherum elatius* L. (Glatthafer; Abk.: GL)
- *Dactylis glomerata* L. (Knautgras; Abk.: KN)
- *Festuca ovina* L. (Schafschwingel; Abk.: SSC)
- *Festuca rubra* L. (Rotschwingel; Abk.: Rot)
- *Lolium perenne* L. (Deutsches Weidelgras; Abk.: DW)
- *Medicago sativa* L. (Luzerne; Fa. Freudenberger; Abk.: L)
- *Phleum pratense* L. (Wiesenlieschgras; Abk.: WL)
- *Poa pratensis* L. (Wiesenrispe; zwei Bezugsquellen: Fa. Eurogreen WR1 und Fa. ProSementis WR2)
- *Trifolium pratense* L. (Rotklee; Fa. Freudenberger; Abk.: RKL)
- *Trifolium repens* L. (Weißklee; Fa. Freudenberger; Abk.: WKL)

### 2.3.2. Kontrolle der berechneten Formel

Nach der Berechnung der mathematischen Formel für die Klassifizierung sollte die jeweilige Formel im Umkehrschluss die Samen in den Lerndatensätzen mit der berechneten Erkennungswahrscheinlichkeit klassifizieren können. Diese Möglichkeit einer Kontrolle wurde verwendet, um die erhaltenen Formeln auf Plausibilität zu testen. Auf eine statistische Verrechnung dieser Ergebnisse wurde aus diesem Grund verzichtet, da keine echten Wiederholungen vorhanden sind. Fiktive Mischungen aus einzelnen Lerndatensätzen wurden aus den Excel-Dateien zusammengestellt. Die verwendeten Arten für diesen und den weiteren Test wurden an Hand der Trennwahrscheinlichkeit ausgesucht. Nur Arten, die sich leicht an Hand samendiagnostischer Merkmale unterscheiden lassen und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit richtig klassifiziert werden, eignen sich für die Schnell-Methode. Ausgewählt wurden aus diesem Grund die Arten Deutsches Weidelgras (DW),

Rotklee (RKL), Wiesenlieschgras (WL) und Rotes Straußgras (rStr) in vier Modellmischungstypen mit jeweils etwa 1000 Samen:

- Mischung 1: DW, RKL, WL
- Mischung 2: DW, RKL, rStr
- Mischung 3: DW, WL, rStr
- Mischung 4: DW, RKL, WL, rStr

### 2.3.3. Test der Klassifizierungsgenauigkeit

Nach der Kontrolle der Modellgleichungen konnte nun die Klassifizierung an Hand reeller Proben getestet werden. Für diesen Test wurden wiederum Proben aus Samen mit der Artenzusammensetzung der vier Modellmischungen erstellt. Verwendet wurde ebenfalls Saatgut aus denselben Chargen. Nur wurden die Mischungsanteile geändert. Wie in den Reinheitsuntersuchungen, hatten die Proben ein Gewicht von jeweils 3,5 g.

#### a) Probenvorbereitung

Für die Tests zur Klassifizierungsgenauigkeit der Modellgleichungen wurden Proben mit bekannten Mischungsanteilen erstellt. Die Probengröße entspricht der Saatgutmenge in der Reinheitsuntersuchung für die Heterogenitätstests von 3,5 g. Diese Probengröße entspricht 2500 bis 3500 Samen (je nach Arten in den Mischungen). Bei der großen Anzahl an Samen kann nicht verhindert werden, dass sich viele Samen gegenseitig berühren. Diese Kontaktpunkte verursachen eine Fehlinterpretation der Form der Samen, da die Software ImageJ die Samen nicht als mehrere Samen erkennt. Um dieses Problem zu reduzieren, wurden die Samen so weiträumig wie möglich auf der Scannerfläche verteilt. Bei 2500 bis 3500 Samen ist selbst die DIN-A3 große Scanner-Fläche zu klein. Zur Lösung dieses Problems wurden die Proben in mehrere Fraktionen geteilt, die getrennt erfasst wurden. Fraktioniert wurden die Proben mit Hilfe eines Siebturmes mit unterschiedlicher Lochgröße. Im ersten Schritt wurde ein Teil des Deutschen Weidelgrases in der Oberfraktion (Sieb >2.0 mm) abgetrennt und nicht gescannt, sondern direkt gewogen. Die Größe der Samen der anderen verwendeten Arten liegt unterhalb der Siebgröße von 2,0 mm. Wenn in der Modellmischung Straußgras vorhanden war, kann ebenfalls eine Unterfraktion (Sieb <570 µm) mit dem Straußgras entfernt werden und ebenfalls direkt gewogen werden. Die restliche Probe bestand weiter aus einer Mischung aus allen Arten. Zur besseren Verteilung der Samen auf der



Glasfläche des Scanners wurde die Probe aber weiter durch ein Sieb auf zwei Teilproben reduziert. Die zwei Fraktionen (>900 µm und >570 µm) wurden in zwei getrennten Schritten locker auf das Glas gestreut und bei Vorkommen von dicht beieinander liegenden Samen von Hand vereinzelt. Der Holzrahmen verhinderte dabei das Wegrollen der Samen und begrenzte den Bereich der Bilderfassung.

## b) Test mit Modellmischungen

Für die Erstellung der Proben wurde Saatgut verwendet, das aus denselben Saatgutchargen stammte, aus denen auch das Saatgut für die Lerndatensätze bezogen wurde. Im ersten Testdurchlauf wurden nicht alle Modellmischungen verwendet, dafür aber 10-fach wiederholt (siehe Tabelle 1). Im zweiten Durchlauf wurden alle Modellmischungen getestet. Die Wiederholungszahl wurde allerdings auf fünf reduziert.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung (in %) der erstellten Modellmischungen für den Test der Klassifizierungswahrscheinlichkeit.

Durchlauf	Mischung	Mischungskomponenten			
		<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium pratense</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Agrostis capillaris</i>
1	2	80 %	10 %		10 %
1	4	70 %	10 %	10 %	10 %
1	4*	70 %	10 %	10 %	10 %
2	1	60 %	20 %	20 %	
2	2	60 %	20 %		20 %
2	3	60 %		20 %	20 %
2	4	40 %	20 %	20 %	20 %

\* ohne Vorfraktionierung

## c) Test mit Reinheitsproben aus den Heterogenitätstests

Im letzten Test wurde die Klassifizierungsgenauigkeit mit Ergebnissen aus einer standardisierten Reinheitsuntersuchung aus dem Teilprojekt „Heterogenität“ verglichen. Für diesen Test wurden die 20 Ergebnisse der Reinheitsuntersuchungen

aus der Partie 10 verwendet. Sie dienen hier als Soll-Wert. Diese zwei Ergebnispakete wurden mit einem HSD und LSD-Test mit Hilfe des SAS Programmes miteinander verglichen.

#### d) Statistische Auswertung

Durch die Bilderkennung wurde das Ergebnis in Anzahl der Samen einer Art ausgegeben. Der Soll-Wert, also die Einwaage, dagegen, konnte nur als Gewicht (in g) angegeben werden. Eine Umrechnung der resultierenden Samenanzahl mit der betreffenden Tausendkornmasse (TKM) war notwendig um das Gewicht der erkannten Samen zu erhalten. Dieser Umweg war bei dem vorherigen Test mit den fiktiven Mischungen (siehe 2.3.2.) noch nicht notwendig, da hier der fiktive Sollwert bereits in Samenanzahl vorlag. Für die TKM-Bestimmung wurde das entsprechende Saatgut aus der entsprechenden Charge verwendet. Die Bestimmung erfolgte nach ISTA (ANONYMUS 2008) mit der Auszählung von 100 Samen mit acht Wiederholungen.

Jede Versuchsvariante wurde mit einem speziellen t- und einem F-Test (alpha 0,05) verrechnet. Der spezielle t-Test (einseitig; alpha = 0,05) zeigt an, ob die mittleren Mischungsanteile signifikant vom wahren Wert der Komponente abweichen (Piepho 2005).

$$t_{\text{vers}} = \frac{|\bar{d}|}{SD} * \sqrt{n}$$

d: Differenz zwischen gefundenem Wert und dem Soll

SD: Standardabweichung der gefundenen Werte einer Variante

n: Anzahl Wiederholungen

Der F-Test soll anzeigen, ob die ermittelte Varianz der Ergebnisse signifikant höher als die erwarteten Varianz bei einer Zufallsprobenahme liegt. Er bemisst somit die Wiederholgenauigkeit der Methodik. Die erwartete Varianz wurde hierfür nach Kruse (1996) für die Probenteilung berechnet.

Das Ergebnis der Untersuchung der Partie 10 bestand aus zwei Datensätzen. Eine Deklaration war zwar vorhanden. Der Zweck dieses Tests war allerdings nicht der Vergleich zur Deklaration, sondern den Unterschied zwischen einer Reinheitsuntersuchung und der Schnell-Methode darzustellen. Aus diesem Grund wurden ein HSD- und ein LSD-Test mit Hilfe des SAS-Programms an den zwei Datensätzen durchgeführt:

```

proc glm data=Daten;
class Unters;
model RKL = Unters /SS3;
means Unters / tukey lines;           /* HSD Test*/
means Unters / t lines;               /* LSD Test*/

```

Weiter wurden die Abweichungen der Ergebnisse aus der Partie 10 mit der Toleranztabelle 3C der ISTA-Vorschriften (ANONYMUS 2008) verglichen. Die Toleranztabelle gibt die maximal tolerierbare Spanne zwischen den Ergebnissen von zwei Reinheitsuntersuchungen einer Einsendungsprobe an.

### 3. Test geeigneter Probenahmegeräte für die Beprobung von Saatgutmischungen

Für die Probenahme und Probenteilung sind für artreines Saatgut laut den ISTA Vorschriften (ANONYMUS 2008) verschiedene Geräte verwendbar. Diese Geräte müssen allerdings zwangsläufig nicht für Saatgutmischungen geeignet sein. Diese Geräte könnten bei der üblichen Handhabung einen Selektionseffekt zu Gunsten der kleinsamigen, gut fließenden Mischungskomponenten und zu Ungunsten der großsamigen schwer fließenden Mischungskomponenten verursachen.

#### 3.1. Test verschiedener Probeteiler und -teilungsmethoden

Zur Klärung der Frage nach der selektiven Wirkung wurden mit kommerziellem, artreinem Saatgut mehrere Mischungen bekannter Zusammensetzung erstellt und dann mit den verschiedenen Geräten auf die Untersuchungsgröße reduziert (Tabelle 2). Es wurden zwei Riffelteiler mit unterschiedlicher Anzahl von Kanälen, ein Zentrifugalteiler mit zwei Arbeitsprotokollen (nach ISTA Vorschriften 2008 und ISTA Handbuch 2005), ein Rotationsprobenteiler (vom LTZ Augustenberg ausgeliehen) und als manuelle Methode die Handhalbierungsmethode nach ISTA verwendet:

- 10er Riffelteiler (Fa. A/S Rationell Kornservice)
- 18er Riffelteiler (Fa. A/S Rationell Kornservice)
- Zentrifugalteiler (No.13062; Fa. Pascall Engineering)
- Rotationsprobenteiler (PT 100; Fa Retsch)

- Handhabung

Jeder Probeteiler bzw. jede Teilungsmethode wurde mit fünf Mischungen getestet: Als Hauptkomponente wurde bei jeder Mischung ein großsamiges *Lolium multiflorum* L. (tetraploides Welsches Weidelgras; WeiW) verwendet. Für die restlichen Komponenten wurde entweder *Phleum pratense* L. (Wiesensieschgras; WL), *Trifolium repens* L. (Weißklee; WKL), *Trifolium repens* L. mit *Alopecurus pratensis* L. (Wiesenfuchsschwanz; WFU), *Agrostis capillaris* L. (rotes Straußgras; rStr) oder *Poa pratensis* L. (Wiesenrispe; WR, gefärbt) verwendet.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung (in %) der erstellte Modellmischungen für den Test der Probenteiler.

Mischung	Mischungskomponenten	
a	87,5 % <i>Lolium multiflorum</i> *	12,5 % <i>Phleum pratense</i> **
b	87,5 % <i>Lolium multiflorum</i> *	12,5 % <i>Trifolium repens</i> *
c	75 % <i>Lolium multiflorum</i> * + 12,5 % <i>Alopecurus pratensis</i> **	12,5 % <i>Trifolium repens</i> *
d	87,5 % <i>Lolium multiflorum</i> *	12,5 % <i>Agrostis capillaris</i> **
e	87,5 % <i>Lolium multiflorum</i> *	12,5 % <i>Poa pratensis</i> ***

\* Saatgut der Fa. Freudenberger, Krefeld

\*\* Saatgut der Fa. BSV, Ismaningen

\*\*\* Saatgut der Fa. Eurogreen, Betzdorf

Die Wiesenrispe wurde zur schnelleren und einfacheren Trennung mit einem Farbstoff blau eingefärbt (Briliant Blau E131; 1 g/100 ml H<sub>2</sub>O).

Von jeder Mischung wurden jeweils 20 Proben mit je 100 g gemischt und mit den jeweiligen Probenteilern 4-mal nach den ISTA Vorschriften (ANONYMUS 2008) auf etwa 6 g reduziert. Diese Untersuchungsprobe wurde mit Hilfe von verschiedenen Sieben in die Mischungskomponenten vorsortiert und dann von Hand nachsortiert. Die getrennten Komponenten wurden mit einer Feinwaage (Precisa 120A; Fa. PAG Oerlikon AG) auf vier Stellen genau gewogen. Die Bestandteile wurden anschließend wieder zusammengefügt, rückgewogen (Kontrolle des Gewichtsverlustes) und gemischt. Die Proben konnten daraufhin noch einmal im nächsten Durchgang verwendet werden. Ebenfalls wurde die Samenfeuchtigkeit vor und nach dem Ende der Untersuchungen gemessen, um Rückschlüsse auf Gewichtsveränderung während der Untersuchung zu erhalten. Die Bestimmung der Samenfeuchtigkeit

erfolgte nach den ISTA Vorschriften (ANONYMUS 2008) (Trockenschrankmethode bei 130 °C mit ganzen Samen; 1 g bzw. 5 g). Hier wurde ebenfalls die Feinwaage (Precisa 120A; Fa. PAG Oerlikon AG) verwendet.

Jede Versuchsvariante wurde 20-fach wiederholt und die Ergebnisse mit einem speziellen t- und einem F-Test (einseitig; alpha 0,05) verrechnet (Piepho 2005). Der einseitige t-Test wurde verwendet, um zu prüfen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen dem gemessenen prozentualen Anteil und dem bekannten Sollwert der prozentualen Zusammensetzung der Mischung besteht. Umschreiben kann man dies auch als „Treffsicherheit“ der Teilungsmethode. Neben der Abweichung vom Sollwert ist ebenfalls die Varianz der beobachteten Werte von Bedeutung. Mit einem F-Test wurde beurteilt, ob die Probenteiler eine signifikant erhöhte Varianz im Gegensatz zur zufallsgemäßen Streuung verursachen. Die dazu benötigte theoretische Standardabweichung ( $SD_{th}$ ) nach Kruse (1996) bezieht sich auf den geringsten möglichen, unvermeidbaren Probenahmefehler. Sie beschreibt die Variation einer Zufallsstichprobe bei einer Zusammensetzung der Mischung aus Arten mit unterschiedlichen Tausendkornmassen. Die verwendete Formel ist nur für Mischungen ausgelegt ist, die aus zwei Komponenten besteht. Bei der Berechnung der  $SD_{th}$  bei Mischung 3 wurden das Weidelgras und der Wiesenfuchsschwanz zusammen als eine großsamige Komponente gewertet.

### 3.2. Test verschiedener Probenehmer

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Probestecher und Probenahmemethoden auf ihre Eignung für die Beprobung von Saatgutmischungen getestet. Im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Spretnjak (2010) wurden der Probesteicherteststand, das erste Protokoll zur Erstellung der Mischung entwickelt und bereits erste Ergebnisse zu den Nobbe-Probestechern erzielt. An dieser Diplomarbeit und den daraus resultierenden Ergebnissen wurde in diesem Kapitel angeknüpft.

Für den Stechertest wurden drei verschiedene Probstechertypen und die Handmethode verwendet:

- Nobbe-Probestecher
- „Kanülen“-Stecher
- Rohr- bzw. Kammerstecher
- Handentnahme

Von den ersten beiden Probestechartypen wurden jeweils vier verschiedene Probestecher in der Technikzentrale der Universität Hohenheim in unterschiedlichen Ausfertigungen hergestellt (Innendurchmesser 10, 12, 14 und 16 mm). Der Kammerstecher dagegen wurde fertig von der Fa. VWR bezogen (Nr. 312-0079P, Fa VWR, Darmstadt). Der Kammerstecher besitzt drei getrennte Kammern und besteht aus zwei Edelstahlrohre, die ineinander gesteckt werden (Außendurchmesser 25 mm; Probenvolumen ca. 70 ml).

Insgesamt wurden drei Mischungen mit jeweils 4,8 kg für die Beprobung hergestellt. Als Hauptkomponente wurde bei jeder Mischung *Lolium perenne* L. (Deutsches Weidelgras, DW) verwendet. Die restliche Komponente war entweder *Trifolium repens* L. (Weißklee; WKL), *Agrostis capillaris* L. (rotes Straußgras; rStr) oder *Trifolium repens* L. mit *Alopecurus pratensis* L. (Wiesenfuchsschwanz; WFU) (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Zusammensetzung (in %) der erstellte Modellmischungen für den Test der Probenehmer.

Mischung	Mischungskomponenten
1	87,5 % <i>Lolium perenne</i> *      12,5 % <i>Trifolium repens</i> * **
2	87,5 % <i>Lolium perenne</i> *      12,5 % <i>Agrostis capillaris</i> *
3	75 % <i>Lolium perenne</i> * + 12,5 % <i>Alopecurus pratensis</i> *

\* Saatgut der Fa. BSV, Ismaningen; bei *Trifolium repens* nur bei Mischung 1.2

\*\* Saatgut der Fa. Freudenberger, Krefeld

Das Deutsche Weidelgras wurde mit der Waage Pesa 15 (Fa. Mettler) abgewogen. Die kleineren Komponenten wurden mit der analytischen Waage PLT 2000 – 3DM (Fa. Kern) gewogen. Nach dem Wiegen wurden die einzelnen Bestandteile zusammengefügt und per Hand vorgemischt, bis sich ein annähernd homogenes Mischbild ergab.

Ein Probestecharteststand wurde für den Test der Probestecher im Herbst 2009 geplant und gebaut (Spretnjak 2010). Dieser Teststand repräsentiert hinsichtlich der Einstichtiefe und der Größe des Behälters sowie des einstellbaren Einstichwinkels die Probenahme eines Saatgutsackes nach ISTA-Kriterien und Probenehmer-Richtlinie (ANONYMUS 2008; ANONYMUS 2007). Die Schichtdicke über dem Probestecher beträgt dabei mindestens 10 cm.

### 3.2.1. Erster Durchlauf des Probesteichertests (Spretnjak 2010)

Ein Rotationsprobenteiler (Fa. A/S Rational Kornservice) wurde zur Homogenisierung der Mischung verwendet. Auf Grund einer potentiellen Verstopfungsgefahr wurden die vorgemischte Mischungen in einer gleichmäßigen Schüttbewegung in den Trichter des Rotationsprobenteilers geschüttet. Dabei wird das Saatgut während eines Umlaufes des Verteilerrohres auf 32 Rohre verteilt. Die Umdrehungsgeschwindigkeit beläuft sich auf etwa 40 Umdrehungen pro Minute. Über jeweils zwei Rohre der 32 Rohre wurde eine Auffangtüte befestigt, die das Saatgut aufnimmt. Durch den Vorgang erhält man 16 untereinander homogen gefüllte Tüten. Diese wurden anschließend immer abwechselnd gegenüberliegend entnommen und nach einem 4 x 4 System in den Probestecherkasten des Prüfstandes vorsichtig entleert. Nach dem Einfüllen wurde das Saatgut mit einer Druckplatte und einem Eisengewicht (~ 9,5 kg) beschwert.

Mit diesem System (= Variante 1) wurden alle Probestecher und die Handmethode mit der Weißklee-Mischung in 10-facher Wiederholung getestet. Mit der Mischungen 2 und 3 wurden nur der Nobbe-Probestechern untersucht.

Laut Probenehmerrichtlinien (ANONYMUS 2007) und ISTA Handbuch (Kruse 2005) muss bei der Verwendung des Nobbe- oder des „Kanülen“-Probestechers in einen Winkel von etwa 30 ° nach oben in gesackter Ware eingestochen werden (nicht beim Kammerstecher!). Zur Simulation des Einstichwinkels wurde der Stecherkasten an sich in einen Winkel von 30° aufgestellt. Der Probestecher konnte dann parallel zum Stecherkasten mit einer Führung eingestochen werden. Das Anwinkeln geschieht durch anheben und fixieren der Ablageplatte. Der Kammerstecher dagegen darf nur horizontal eingestochen werden. Der Stecherkasten wurde bei den Tests mit dem Kammerstecher horizontal belassen.

Das Gewicht der gezogenen Erstproben bei jedem Durchgang hatte ein Gewicht von etwa 56 g. Da bei dem Kammerstecher das Volumen der Probe durch die Kammern begrenzt ist und nicht verändert werden kann, war die Probenmenge in diesem Fall etwa 15 g.

Die so gewonnenen Erstproben wurden mittels des 18 Kanal Riffelteilers (siehe Kapitel Probeteilertest) laut ISTA-Handbuch (Kruse 2005) 4-mal auf die Untersuchungsgröße von 3,5 g reduziert. Die Mischungskomponenten wurden durch ein Sieb (1,6 mm) vorgetrennt und von Hand nachsortiert. Zur Bestimmung des

Gewichtes der getrennten Bestandteile wurde die Feinwaage Precisa 120A (Fa. PAG Oerlikon AG) verwendet und auf vier Stellen hinter dem Komma genau abgewogen. Zur Kontrolle des Gesamtgewichtes wurden alle Mischungen nach jedem fünften Durchlauf rückgewogen. Ziel der Gewichtskontrolle ist die Änderung der Masse durch Verlust oder Feuchtigkeitsausgleich, die durch die Probenahme mit dem Prüfstand entsteht, festzustellen. Weiter wurde die Samenfeuchtigkeit wie bei den Probeteilertests vor und nach dem Ende der Untersuchung bestimmt.

Die Probenahme und die Untersuchung der Proben in den folgenden Abschnitten erfolgten nach dem gleichen Prinzip, wenn nichts Gegenteiliges beschrieben wird.

### 3.2.2. Test verschiedener Methoden zur Erstellung einer homogenen Mischung

Nach der Diplomarbeit mit dem Test verschiedener Nobbe-Probestecher wurden die restlichen Probestecher bzw. Handentnahmen getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass keiner der Probestecher und auch nicht die Handentnahme die Grundvoraussetzung einer Zufallsstichprobe erfüllt, weder bei der Treffsicherheit noch bei der Wiederholbarkeit. Um alle sonstigen Fehlerquellen ausschließen zu können, wurde die Methodik der Erstellung und des Transfers der Mischung überdacht. Für diese Tests wurde ausschließlich die Mischung 1 mit Weißklee verwendet mit 3 bzw. 5 Wiederholungen für die Vortests bzw. 10 Wiederholungen für die endgültige Entscheidung über die Varianten.

Im ersten Test wurde die Homogenität innerhalb des Stecherkastens überprüft. Vermutet wurde ein möglicher vertikaler Gradient der Verteilung der unterschiedlichen Arten. Dazu wurde die Mischung, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, erstellt (= Variante 1) und in den Stecherkasten gefüllt, aber nun wurde der Nobbe-Probestecher (12 mm), der „Kanülen“-Stecher (12 mm) und der Kammerstecher nicht parallel zum Stecherkasten, sondern schräg nach oben, eingestochen, um durch verschiedenen „Schichten“ zu gelangen bzw. dem vertikalen Gradienten zu folgen. Der Winkel des Probestecherteststandes wurde dazu reduziert, um wieder auf einen Gesamtwinkel des Probestechers von 30 ° nach oben zu erhalten.

Nach der Feststellung des Gradienten wurde die Erstellung der Mischung neu konzipiert. Getestet wurden unter anderem die reine Mischung von Hand (=



Variante 2) mit dem Kanülen“-Stecker (12 mm) und dem Kammerstecker, die Verwendung eines Beizmittelmischers (= Variante 3) statt dem Rotationsprobenteiler mit dem Kanülen“-Stecker (12 mm) und die Verwendung des Rotationsprobenteiler, aber nun mit dem Transfer nach einem 2 x 8 System (zwei Tüten in der Ebene und acht Ebenen übereinander; = Variante 4) mit dem Nobbe - Probestecker (12 mm), dem „Kanülen“-Stecker (12 mm) und dem Kammerstecker hierbei nicht parallel zum Probesteckerkasten eingestochen, sondern wieder schräg nach oben.

Nach diesen Tests wurde beschlossen, den Rotationsprobenteiler umzubauen, um den Transfer des Saatgutes in den Probesteckerkasten zu umgehen. Der Probesteckerkasten sollte dabei direkt unter dem Rotationsprobenteiler stehen. Zum direkten Vergleich der Auswirkung des Umbaus wurde mit dem Protokoll aus der Diplomarbeit von Herrn Spretnjak (2010) und dem Kammerstecker vor dem Umbau noch einmal drei Wiederholungen durchgeführt, wobei die einzelnen Kammern getrennt untersucht wurden. Drei verschiedene Einstichvarianten wurden dabei unterschieden. Zum einen wurde normal eingestochen (Variante „waagr.“), einmal schräg nach oben (nicht parallel zum Steckerkasten; Variante „schräg“) und von links nach rechts (parallel zum Steckerkasten; Variante „li/re“). Nach diesem Vergleichsdurchgang mit dem alten Protokoll wurde der Rotationsprobenteiler umgebaut. Über die 32 Auslassrohre wurden flexible PVC Schläuche gestülpt, die am anderen Ende in einer Holzkonstruktion mit PVC Rohren zusammengeführt wurden. Diese Holzkonstruktion würde in den Probesteckerkasten hinein passen, aber um Verstopfungen zu vermeiden, wurde der Probesteckerkasten nur knapp unter die Holzkonstruktion gestellt. Nicht nur der Rotationsprobenteiler wurde umgebaut, sondern ebenfalls wurde die gesamte Vorgehensweise geändert (= Variante 5). Der Mischvorgang wurde in zwei Durchgängen durchgeführt. Im ersten Durchgang wurde das Saatgut nicht im Steckerkasten aufgefangen, sondern in einem waagrecht liegenden PVC Rohr ( $\varnothing$  28 cm) mit einer längs geschnittenen Öffnung mit Klappe. Beide Enden des Rohres wurden verschlossen. Wobei ein Ende nur mit einer Kappe verschlossen ist. Nach Ende des ersten Mischdurchganges wird die seitliche Klappe des Rohres geschlossen und das Rohr senkrecht in den Fülltrichter gestellt. Der Steckerkasten wurde nun unter den Rotationsprobenteiler gestellt und die Kappe des Rohres vorsichtig entfernt. Merkmal dieses Protokolls ist, dass die Mischung zweimal im Rotationsprobenteiler durchgemischt wurde (dreimal,

wenn die Vormischung von Hand dazugezählt wird) und der Stecherkasten wurde direkt, ohne die 16 Tüten, befüllt. Außer dem Kammerstecher wurde ebenfalls der „Kanülen“-Stecher (14 mm) mit allen drei Einstichvarianten getestet. Die Schwierigkeit war hierbei ebenfalls, drei Proben aus unterschiedlicher Einstichtiefe in einem Stichvorgang zu bekommen, wie mit den drei Kammern des Kammerstechers. Nach dem Umbau des Rotationsprobenteilers wurden weitere Protokolländerungen getestet, um zu untersuchen ob andere Methoden noch homogenere Mischungen ergeben. Aus Zeitgründen wurde bei diesen Protokolländerungen nur der Kammerstecher verwendet. Ebenfalls wurde nur die Einstichvariante schräg nach oben verwendet (nicht parallel zum Stecherkasten):

- Änderung der Reihenfolge der flexiblen PVC Schläuche bei gleichem Protokoll wie bei der Variante 5 (= Variante 6)
- Einsatz eines Plastikrührfingers (nur ein Mischdurchgang; direktes Befüllen des Stecherkastens) (= Variante 7)
- Drei Mischungsdurchgänge mit dem Rotationsprobenteiler (zweimalig mit Hilfe des Auffangrohrs) (= Variante 8)
- Vermeidung eines Schüttkegels (nur ein Mischdurchgang; direktes Befüllen des Stecherkastens) (= Variante 9)
- Drei Mischungsdurchgänge mit dem Rotationsprobenteiler (1. Auffangrohr, 2. Zugkasten\* und 3. Stecherkasten) (= Variante 10)

\*Der Zugkasten soll ein horizontales Förderband simulieren. Die Form und das Aussehen des Zugkastens entsprachen denen des Probesteckerkastens. Die Vorderseite war dabei nicht an dem Zugkasten befestigt, sondern nur durch einen Foliensack mit einer zweiten Rückwand („Förderwand“) verbunden. Wurde an der Vorderseite gezogen, wurde gleichzeitig die zweite Rückwand nach vorne bewegt. Das Saatgut wurde mitgezogen und konnte an der Vorderkante in den Trichter des Rotationsprobenteilers fallen.

Es stellte sich noch eine weitere Frage: Wie hoch ist die Varianz einer „normalen“ Probenahme bzw. ob die festgestellten Varianzen der Vorversuche die „normale“ Praxis einer Probenahme widerspiegeln. Mit dem Kanülenstecher (14 mm) und dem Kammerstecher wurden jeweils drei Säcke aus dem Saatguthandel beprobt. Dazu wurde eine Partie ausgesucht, die nach ihren Mischungsanteilen und –komponenten der Testmischung ähnelt. Jeweils drei Säcke der Mischung Bellmix Grünland 190 NS (siehe Partie 29) wurden beprobt. Für diesen Test wurde die Firma Becker-Schoell in

ltsfeld besucht. Eine Palette wurde ausgewählt und die obersten Säcke entfernt. Beprobte wurden nur die sechs Säcke aus der Mitte der Palette. Mit jedem Probestecher wurde jeder Sack 4-mal beprobt. Der liegende Sack wurde vom Boden aus (beim Kanülenstecher auch von oben) im Zick-Zack-Muster eingestochen (unten: Probe 2+4; Mitte: 1+3). Jede der drei Kammern wurde getrennt aufgefangen. Auch bei dem „Kanülen“-Stecker wurden pro Einstich an drei Einstichtiefen Proben gezogen. Nur die letzte Einstichtiefe wurde von der oberen Seite des Sackes genommen. Dies war notwendig aufgrund des Anwinkelns des Probestechers. Nach dieser Beprobung wurden die Säcke behutsam aufgerichtet und geöffnet. Auf der Seite, die vorher unten bzw. oben lag, wurden je zwei Proben nur mit dem Kammerstecher genommen (rechts = 1; links = 2). Bei dem Aufstellen der Säcke ist das Saatgut nach unten gerutscht, dadurch blieb die Kammer I des Kammerstechers leer.

### 3.2.3. Wiederholung der Probestechertests

Für die Wiederholung des Probestechertests wurde das Protokoll mit dem Auffangrohr und dem zweimaligem Mischvorgang (Variante 5) gewählt. Aus Zeitmangel wurde für die Wiederholung der Tests nur die Mischung 1 mit dem Weißklee verwendet. Diese Mischung wurde mit Saatgut aus dem Samenlager neu für den Test erstellt (Mischung 1.2). Alle Probestecher wurden in diesem neuen Test getestet. Nur die Handmethode wurde nicht verwendet.

### 3.2.4 Validierungsstudie

Nach Abschluss der Tests konnten Probenahmegeräte für die Beprobung und Probenteilung von Gräseraatgutmischungen empfohlen werden. Die neue Methodenvorschrift für die Beprobung von Saatgutmischungen wurde formuliert. Grundvoraussetzung für die Aufnahme der neuen Methodenvorschrift in die ISTA-Vorschriften ist allerdings eine internationale Validierungsstudie. In dieser Validierungsstudie wurde das neue Protokoll weiter getestet. Insgesamt zehn Labore haben ihre Mithilfe dafür angeboten: vier Labore in Deutschland, jeweils ein Labor in Frankreich, England, Schweden, Finnland, Österreich und der Schweiz. Jedes dieser Labore erhielt drei 5 kg Säcke mit vakuumiertem Saatgut, einem Kanülenstecher (Innendurchmesser 12-16 mm) und einer detaillierten Arbeitsanweisung. Die Modellmischung bestand aus:

- 75,0 % *Lolium perenne* (Deutsches Weidelgras; Fa. BSV),
- 12,5 % *Festuca rubra* (Rotschwengel; gefärbt; Fa. BSV), damit besteht die Modellmischung aus 87,5 % Gräsersaatgut, und
- 12,5 % *Trifolium repens* (Weißklee; Fa. BSV)

Der Rotschwengel wurde für dieses Experiment eingefärbt. Für das Färben wurde 20 g des UV-Farbstoffes (off-set Sicherheitsfarbe 1407; Fa. Epple GmbH) mit 500 ml eines aromatenfreien Verdünners (Primaster; Fa. Globus Fachmärkte GmbH) gemischt. Die Verdünnung wurde mittels einer Sprühpistole auf jeweils 5 kg Saatgut gesprüht, während das Saatgut in einem handelsüblichen Betonmischer in Bewegung gehalten wurde. Nach einer Trocknungspause von 30 min unter ständiger Bewegung wurden weitere 500 ml der Farblösung aufgesprüht. Nach einer weiteren Trocknungspause von 30 Minuten im Betonmischer wurde das Saatgut in dünne Schichten in Boxen verteilt und bei Raumtemperatur in einem gut belüfteten Raum vorgetrocknet. Anschließend wurde das Saatgut für drei Tage bei 30 °C endgetrocknet. Die teilnehmenden Labore wurden über die Einfärbung des Saatgutes nicht unterrichtet. Die Farbe sollte die Ergebnisse der routinemäßigen Reinheitsuntersuchung in den Laboren nicht beeinflussen. Im Gegenzug sollte die Farbe eine fehlerfreie Trennung von *Festuca rubra* und *Lolium perenne* bei der Rückkontrolle im Labor in Hohenheim ermöglichen.

Für die Erstellung der Mischung wurde das endgültige Protokoll aus den Probestechertests verwendet (Variante 5). Nur wurde im zweiten Mischungsdurchgang nicht der Stecherkasten befüllt, sondern ein weiteres Auffangrohr, in dem sich ein Müllsack befand. In diesem Müllsack wurde die Mischung aufgefangen. Das Auffangrohr dient hierbei nur zur Erhaltung der runden Form und zur einfacheren Befüllung der Folienschläuche. Durch die Öffnung des Auffangrohres konnte nach dem Mischvorgang das Saatgut im Müllsack bequem in einen Folienschlauch geschoben werden. Dadurch wurde vermieden, das Saatgut durch Ausschütten umzufüllen. Dieser Folienschlauch wurde verschweißt und mit Luftlöcher zum Luftausgleich versehen. Dieser erste Folienschlauch diente lediglich zum Formerhalt während des Vakuumierens und nicht als Vakuumschlauch. In der Mensa der Universität Hohenheim wurden die so vorbereiteten Säcke in zwei Durchgängen mit jeweils einem neuen Folienschlauch in zwei getrennten Schritten

vakuuiert (Typ VP530 S; Fa VAMA Maschinenbau GmbH; 98,5 % Vakuum). Nach Ende dieser Prozedur wurde das Saatgut insgesamt von vier Plastiksichten geschützt (ein Müllsack und drei Folienschläuche) und das Vakuum wurde mit zwei Schweißnähten gesichert.

Die Labore erhielten die Anweisung an einer vorher markierten Stelle mit dem Probeteher einzustechen. Die markierte Stelle befand sich auf der abgewandten Seite zur Bodenseite des Sackes („oben“), in der Mitte der Fläche etwas oberhalb des Falzes gesehen von der Unterseite des Sackes, die sich während der Befüllung des Müllsackes und dem Vakuumieren unten befand. Die Erstprobe sollte bei der Probenahme, wie in den vorherigen Probeteher tests, ein Gewicht von etwa 56 g und die Untersuchungsprobe von etwa 3,5 g haben. Für die Probenteilung konnten die Labore zwischen dem Riffelteiler und dem Rotationsprobenteiler wählen. Die Ergebnisse sollten in ein Formblatt eingetragen werden und mitsamt dem Probeteher, den getrennten Fraktionen aus der Reinheitsuntersuchung und dem Rest der Erstprobe zurück an die Universität Hohenheim geschickt werden. In Hohenheim wurden die getrennten Fraktionen noch einmal kontrolliert. Weiter wurden die Reste der Erstproben durch Sieben und Handverlesen ebenfalls in die Fraktionen getrennt. Der Fluoreszenzfarbstoff diente hier als Hilfsmittel, um die Fraktionen einfacher und sicher trennen zu können.

Die Samenfeuchtigkeit zur Beurteilung des Gewichtsverlustes wurde ebenfalls wie bei den Probeteher tests durchgeführt.

## 4. Heterogenitätsprüfung

Durch die Beprobung von Saatgutpartien aus dem Handel soll gezeigt werden, in welchem Ausmaß Varianzen innerhalb von Mischungspartien zu erwarten sind. Als ein Mittel, um diese Varianz darzustellen, wurden der H- und der R-Wert-Test für artreine Ware nach den ISTA-Vorschriften durchgeführt (ANONYMUS 2008). An Hand dieser Ergebnisse sollte der Heterogenitätstest gegebenenfalls an die besonderen Eigenschaften von Mischungen angepasst werden. Um die Varianz innerhalb von Partien zu ermitteln, war vorgesehen, aus bis zu 30 Partien 20 Proben zu sammeln und zu untersuchen. Diese Proben wurden für den Heterogenitätstest hinsichtlich der Reinheit, des Besatzes und der Artzusammensetzung sowie der Keimfähigkeit und der Tausendkornmasse (TKM) nach den ISTA-Vorschriften untersucht (ANONYMUS 2008).

An Hand der Datensätze aus den Umfrageergebnissen zu Saatgutmischungen wurden 31 repräsentative Mischungen im laufenden Saatgutverkehr ausfindig gemacht und beprobt. Hierbei wurden von 20 verschiedenen Stellen je Partie Proben von mind. 100 g entnommen und getrennt gehalten, nach Hohenheim zur Untersuchung geschickt. Drei Verfahren der Probenahme wurden in diesem Projekt angewendet:

1. Beprobung durch Mitarbeiter der Mischungsbetriebe selbst. Die Proben wurden überwiegend von Hand aus dem Saatgutsack direkt nach der Befüllung und vor dem Verschließen gezogen.
2. Beprobung durch eigene Mitarbeiter des Fachgebietes Saatgutwissenschaft und –technologie, Universität Hohenheim.
3. Beprobung von Saatgutpartien, die sich bereits im Handel befinden, durch die Saatgutverkehrskontrolle bzw. durch Kauf von ganzen Packungen (bei Kleinpackungen < 1 kg).
4. Probenahme für spezielle Fragestellungen (nicht nach Vorschriften für die Beprobung für einen Heterogenitätstest; ANONYMUS 2008)

Nur für eine spezielle Fragestellung wurde das Probenahmeprotokoll geändert. Für die Quantifizierung der Varianz innerhalb eines Saatgutsackes wurden zwei Säcke aus verschiedenen Saatgutpartien mit ähnlicher Zusammensetzung beprobt (Partie 11 und 30). Aus diesen Säcken wurde nicht nur eine, sondern insgesamt 20 Proben aus verschiedenen Bereichen bzw. Ebenen des Sackes gezogen. Die Partie 11 wurde mit einem Probesteher beprobt. Der Saatgutsack der Partie 30

dagegen wurde in das Labor der Universität Hohenheim transportiert und dort ohne Verwendung eines Probestechers geöffnet. Beide Mischungen beinhalteten das Wiesenlieschgras und den leichtfließenden Weißklee. Weiter wurden sechs Säcke einer reinen Kleegrasmischung (Partie 29) für einen Vergleich der Probestecher verwendet (siehe Kapitel Probenehmertest).

Die so gewonnenen Erstproben der Mischungspartien wurden im Fachgebiet Saatgutwissenschaft und -technologie an der Universität Hohenheim untersucht.

#### 4.1. Reinheitsuntersuchung

Vor der Reinheitsuntersuchung wurden alle Erstproben auf die Größe der Untersuchungsprobe von etwa 3,5 g (+/- 0,4 g) reduziert. Da Mischungen mit unterschiedlichsten Arten beprobt wurden, diente dieser Wert dazu, im Mittel die von der ISTA geforderten 2.500 Samen für eine Reinheitsuntersuchung zu gewährleisten (ANONYMUS 2008). Für die Reduktion wurde der 18er Riffelteiler (Fa. A/S Rationell Kornservice; 18 Kanäle) verwendet. Aus jeder Einsendungsprobe wurden insgesamt zwei Untersuchungsproben gewonnen (A- und B-Probe) und getrennt untersucht.

Die Reinheitsuntersuchung erfolgte nach den ISTA Vorschriften (ANONYMUS 2008) mit zwei Abweichungen. Die Fraktion reiner Samen wurde weiter in die Mischungskomponenten aufgeteilt. Weiter wurden auch die tauben Samen, wenn sie zuordenbar waren, getrennt in den Mischungskomponenten erfasst. Somit ergeben sich folgende Fraktionen:

- reine Samen der einzelnen Mischungskomponenten nach Deklaration;
- unschädlichen Verunreinigungen (Bruch; Erde und Steine; Sklerotien) sowie
- getrennt die tauben Samen der Mischungskomponenten nach Deklaration und
- Samen anderer Arten.

Die Fraktionen wurden mit der Feinwaage (Precisa 120A; Fa. PAG Oerlikon AG) auf vier Stellen genau gewogen und die Werte in einer Datenbank gesammelt. Die getrennten Mischungskomponenten wurden für die Keimfähigkeitsuntersuchung und der Tausendkornmassenbestimmung weiter verwendet. Dazu wurden allerdings die jeweiligen A- und B-Proben zusammengefasst, um genügend Samen für die weiteren Untersuchungen zu erhalten.

Für die spätere Berechnung der H- und R-Werte wurden die Werte in die Samenprozentanteile statt Masseprozentanteile umgerechnet. Die reine

Samenfraktion wurde auf 100 % gesetzt (ohne die unschädlichen Verunreinigungen und Samen anderer Arten).

## 4.2. Keimfähigkeitsuntersuchung

Die Keimfähigkeitsuntersuchung erfolgte nach den ISTA-Vorschriften für die Keimfähigkeit und der Durchführung eines Heterogenitätstest für die Keimfähigkeit (ANONYMUS 2008, 2009). Externe Effekte (Gradienten innerhalb der Keimschränke oder technische Störungen) können die Keimfähigkeit einzelner Keimdosen während der Keimfähigkeitsuntersuchung beeinflussen. Um diese Effekte auszuschließen wurden die 20 Proben nicht mit einmal 100 Samen, sondern mit zwei Wiederholungen á 100 Samen durchgeführt. Die maximal tolerierbaren Abweichungen zwischen den zwei Wiederholungen wurden an Hand der Tabelle G1 und AG1 ( $\alpha = 0,05$ ) nach Miles berechnet (1963). Bei Abweichungen über diese Toleranzwerte wurde die entsprechende Probe wiederholt. Durch den enormen Zeitaufwandes der Keimfähigkeitsuntersuchung wurden nicht alle Mischungskomponenten aller Partien untersucht. Endgültig wurde nach der Partie 21 die Keimfähigkeitsuntersuchung beendet. Von der gesamten Partie 11 wurde auf Grund der speziellen Probenahme keine Keimfähigkeitsuntersuchung durchgeführt. Die Keimfähigkeit wurde in durchsichtigen Plastikboxen auf blauem Keimpapier durchgeführt. Nur bei den winzigen Samen von *Agrostis capillaris* L. wurde ein Faltenfilter und bei der Art *Avena sativa* L. Keimrollen verwendet. Befeuchtet wurden die Samen bzw. Keimlinge ausschließlich mit deionisiertem Wasser. Zur Brechung einer eventuellen vorhandenen Dormanz der Samen wurden die Samen auf dem angefeuchtetem Keimpapier für sieben Tage in einem Kühlschrank bei etwa 5 °C gelagert. Dieses Vorgehen war bei den meisten Arten nach den ISTA Vorschriften anwendbar (ANONYMUS 2008). Bei den einzelnen Ausnahmen wurde keine Vorbehandlung durchgeführt. Für die Keimung wurden drei Keimschränke mit verschiedenen Temperaturen genutzt (GR-36L, Fa. CLF PlantClimatics; Fa. Rumid). Die untersuchten Arten wurden auf diese drei Keimschränke verteilt:

- 20°C (Dauertemperatur mit Licht) für *Avena sativa* L., *Lolium multiflorum* L.; *L. perenne* L., *Trifolium pratense* L. und *T. repens* L.
- 20/30°C (Wechseltemperatur Nacht/Tag, 16/8h) für *Anthoxanthum odoratum* L., *Agrostis capillaris* L., *Bromus erectus* L., *Cynosurus cristatus* L., *Phleum pratense* L. und *Poa pratensis* L.



- 15/25°C (Wechseltemperatur Nacht/Tag, 16/8h) für *Festuca ovina* L., *F. pratensis* L. und *F. rubra* L.

Die Keimdauer und die Auswertungen erfolgten nach ISTA Vorschriften (ANONYMUS 2008) und ISTA Handbuch für Keimlingsbeurteilung (ANONYMUS 2009).

### 4.3. Tausendkornmassenbestimmung

Für die Tausendkornmassenbestimmung (TKM) ist kein Heterogenitätstest in den ISTA-Vorschriften (ANONYMUS 2008) vorgesehen. Gerade aus diesem Grund wurde an Hand der 20 Proben ebenfalls die Varianz der Tausendkornmassen (TKM) bestimmt.

Für die Tausendkornmassenbestimmung wurde die Handzählmethode nach ISTA (ANONYMUS 2008) verwendet. Hierzu wurden 8\*100 Samen ausgezählt und getrennt mit der Feinwaage (Precisa 120A; Fa. PAG Oerlikon AG) auf vier Stellen genau gewogen. Bei zu großer Varianz zwischen den acht Wiederholungen wurden, wie vorgeschrieben, weitere acht Wiederholungen durchgeführt. Auch diese Bestimmung wurde auf Grund des enormen Zeitaufwandes nicht bei allen Partien vollständig durchgeführt. Nur mit wenigen Ausnahmen wurde bis einschließlich der Partie 25 von allen 20 Proben und jeder Mischungskomponente die Tausendkornmasse bestimmt. Ausgenommen wurden Mischungskomponenten, bei denen die Anzahl der Samen nach der Reinheitsuntersuchung nicht annähernd ausreichte und die Nachsortierung aus der Erstprobe zeitlich nicht möglich war. Nach der Partie 25 wurden von allen Mischungskomponenten nur noch von vier zufällig ausgewählten Erstproben die Tausendkornmasse für den Heterogenitätstest und der Umrechnung der Ergebnisse in Samenanzahlprozent bestimmt, da die Tausendkornmasse ebenfalls für die Berechnung der Samenanzahl der Untersuchungsprobe für den Heterogenitätstest benötigt wurde.

### 4.4. Heterogenitätstests

Mit den Datensätzen für den Heterogenitätstest wurden der H- und der R-Wert-Test für Heterogenität durchgeführt (ANONYMUS 2008). Zu Beginn des Projekts wurde noch mit dem H- und dem R-Wert-Test nach den ISTA Vorschriften Kapitel 2.9, der im eigentlichen Sinn nur für art-reine Ware verwendet werden kann, gerechnet.

Dabei vergleicht der H-Wert-Test die tatsächliche mit der erwarteten Varianz des gewünschten Merkmals.

$W = \frac{\bar{X} * (100 - \bar{X})}{n} * f$  erwartete (theoretische) Varianz der unabhängigen Behälterproben bezüglich Reinheit und Keimfähigkeit

$W = \bar{X} * f$  erwartete (theoretische) Varianz der unabhängigen Behälterproben bezüglich der Anzahl Samen anderer Arten

$V = \frac{N \sum X^2 - (\sum X)^2}{N(N-1)}$  beobachtete Varianz der Proben, basierend auf allen X-Werten bezüglich des ausgewählten Merkmals

$H = \frac{V}{W} - f$  Heterogenitätswert

X: Untersuchungsergebnis des zu prüfenden Merkmals in einer Behälterprobe

n: Anzahl unabhängiger Behälterproben

N: Anzahl geprüfter Samen je Behälterprobe (z.B. 200 für die Keimfähigkeit)

f: Faktor für die Multiplikation der theoretischen Varianz, um die maximal zulässige Varianz zu erhalten (siehe Tabelle 2C; ANONYMUS 2008)

Nach Berechnung des Heterogenitätswertes wird dieser an Hand der Tabelle 2D in den ISTA Vorschriften verglichen (ANONYMUS 2008). Ist der Heterogenitätswert größer als die angegebene Toleranz, gilt die Partie als heterogen. Mit der Varianzkomponentenberechnung soll der H-Wert-Test an die erwartete Varianz bei der Beprobung und Untersuchung von Saatgutmischungen angepasst werden.

Die zweite Möglichkeit, um Heterogenität einer Saatgutpartie zu beurteilen, ist der R-Wert-Test. Der Test vergleicht die Spannweite der beobachteten Werte. Diese reine Differenz der Werte ist nicht wie der H-Wert-Test abhängig von der Höhe der Varianz. Ist die Differenz zwischen dem kleinsten und dem größten Wert des erfassten Merkmals größere als die erwartete Toleranz, gilt die Partie als heterogen.

$$R = X_{\max} - X_{\min}$$

ermittelte Spannweite als maximale Differenz zwischen den Behälterproben der Partie bezüglich des geprüften Merkmals

Der H-Wert-Test oder genauer die erwartete Varianz für eine Heterogenitätstest, soll am Ende des Projektes an die Eigenschaften der Mischungen angepasst werden. Dazu wird ein Korrekturfaktor aus dem Quotienten aus der maximal tolerierbaren Streuung und der Zufallsstreuung erstellt und als Ersatz für den f-Wert verwendet.

Im Fall der Tausendkornmasse ist kein Heterogenitätstest vorgesehen. Um dennoch die Varianzen zwischen Proben einer Saatgutpartie beurteilen zu können, wurde die „innere“ gegenüber der „äußeren“ Varianz in einem F-Test verglichen. Die Varianz der acht Wiederholungen wird hier als „innere“ Varianz bezeichnet. Dagegen wird die Varianz der 20 Ergebnisse einer Mischungskomponente als „äußere“ Varianz bezeichnet. Für die Beurteilung der Ergebnisse des F-Tests wurde zusätzlich die Varianzhomogenität (Brown and Forsythe's Test und Levene's Test) der 20 „inneren“ Varianzen als Grundvoraussetzung mittels dem SAS Programmpaket getestet:

```
proc glm data = work.Einlesen;
class Probe;
model P26DW = Probe;
means probe /hovtest=BF;
means probe /hovtest=levene (Type=square);
```

## 5. Varianzkomponenten

Um die zu erwartende Varianz für verschiedenste Probenahme- und Probenuntersuchungsprotokolle zu schätzen, müssen für jeden Teilschritt der Probenahme und Laboruntersuchung einzeln die erwarteten Varianzen berechnet werden. Miles (1963) hat diese Berechnungsart in der Varianzberechnung bei Saatgut eingeführt. Die Varianzen werden nach der Binomial-Verteilung ( $p \cdot q/n$ ) berechnet, wobei das  $n$  von dem spezifischen Divisor der Varianzkomponente ersetzt wird.

$$V_{\text{Komp}} = \frac{p \cdot q}{D} \quad \text{erwartete Varianz der Varianzkomponenten}$$

p: Merkmal X (in %)

q: Merkmal  $Y=X-100$  (in %)

D: Divisor der Varianzkomponente

Beispiel:

$$B = \frac{p \cdot q}{D_B} \quad \text{erwartete Varianz „zwischen den Behältern“}$$

Insgesamt definierte Miles (1963) fünf Varianzkomponenten für die Berechnung der Gesamtvarianz einer Probenuntersuchung. Diese Varianzkomponenten reichen von der Probenahme bis hin zur Probenuntersuchung. Nach Miles rührt die Varianz bei der Probenahme durch die Varianz zwischen und innerhalb der Behälter her. Bei der Probenuntersuchung rührt die Varianz durch die Arbeit des Laboranten, aber auch der Varianz einer kleinen Stichprobe (Zufallsstreuung) her. Miles setzte die Gesamtvarianz aus den einzelnen Varianzkomponenten wie folgt zusammen:

$$V_{\text{Ges}} = \left(\frac{B}{n}\right) \cdot \frac{(N-n)}{N} + \frac{C}{n} + \frac{W}{n} + \frac{A}{n} + \frac{I}{n} \quad \text{Gesamtvarianz}$$

B: Varianz zwischen Behältern („between bags“)

C: Varianz innerhalb eines Behältern („within bag“)

W: Varianz der Untersuchungsprobe („working-sample“)

A: Varianz zwischen Laboranten („among analysts“)

I: Varianz desselben Laboranten („within analyst“)

n: Anzahl an Einheiten (z.B. Anzahl gezogener Erstproben)

N: Anzahl Behälter der Partie

Die Daten aus den verschiedenen Experimenten in diesem Projekt erlauben weitere Varianzkomponenten individuell oder als Gruppe zu bestimmen. Diese Varianzkomponenten beinhalten folgende Situationen:

1. wenn Erstproben von verschiedenen Säcken gezogen werden
2. wenn Erstproben von verschiedenen Stellen innerhalb eines Sackes gezogen werden
3. wenn Erstproben von derselben Stelle innerhalb des Sackes von einer Person gezogen werden
4. wenn Erstproben von derselben Stelle innerhalb des Sackes von verschiedenen Personen gezogen werden
5. wenn die Mischproben auf die Untersuchungsprobengröße von einer Person reduziert werden
6. wenn die Mischproben auf die Untersuchungsprobengröße von verschiedenen Personen reduziert werden
7. wenn die Reinheitsuntersuchungen von einer Person durchgeführt werden
8. wenn die Reinheitsuntersuchungen von verschiedenen Personen durchgeführt werden
9. wenn eine kleine Untersuchungsprobe untersucht wird (Zufallsprobe)

$$V_{\text{neu}} = \left(\frac{B}{n}\right) * \frac{(N-n)}{N} + \frac{C}{n} + \frac{S_W}{n} + \frac{S_B}{n} + \frac{W}{n} + \frac{T_W}{n} + \frac{T_B}{n} + \frac{A}{n} + \frac{I}{n} \quad \text{Gesamtvarianz}$$

$S_W$ : Varianz der Probenahme von derselben Person („trier“)

$S_B$ : Varianz der Probenahme von verschiedenen Personen („trier“)

$T_W$ : Varianz der Probenreduktion von derselben Person („sample reduction“)

$T_B$ : Varianz der Probenreduktion von verschiedenen Personen („sample reduction“)

Jeder Sack wurde in diesem Test nur jeweils einmal beprobt (mit Ausnahme der Partien 11, 29 und 30). Somit ist der Wert von n für B, C, S jeweils 1. Die Anzahl der Säcke innerhalb der Partie (N) wurde wie bei Miles (1963) auf 50 festgelegt. Dieser Wert wurde ebenfalls verwendet. Im Labor wurden aus der Mischungs- bzw.

Einsendungsprobe zwei Untersuchungsproben separat untersucht. Der n-Werte bei W, T, A und I ist somit jeweils gleich 2.

An Hand der Ergebnisse aus dem Heterogenitätstest und der Validierungsstudie wurden die einzelnen Varianzkomponenten schrittweise neu berechnet.

Die Varianzkomponente 9 wird nach der Binomial-Verteilung über die mittlere Samenanzahl in der Untersuchungsprobe berechnet.

Die Varianzkomponenten 3 bis 8 wurden an Hand der Ergebnisse aus der Validierungsstudie ermittelt. Die Varianzkomponenten 7 und 8 wurde mit der Differenz zwischen den übermittelten Ergebnissen der Labore und der Nachuntersuchung in Hohenheim ermittelt. Die Varianzkomponente 5 und 6 wurde mit der Differenz zwischen den übermittelten Ergebnissen der Labore und den Ergebnissen der Untersuchung der Erstproben (einschließlich der Untersuchungsproben) ermittelt. Die Varianzkomponente 3 und 4 wurde mit der Differenz zwischen den Untersuchungsergebnissen der Erstproben (einschließlich Untersuchungsproben) und dem Soll-Wert bei der Mischung der Säcke ermittelt.

Die Untersuchungen der Proben in Hohenheim wurden durch die UV-Färbung der Art *Festuca rubra* die Trennung von *Festuca rubra* und *Lolium perenne* wesentlich erleichtert und gilt somit als fehlerfrei. Die Datensätze wurden für die Varianzkomponentenschätzung von Masseprozent in Samenanzahlprozent umgerechnet und mit Hilfe des SAS Programmpaketes (`proc varcomp`) und Excel berechnet. Die Varianzkomponenten wurden als Quotient der Binomial-Verteilung mit den mittleren Prozentanteilen der Mischungskomponenten als Nenner und dem dazugehörigen D-Wertes als Teiler ausgedrückt (in Anlehnung an Miles, 1963).

Die Varianzkomponenten 1 und 2 wurden aus den Datensätzen des Heterogenitätstests ermittelt, wobei von Mischungen mit nur zwei Komponenten jeweils nur ein Datensatz verwendet wurde. In diesem speziellen Fall bedingen sich die Varianzen der zwei Komponenten und stellen keine echten Wiederholungen dar. Die Datensätze wurden für die Varianzkomponentenschätzung von Masseprozent in Samenanzahlprozent umgerechnet. Weiter wurden die Probenahme, -teilung und -untersuchung in den Heterogenitätstests innerhalb einer Saatgutpartie je Bearbeitungsschritt nicht von mehreren Personen, sondern ausschließlich von einer Person durchgeführt. Daher entfällt in der Berechnung der Varianzkomponenten 1

und 2 jeweils die Varianzkomponente „zwischen“ Personen. Die Varianzkomponente 2 wurde in einem speziellen Versuchsdesign bestimmt. Aus zwei Saatgutsäcken von verschiedenen Saatgutpartien wurden 20 Erstproben von verschiedenen Stellen innerhalb des Saatgutsackes gezogen. Die Proben wurden wie für den Heterogenitätstest einzeln untersucht. Aus der daraus erhaltenen Varianz der 20 Proben wurden die Varianzkomponenten 3, 5, 7 und 9 abgezogen. In diesem Fall wurden für die Varianzkomponente 5 und 7 nicht die Divisoren aus der Validierungsstudie verwendet werden. Von jeder Erstprobe wurden zwei Untersuchungsproben untersucht. In der Abweichung zwischen den A- und B-Proben ist die Varianz des Teilers und des Laboranten bereits enthalten. Die Varianzkomponente 9 wurde mittels der mittleren Anzahl der Samen einer Untersuchungsprobe der zwei Partien berechnet. Nur die Varianzkomponente 3 wurde aus der Validierungsstudie übernommen. Die resultierende Varianz wurde der Varianzkomponente 2 zugeschrieben.

Die Varianzkomponente 1 wurde mit den Datensätzen des Heterogenitätstests aus den 28 Mischungspartien mit insgesamt 85 Mischungskomponenten ermittelt. Neun Mischungskomponenten wurde allerdings vor der Berechnung wegen ihrer außergewöhnlich hohen Varianz als Ausreißer entfernt. Diese Mischungskomponenten repräsentieren keine gute Produktionspraxis. Für die Berechnung der Varianzkomponente 1 wurde nur die Varianz der Mischungskomponente, welche gerade noch eine gute Produktionspraxis repräsentiert, verwendet. Von dieser Varianz wurden die bereits berechneten Varianzkomponenten abgezogen, wie bei der Berechnung der Varianzkomponente 2. Die Varianzkomponenten wurden als Quotient der Binomial-Verteilung mit der mittleren Prozentanteile der Mischungskomponenten als Nenner und dem dazugehörigen D-Wertes als Teiler ausgedrückt (in Anlehnung an Miles, 1963).

Diese angepasste Varianzberechnung kann nun in der Toleranzberechnung und in der Anpassung des H-Wert-Testes angewendet werden.

## 6. Toleranzberechnung

Nach dem Schritt der Anpassung der Varianzberechnung kann nun die Berechnung der Toleranzen auf die erhöhte Varianz angepasst werden. Die ausführliche Zerlegung der Varianzkomponenten dient nun dazu, in der Toleranzberechnung

Toleranztabellen für verschiedenste Probenahmeprotokolle berechnen zu können. Nach Miles (1963) wird ein Toleranzwert an Hand der Wurzel der erwarteten Varianz und einem t-Wert berechnet. Hierbei unterscheidet Miles, ob die Toleranz zwei Messwerte oder einen Messwert und eine Deklaration erfassen soll. In diesem Projekt ging es vornehmlich um den Vergleich zu einer Deklaration.

$$T = t * \sqrt{V}$$

T: Toleranz für den Vergleich einer Deklaration und einem Reinheitsergebnis

t: t Wert (hier verwendet: zweiseitig; alpha = 0,05)

V: erwartete Varianz

Diese Methode wurde für art-reine Ware angewendet, nicht bei Mischungen. Nach Miles (1963) werden bei Mischungen die einzelnen Mischungskomponenten für sich und nicht als Ganzes geprüft. Eine andere Strategie gingen daher Gregoire und Barabas (2004). Sie berechnen nicht für jede Mischungskomponente einzeln die Toleranz, sondern beurteilen die Mischung mit allen Mischungskomponenten insgesamt. Dieser Test basiert auf der Aufsummierung der Chi<sup>2</sup>-Abweichungen zwischen erwarteter und beobachteter Anzahl an Samen der einzelnen Mischungskomponenten. Die Berechnungsweise von Gregoire und Barabas (2004) basiert allerdings ausschließlich unter der Annahme, dass die Abweichung zur Deklaration nur von einer zufälligen Varianz abhängt. Die Berechnung der Varianzkomponenten in diesem Projekt zeigt dagegen, dass nicht nur Zufallseffekte die Probenuntersuchung beeinflussen. Zur Korrektur dieses Mehr an Varianz muss ein Korrekturfaktor A in der Berechnung nach Gregoire und Barabas (2004) eingefügt werden.

$$\chi^2 = \sum \frac{(n - pn_0)^2}{\frac{A}{pn_0}}$$

n: Anzahl Samen

n<sub>0</sub>: Anzahl Samen in der Untersuchungsprobe

p: Anteil der Mischungskomponenten in der Mischung (Deklaration)

A: externer Korrekturfaktor



Zur Überprüfung der neuen Toleranzberechnung wurden jeweils die Mittelwerte der 20 Proben der 31 beprobten Partien mit der Deklaration verglichen. Weiter wurden verschiedene ISTA Labore aufgerufen, Reinheitsergebnisse von Saatgutmischungen nach Hohenheim zu schicken. Insgesamt wurden von 43 Partien Ergebnisse von diesen Laboren nach Hohenheim geschickt. Da keine Informationen über die tatsächliche Probenahmeintensität vorhanden waren, wurden bei diesen Partien dieselben Parameter ( $n$  und  $N$ ) verwendet, wie bei der Toleranzberechnung für die 31 Partien aus dem Heterogenitätstest. Ebenfalls ist nicht bekannt, wie groß die Untersuchungsprobe war. Angenommen wurde aus diesem Grund die durchschnittliche Samenanzahl aus den Heterogenitätstests.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

#### 1. Umfrage zu Saatgutmischungen

Insgesamt wurden 17.075 Mischungsanträge (= Mischungspartien) der zwei Wirtschaftsjahre mit einer Gesamtmasse von über 63.000 t erfasst. Von diesen wurden nach einer ersten Plausibilitätskontrolle 721 Anträge auf Grund von Unstimmigkeiten, fehlenden Angaben oder aufgrund von mehr als 12 Komponenten herausgenommen. Weiterhin wurden 143 Mischungsanträge mit äußerst seltenen Kombinationen von zudem sehr seltenen Arten und weitere 1501 Mischungsanträge mit reinen Sortenmischungen einer Art aussortiert. Es verblieben 14.710 Mischungsanträge mit einer Gesamtmasse von etwa 50.000 t. Etwa 8600 Mischungsanträge stammten aus 2005/2006 und 8500 Mischungsanträge aus 2006/2007.

Tabelle 3 zeigt die Verteilung der 17.075 Mischungsanträge auf die deutschen Bundesländer. Schwerpunkte ergeben sich durch die Produktionsstandorte großer Mischungsbetriebe in Nordrhein-Westfalen, Bayern und Niedersachsen. Die 17.075 Mischungen wurden in insgesamt 53 Mischungsbetrieben in Deutschland erstellt.

**Tabelle 3:** Verteilung der 17.075 Mischungspartien auf die deutschen Bundesländer (nach Anzahl und Masse) der zwei Wirtschaftsjahre 2005/2006 und 2006/2007.

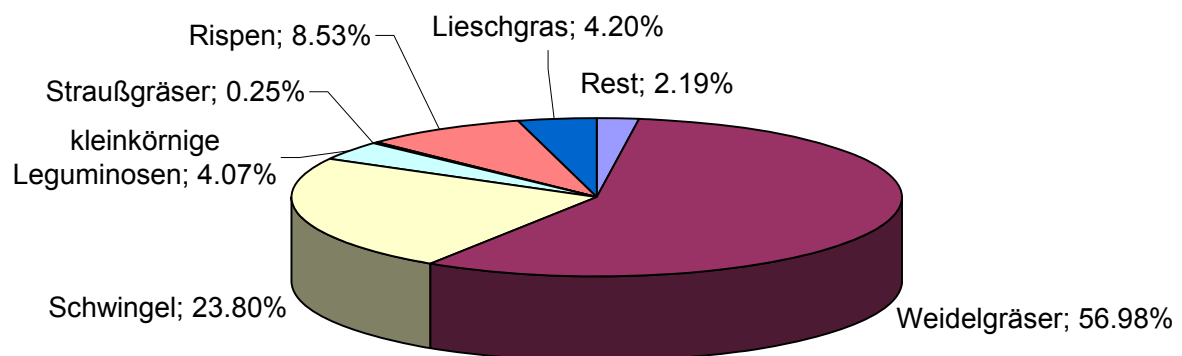
Bundesländer	Anzahl		Masse	
	Partien	(in %)	(in t)	(in %)
<b>Nordrhein-Westfalen</b>	7255	42,48 %	31.933	50,63 %
<b>Bayern</b>	2791	16,35 %	7322	11,61 %
<b>Niedersachsen</b>	2105	12,33 %	8873	14,07 %
<b>Baden-Württemberg</b>	1412	8,27 %	4397	6,97 %
<b>Rheinland-Pfalz</b>	1305	7,64 %	3267	5,18 %
<b>Schleswig-Holstein</b>	992	5,81 %	4475	7,09 %
<b>Brandenburg und Berlin</b>	621	3,64 %	1661	2,63 %
<b>Sachsen-Anhalt</b>	228	1,34 %	467	0,74 %
<b>Thüringen</b>	151	0,88 %	313	0,50 %
<b>Sachsen</b>	141	0,83 %	247	0,39 %
<b>Mecklenburg-Vorpommern</b>	46	0,27 %	105	0,17 %
<b>Hessen</b>	28	0,16 %	14	0,02 %
<b>Summe</b>	17.075	100 %	63.074	100 %

Fallweise sind Samen verschiedener Arten so ähnlich, dass sie im Rahmen einer Reinheitsuntersuchung nicht zweifelsfrei zugeordnet werden können (Bsp. Rot- und Schafschwingel; Deutsches und Welsches Weidelgras). Deshalb wurden diese Arten zu Arten-Gruppen zusammengefasst. Zur weiteren Vereinfachung der Analyse der Mischungszusammensetzungen wurden weitere Arten nach ihren Fließigenschaften, morphologischen Trennbarkeit in einer Reinheitsuntersuchung und der Bedeutung im Handel in Gruppen zugeordnet. Die Zuordnung der 23 wichtigsten Arten in die sechs Gruppen und ihre Massenanteile sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4:** Einteilung und Massenverteilung der Arten-Gruppen und der zugehörigen Arten in den bereinigten 14.710 Mischungsanträgen der zwei Wirtschaftsjahre.

Arten-Gruppen		Massen-
enthaltene Arten und Anteile innerhalb der Kategorie		anteil (in %)
<b>A</b>	Weidelgräser	56,98 %
	Deuts. Weidelgras ( <i>Lolium perenne</i> )	84,06 %
	Wiesenschwingel ( <i>Festuca pratensis</i> )	8,68 %
	Welsches bzw. Einj. Weidelgras ( <i>L. multiflorum</i> )	5,26 %
	Rohrschwingel ( <i>F. arundinacea</i> )	1,22 %
	Bastardweidelgras ( <i>L. x boucheanum</i> )	0,78 %
<b>B</b>	Schwingel	23,80 %
	Rotschwingel ( <i>F. rubra</i> )	94,40 %
	Schafschwingel ( <i>F. lemanii</i> bzw. <i>F. ovina</i> )	5,60 %
<b>C</b>	Rispen	8,53 %
	Wiesenrispe ( <i>Poa pratensis</i> )	97,20 %
	Gemeine Rispe und Hainrispe ( <i>P. trivialis</i> u. <i>P. nemoralis</i> )	2,74 %
	Einjährige Rispe ( <i>P. annua</i> )	0,05 %
<b>D</b>	kleinkörnige Leguminosen	4,07 %
	Rotklee ( <i>Trifolium pratense</i> )	37,90 %
	Weißklee ( <i>T. repens</i> )	30,08 %
	Luzerne ( <i>Medicago sativa</i> )	11,59 %
	Alexandrinerklee ( <i>T. alexandrinum</i> )	7,52 %
	Inkarnatklee ( <i>T. incarnatum</i> )	3,87 %
	Perserklee ( <i>T. resupinatum</i> )	3,83 %
	Schwedenklee ( <i>T. hybridum</i> )	2,53 %
	Hornschotenklee ( <i>Lotus corniculatus</i> )	1,71 %
	Gelbklee ( <i>M. lupulina</i> )	0,88 %
	Bokharaklee ( <i>Melilotus albus</i> )	0,08 %
<b>E</b>	Lieschgras	4,20 %
	Wiesenlieschgras ( <i>Phleum pratense</i> )	
<b>F</b>	Straußgräser	0,25 %
	Rotes Straußgras ( <i>Agrostis capillaris</i> )	89,53 %
	Weißes bzw. Flechtstraußgras ( <i>A. stolonifera</i> )	10,47 %
<b>R</b>	Sonstige Arten	2,19 %

Auf die drei Arten-Gruppen Weidelgräser, Schwingel und Rispen entfallen die größten Masseanteile der erfassten Mischungen (Tabelle 4, Abbildung 1). Auch innerhalb dieser Arten-Gruppen dominieren wenige Arten. In der Arten-Gruppe Weidelgräser dominiert das Deutsche Weidelgras mit 84,06 %, in der Arten-Gruppen Schwingel der Rotschwingel mit 94,40 % und in der Arten-Gruppen Rispen die Wiesenrispe mit 97,20 %. In der Kategorie kleinkörnige Leguminosen ist die Verteilung der Arten hingegen ausgeglichener. Von Bedeutung in dieser Arten-Gruppe sind der Rot- und der Weißklee.



**Abbildung 1:** Massenanteile (in %) der sechs Arten-Gruppen in den 14.710 Mischungsanträgen der zwei Wirtschaftsjahre.

Tabelle 5 gliedert den Datensatz nach der Anzahl der deklarierten Mischungskomponenten einschließlich Sorten. Zu sehen ist, dass der überwiegende Anteil der Mischungen aus vier bis sieben Mischungskomponenten besteht. Ein Unterschied zwischen der Anzahl der Parteien und der Gesamtmasse ist nicht zu sehen.

**Tabelle 5:** Verteilung der 14.710 Mischungspartien nach Anzahl der deklarierten Mischungskomponenten einschließlich Sorten (Masse und Anzahl).

<b>Anzahl Komponenten</b>	<b>Anzahl Partien</b>	<b>(in %)</b>	<b>Masse (in t)</b>	<b>(in %)</b>
2	305	2,07 %	576	1,15 %
3	1191	8,10 %	3799	7,56 %
4	2603	17,70 %	9445	18,80 %
5	3245	22,06 %	11059	22,02 %
6	2746	18,67 %	8566	17,05 %
7	2117	14,39 %	6853	13,64 %
8	983	6,68 %	3396	6,76 %
9	574	3,90 %	1992	3,96 %
10	355	2,41 %	1343	2,67 %
11	346	2,35 %	1896	3,77 %
12	245	1,67 %	1311	2,61 %

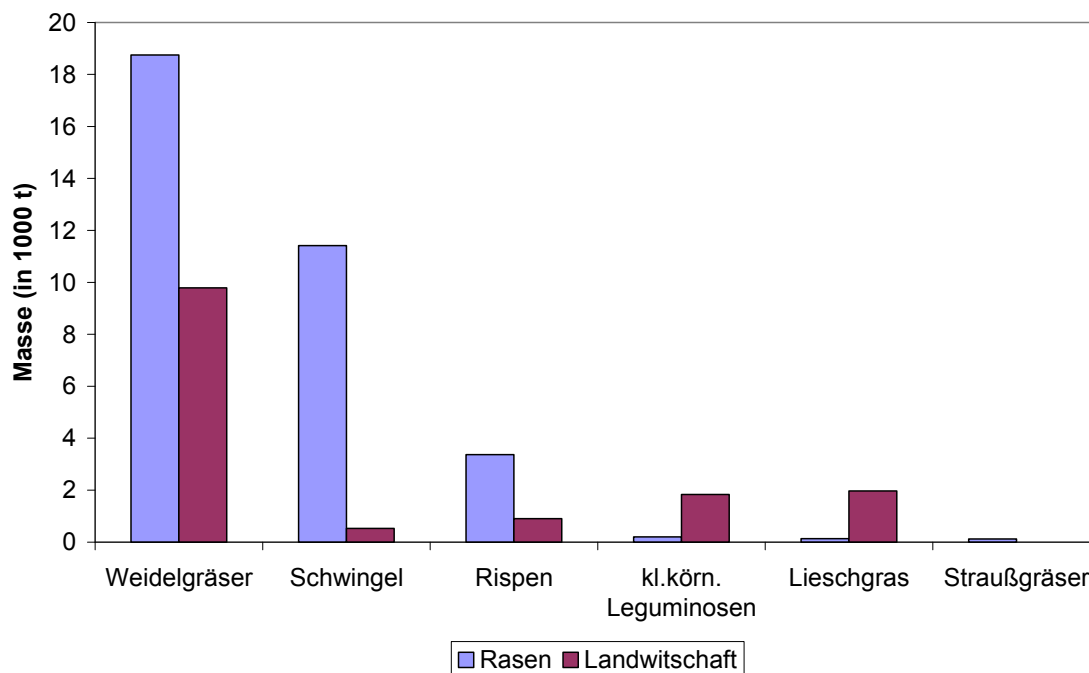
Die Berücksichtigung der Arten und Sorten in der Darstellung gibt die Komplexität der erstellten Mischungen wieder. Um allerdings den allgemeinen Charakter der Mischungen zu erhalten, muss die Einteilung der Arten in die Arten-Gruppen verwendet werden. Bei der Einteilung wurden ähnliche Arten und zwangsläufig auch Sorten zusammengefasst. Der überwiegende Anteil der Mischungen besteht aus Arten, die zwei bis vier Arten-Gruppen zuzuordnen sind (Tabelle 6). Die Arten, die nicht in den Arten-Gruppen enthalten sind, wurden hierbei nicht berücksichtigt.

**Tabelle 6:** Verteilung der 14.710 Mischungspartien nach Anzahl der definierten Arten-Gruppen, die in der Mischung vertreten sind (Anzahl und Masse).

<b>Anzahl Gruppen</b>	<b>Anzahl Partien</b>	<b>(in %)</b>	<b>Masse (in t)</b>	<b>(in %)</b>
1	736	5,00 %	2101	4,18 %
2	3822	25,98 %	11525	22,94 %
3	7406	50,35 %	28603	56,94 %
4	1853	12,60 %	5376	10,70 %
5	862	5,86 %	2558	5,09 %
6	31	0,21 %	73	0,14 %

Die Aufteilung der Arten-Gruppen innerhalb der Mischungen getrennt nach den Verwendungszwecken „Rasen“ und „Landwirtschaft“ sind in Tabelle 7 und

Abbildung 2 aufgeführt. Nach dieser Auftrennung ist sichtbar, dass die beiden Arten-Gruppen D und E häufiger als Minorkomponenten im Handel mit landwirtschaftlichen Mischungen vorkommen. Bei Rasenmischungen wurden sie dagegen in der Regel nicht verwendet. Die Hauptgruppen Weidelgräser, Schwingel und Rispen werden in beiden Fällen häufig verwendet. Wobei die Arten-Gruppe Schwingel im Verhältnis wesentlich weniger in landwirtschaftlichen Mischungen genutzt wird. Ein weiterer Sonderfall bildet das Straußgras. Straußgras ist sehr feinsamig und wird auch deshalb nur in sehr geringer Menge gehandelt (~123 t entspricht 0,25 % der Gesamtmasse) aber dafür sehr häufig. 7,87 % der Mischungen enthielten Straußgras. Diese Mischungen werden hauptsächlich für spezielle Rasennutzungen verwendet, wie in Golfmischungen. In der Landwirtschaft werden Straußgräser in der Regel nicht verwendet (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Massenverteilung der sechs Arten-Gruppen in den 14.710 Mischungen aufgeteilt in die Verwendungszwecke Rasen und Landwirtschaft

Unterschiede zwischen den Verwendungszwecken zeigten sich auch bezüglich Partie- und Packungsgröße (Tabellen 7 und 8). Die Rasenmischungen werden wesentlich häufiger (10,72 %) in großen Partien (bis 10 t) als bei landwirtschaftlichen Mischungen (3,30 %) hergestellt. In der Landwirtschaft werden hauptsächlich größere Packungen verwendet. Die kleineren oder Kleinst-Packungen, wie sie in

jedem Baumarkt zu finden sind, werden häufiger bei den Rasenmischungen gefunden.

**Tabelle 7:** Verteilung der 14.710 Mischungspartien nach Verwendungszweck und Partiegroße (Anm.: die gesetzlich vorgeschriebene maximale Partiegroße beträgt 10 t).

<b>Verwendungszweck Partiegroße</b>	<b>Anzahl Partien</b>	<b>(in %)</b>	<b>Masse (in t)</b>	<b>(in %)</b>
<b>Rasen</b>				
< 1,0 t	3012	20,48 %	1228	2,44 %
1,0 – 4,9 t	4014	27,29 %	8844	17,61 %
5,0 – 9,9 t	1342	9,12 %	8453	16,83 %
10 t	1577	10,72 %	15.866	31,58 %
<b>Summe</b>	<b>9.945</b>	<b>67,61 %</b>	<b>34.392</b>	<b>68,46 %</b>
<b>Landwirtschaft</b>				
< 1,0 t	1234	8,39 %	596	1,19 %
1,0 – 4,9 t	2103	14,30 %	4458	8,87 %
5,0 – 9,9 t	854	5,81 %	5714	11,38 %
10 t	485	3,30 %	4913	9,78 %
<b>Summe</b>	<b>4.676</b>	<b>31,79 %</b>	<b>15.681</b>	<b>31,22 %</b>
<b>unbekannt</b>	<b>89</b>	<b>0,61 %</b>	<b>162</b>	<b>0,32 %</b>



**Tabelle 8:** Verteilung der 14.710 Mischungspartien nach Verwendungszweck und Packungsgröße (\* einschließlich big bags).

<b>Verwendungszweck Packungsgröße</b>	<b>Anzahl Partien</b>	<b>Anteil (in %)</b>	<b>Masse (in t)</b>	<b>Anteil (in %)</b>
<b>Rasen</b>				
< 1kg	2367	16,09 %	7733	15,39 %
1 bis 10 kg	5345	36,34 %	17.720	35,27 %
> 10 kg*	1780	12,10 %	6369	12,68 %
unbekannt	453	3,08 %	2570	5,11 %
<b>Summe</b>	<b>9.945</b>	<b>67,61 %</b>	<b>34.392</b>	<b>68,46 %</b>
<b>Landwirtschaft</b>				
< 1kg	21	0,14 %	21	0,04 %
1 bis 9,9 kg	1947	13,24 %	6928	13,79 %
> 10 kg*	2708	18,41 %	8732	17,38 %
unbekannt	0	0,00 %	0	0,00 %
<b>Summe</b>	<b>4.676</b>	<b>31,79 %</b>	<b>15.681</b>	<b>31,22 %</b>
<b>unbekannt</b>	<b>89</b>	<b>0,61 %</b>	<b>162</b>	<b>0,32 %</b>

Für die Auswahl repräsentativer Mischungen können die Einzelkomponenten oder Arten-Gruppen nicht herangezogen werden, sondern die Kombinationshäufigkeiten der Arten-Gruppen. Acht Mischungskombinationen bzw. Mischungsklassen („Klassen“) wurden deshalb definiert (Tabelle 9). Alle Mischungskombinationen wurden auf diese Klassen verteilt. Nur die Arten in den Arten-Gruppen wurden dabei berücksichtigt. Weiter wurde die Höhe der Mischungsanteile der einzelnen Arten-Gruppe nicht berücksichtigt. Wegen der großen Ähnlichkeit in Form und Größe der Samen wurden die Arten-Gruppen Weidelgräser (A) und Schwingel (B) als eine Gruppe aufgefasst. Die Arten-Gruppe Rispen wurden nur bei der Unterscheidung zwischen den Klassen 1 und 2 berücksichtigt.

Die Verteilung der verschiedenen Kombinationen der sechs Arten-Gruppen in den Mischungen ist komplex. Am häufigsten traten Kombinationen der drei Arten-Gruppen Weidelgräser (A), Schwingel (B) und Rispen (C) mit 48,59 % (Klasse 1) auf. Es folgt die Kombination der beiden Arten-Gruppen Weidelgräser (A) und Schwingel (B) mit 16,15 % (Klasse 2) und die Kombination der fünf Arten-Gruppen Weidelgräser

(A), Schwingel (B), Rispen (C), kleinkörnige Leguminosen (D) und Wiesenlieschgras (E) mit 14,91 % (Klasse 3). Alle weiteren Kombinationen traten jeweils nur mit geringeren Häufigkeiten auf.

An Hand dieses Ergebnisses wurden 25 repräsentative Partien auf die Klassen aufgeteilt (Tabelle 9). Das Ergebnis der rein rechnerischen Verteilung nach der Häufigkeit der Klassen zeigt eine nicht sinnvolle Verteilung. Durch die Dominanz der Klassen 1 und 2 entsteht ein enormes Ungleichgewicht. Nur drei Klassen würden in genügender Wiederholungszahl (>2) beprobt werden. Von den restlichen Klassen würden dagegen nur wenige Partien beprobt werden. Dieses Ungleichgewicht würde zu Verzerrungen bei der Auswertung führen. Voraussetzung für eine sinnvolle Auswertung sind genügend viele Partien (in der Regel drei) je Klasse. Im ersten Schritt mussten Partien bei den wichtigsten Klassen reduziert werden. Die Anzahl der zugeteilten Partien der Klassen 1 wurde daher um ein Drittel von 12 auf acht Partien reduziert. Weiter wurden drei Klassen vollständig gestrichen. Nach dieser Reduktion wurden die frei gewordenen Partien auf die anderen Klassen verteilt. Die Klasse 6 und 5 wurden auf drei Partien aufgestockt. Die restlichen fünf Partien wurden auf die Klassen 3 und 4 nach den Massenanteilen der Arten-Gruppen verteilt.

**Tabelle 9:** Aufteilung von 25 zu beprobenden Mischungen auf die häufigsten Kombinationen der Arten-Gruppen (Klassen).

<b>Klasse</b>	<b>Arten-Gruppen</b>	<b>Masse-anteil</b>	<b>theor. Anzahl</b>	<b>endg. Anzahl</b>
1	A/B, C	48,59 %	12	8
2	A/B	16,15 %	4	-
3	A/B, C, D, E	14,91 %	4	7
4	A/B, C, E	9,79 %	2	4
5	A/B, D	5,28 %	1	3
6	A/B, C, F	3,89%	1	3
7	A/B, C, D, E, F	0,16 %	0	-
8	Sonstige	1,23 %	0	-
<b>Summe</b>		100 %	25	25

## 2. Entwicklung einer Bildanalyse-gestützten Schnell-Methode

Die Untersuchung von Proben soll mit einer bildanalyse-gestützte Schnell-Methode wesentlich beschleunigt werden. Arten mit Samen, die morphologisch gut unterscheidbar sind, sollen für diesen Zweck verwendet werden. An Hand der Lerndatensätze soll nun mit zwei verschiedenen SAS-Prozeduren die Wahrscheinlichkeiten bzw. die Möglichkeit die Arten richtig zu klassifizieren getestet werden. Für eine Vorauswahl an Arten, die durch die SAS-Prozeduren klassifiziert werden sollen, wurde die Cluster-Analyse durchgeführt. Die Arten wurden dazu paarweise verglichen. Die Trennungswahrscheinlichkeiten in Tabelle 10 zeigen, dass nicht alle Kombinationen von Arten gut voneinander trennbar sind.

**Tabelle 10:** Trennungswahrscheinlichkeit verschiedener Arten (in %) an Hand der Lerndatensätze mit Hilfe der Cluster-Analyse aus dem Statistik Softwarepaket SAS (Canonische Korrelation 1).

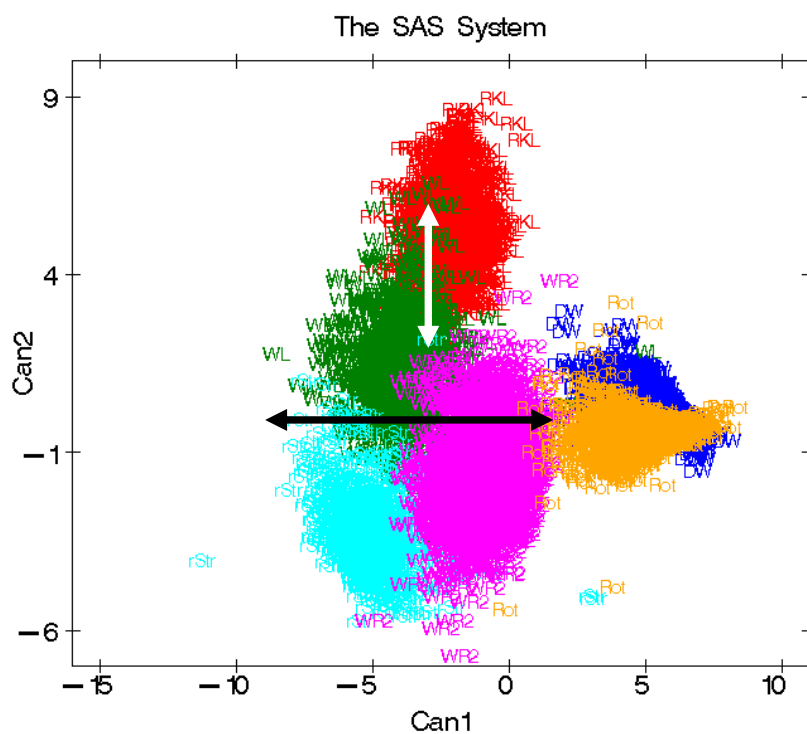
	DW	Rot	SSC	WR1	WL	RKL	WKL	L	rStr	GL	KN
<b>Rot</b>	82,0										
<b>SSC</b>	80,9	58,3									
<b>WR1</b>	93,9	93,6	91,1								
<b>WL</b>	97,6	97,8	97,4	86,6							
<b>RKL</b>	98,4	98,8	98,3	93,6	87,9						
<b>WKL</b>	98,8	99,0	98,8	96,4	84,9	93,1					
<b>L</b>	97,6	98,4	97,8	91,6	87,7	49,8	93,6				
<b>rStr</b>	98,9	98,2	97,5	92,3	90,6	97,3	94,9	97,2			
<b>GL</b>	74,9	85,1	87,7	93,3	97,2	98,3	98,6	97,7	98,4		
<b>KN</b>	82,3	53,6	34,2	91,7	97,5	98,5	98,9	98,2	97,0	86,7	
<b>WFU</b>	82,4	90,6	84,1	91,8	97,4	97,7	98,7	96,3	98,9	87,3	87,9

**Grün:** Trennungswahrscheinlichkeit über 97 %

**Gelb:** ausgewählte Artenkombination für die Überprüfung der Klassifizierung

In der Abbildung 3 ist graphisch gut die Gruppierung der verschiedenen Arten sichtbar. Die „Punktwolken“ einiger Arten liegen eng beieinander, andere sind weit

auseinander. Zwei Messparameter beeinflussen die Klassifizierung am stärksten. Der weiße Pfeil in der Abbildung 3 verdeutlicht die Richtung des Gradienten „rund“ (von länglich zu rund: siehe rStr → RKL) wobei der schwarze Pfeil den Gradient der Länge der Samen oder der Fläche darstellt (von kurz zu lang: siehe rStr → DW). Die Wiesenrispe sitzt in der Abbildung 3 in der Mitte zwischen den zwei Gruppen. Oberhalb angesiedelt sind der Rotklee und das Wiesenlieschgras, an der Seite sind das Deutsche Weidelgras und der Rotschwengel. Die Trennungswahrscheinlichkeit bestätigt diese Gruppierung. Keine Art hat mit der Wiesenrispe eine Trennungswahrscheinlichkeit über 97 %. Dagegen können die länglichen Gräser von den Arten mit runden Samen, wie Wiesenlieschgras und Rotklee, sehr gut unterschieden werden. Nur wiederum untereinander sind die Trennungswahrscheinlichkeiten geringer.



**Abbildung 3:** Graphische Darstellung der Klassifizierung verschiedener Arten mit Hilfe der Cluster-Analyse aus dem Statistik Softwarepaket SAS (Canonische Korrelation 1 und 2; weißer Pfeil: Messparameter „Form“ von länglich zu rund: rStr → RKL; schwarzer Pfeil: „Größe“ von klein zu groß: rStr → DW).

Vier Arten wurden für die weiteren Test auf Grund ihrer morphologischen Eigenschaften und somit der besseren Trennungswahrscheinlichkeiten ausgewählt:

das Deutsche Weidelgras, der Rotklee, das Wiesenlieschgras und das Rote Straußgras.

Für die Klassifizierung einer „unbekannten“ Probe in den späteren Versuchen wird eine mathematische Formel zur Erkennung benötigt. Diese Formel verrechnet die erfassten Formparameter aus dem Programm ImageJ und gibt einen Wert aus, der die Zugehörigkeit eines Samens zu einer Art bestimmt. Zur Berechnung dieser Formel wurde die logistische Regression verwendet. Nachteil dieser Berechnungsweise ist, um eine höhere Genauigkeit zu erhalten, muss für jede Fall bzw. Mischungskombination separat eine Formel berechnet werden.

Vor dem eigentlichen Tests mit realen Proben wurde die Formel an denselben Lerndatensätzen, die für die Berechnung der Formel verwendet wurden, auf Plausibilität getestet. Im Idealfall sollten keine Abweichler vorkommen, also 100 % Erkennung. In Tabelle 11 ist dieser Rücktest abgebildet mit der Soll-Anzahl der eingescannten Samen und der Differenz nach der Klassifizierung. Die Abweichungen sind sehr gering. Nur bei dem Wiesenlieschgras der 4er Mischung sind mehrere Samen falsch als Wiesenlieschgras klassifiziert wurden (Anmerkung: Mehrfachklassifizierungen waren möglich).

**Tabelle 11:** Rückkontrolle der berechneten Klassifizierungsformeln mit dem Lerndatensatz („fiktive“ Mischungen).

	Soll-Wert (Anzahl)				Differenz (Anzahl) mit der berechneten Anzahl			
	DW	RKL	WL	rStr	DW	RKL	WL	rStr
4er Mischung	1150	985	1259	944	0	-5	44	-3
3er Mischung 1	1150	985	1259		0	-5	-1	
3er Mischung 2	1150	985		944	0	0		0
3er Mischung 3	1150		1259	944	0		3	-3

Nach Ende der ersten Tests mit richtigen Proben, wenngleich aus Modellmischungen bestehend, zeigten erhebliche Probleme der Erkennung (Tabelle 12). In allen Mischungen oder Varianten ist mindesten eine Mischungskomponenten signifikant vom Soll-Wert verschieden bzw. zeigt eine zu hohe Streuung ( $\alpha = 0,05$ ). Die Abweichungen sind bis zu 3 % von dem Soll-Wert verschieden (Mischung 3; DW).

**Tabelle 12:** Ergebnisse der Probenuntersuchung mit Hilfe der Schnell-Methode mit verschiedenen Modellmischungen (à 3,5 g; \* signifikant mit alpha = 0,05).

Mischungs- typ	Art	Soll-Wert (in %)	□ (in %)	Varianz
<b>Mischung 4</b> Variante 1	DW	70	70,22	0,87
	RKL	10	10,14	0,84
	WL	10	9,18*	0,59
	rStr	10	10,47	0,74*
<b>Mischung 4</b> Variante 2	DW	70	68,82	16,84*
	RKL	10	7,71*	6,43*
	WL	10	12,08*	5,81*
	rStr	10	11,40	14,77*
<b>Mischung 2</b>	DW	80	78,96*	0,94*
	RKL	10	11,35*	0,80
	rStr	10	9,69	0,53*
<b>Mischung 4</b>	DW	40	39,10*	0,21
	RKL	20	21,91*	0,34
	WL	20	19,26*	0,01
	rStr	20	19,74	0,08
<b>Mischung 3</b>	DW	60	57,05*	0,93
	RKL	20	21,91*	1,61
	WL	20	21,04*	0,16
<b>Mischung 2</b>	DW	60	58,43*	0,07
	RKL	20	21,82*	0,04
	rStr	20	19,74*	0,02
<b>Mischung 1</b>	DW	60	60,03	0,31
	WL	20	19,54*	0,11
	rStr	20	20,44	0,27

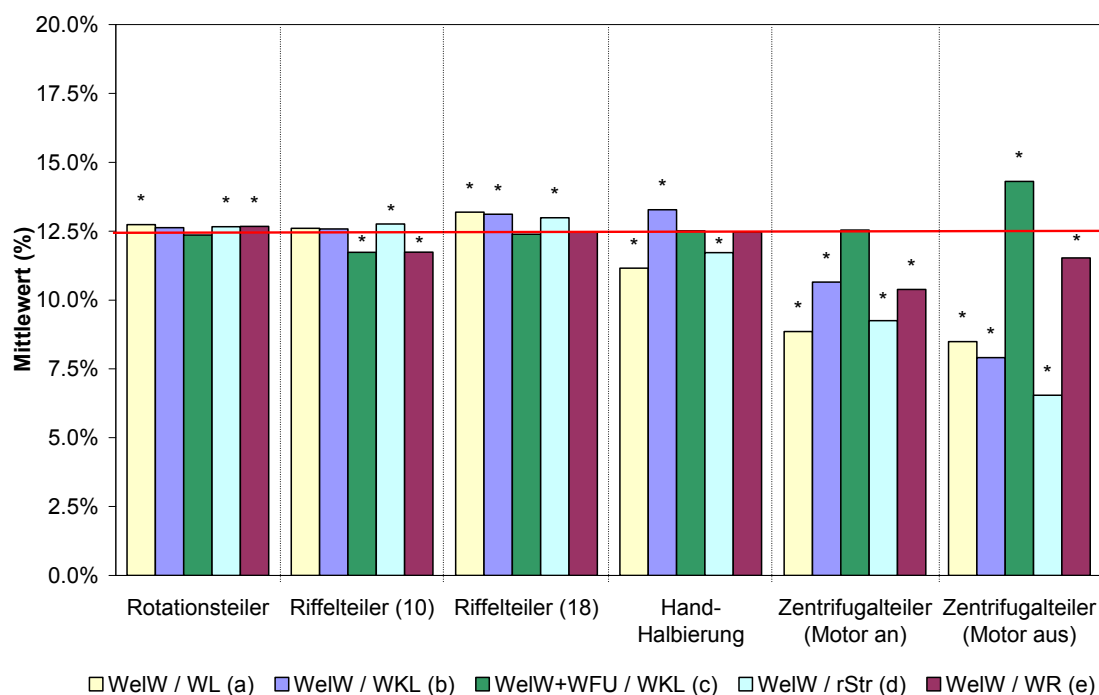
Im nächsten Test trat die Schnell-Methode gegen Proben und den dazugehörigen bereits erfassten Ergebnisse einer normalen Reinheitsuntersuchung an. Die neue Schwierigkeit hierbei ist, dass die Samen der Lerndatensätze aus einer anderen Saatgutcharge stammten. Die Samen einer Art können sich je nach Charge unterscheiden. Durch die leichten Unterschiede der Samen einer Art ist es für die

Klassifizierungsformel nun schwieriger die hohe Trennungswahrscheinlichkeit zu erreichen. Die Reinheitsuntersuchung der 20 Proben der Partie 10 ergab im Mittel 57,39 % Weidelgras und 42,61 % Rotklee (nur Fraktion reiner Samen). Die Ergebnisse der Schnell-Methode ergab im Mittel 59,05 % Weidelgras und 40,95 % Rotklee. Die absoluten Differenzen zwischen den Ergebnissen der Schnell-Methode und der Reinheitsuntersuchung waren im Mittel mit 1,90 % sehr hoch. Der t-Test dagegen zeigte keine signifikanten Abweichungen. Eine zweite Möglichkeit der Bestimmung der tolerierbaren Unterschiede bietet in diesem Fall die Toleranztabelle 3C der ISTA-Vorschriften (ANONYMUS 2008). Die Spanne zwischen den Untersuchungsergebnissen von drei der 20 Proben war höher als die Toleranz erlaubt.

### 3. Test geeigneter Probenahmegeräte für die Beprobung von Saatgutmischungen

#### 3.1. Probeteiler:

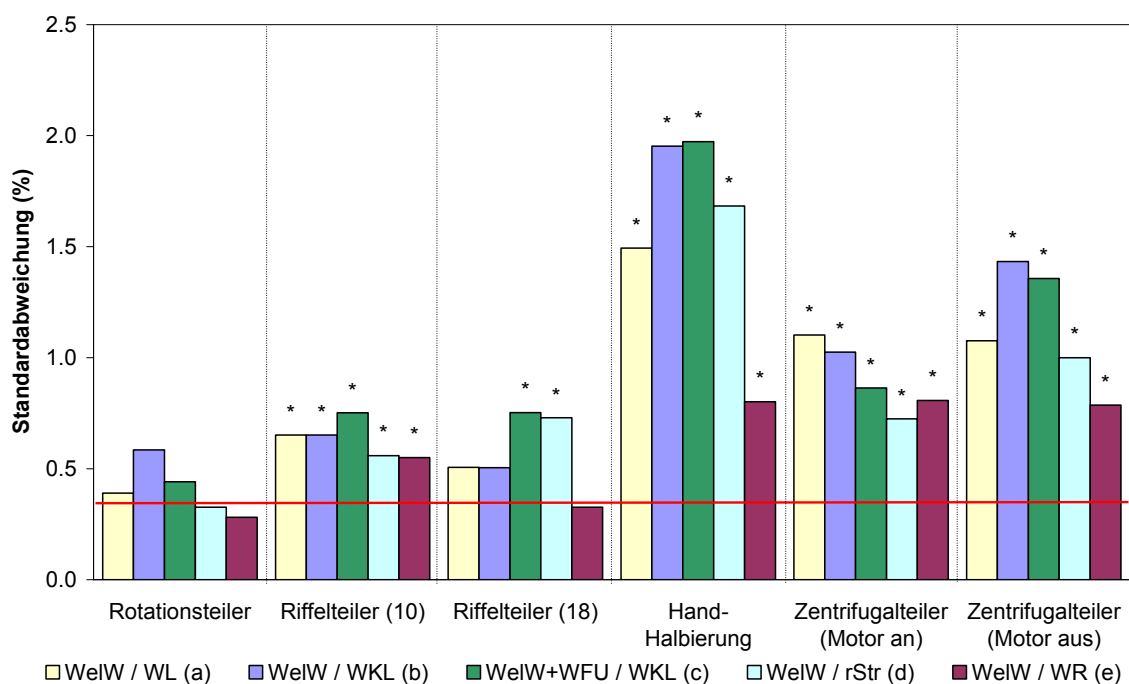
Die erste Möglichkeit um geeignete von ungeeigneten Probenahmegeräten zu unterscheiden ist die Treffgenauigkeit oder anders ausgedrückt wie nah sind die beobachteten Ergebnisse am wahren Wert der Mischung. Die mit den Probeteilern erreichten Treffgenauigkeiten sind in Abbildung 4 dargestellt. Aufgetragen sind die mittleren Anteile der fein-samigen Komponenten für alle Probeteiler und Mischungen. Der wahre Anteil dieser Komponente betrug jeweils 12,5 %. Der Rotations- und die Riffelteiler zeigen nur geringe Abweichungen vom wahren Wert. Einzelne signifikante Abweichungen sind gleichmäßig auf allen Mischungen verteilt. Signifikante Abweichungen vom wahren Wert gab es hauptsächlich bei der Handhalbierung und dem Zentrifugalteiler. Bei diesen drei Teilern wirken sich zusätzlich die verschiedenen Mischungen differenzierter aus. Wie bereits erwartet hat der Wiesenfuchsschwanz durch seine schlechte Fließeigenschaft die Werte für den Weißklee beeinflusst. Die Werte liegen näher am Soll-Wert (12,5 %) als ohne Wiesenfuchsschwanz. Weiter sind die Abweichungen der Wiesenrispen-Mischungen geringer als die Abweichungen der Straußgras-Mischung. Der Effekt der Größenunterschiede der Samen ist hier sichtbar.





**Abbildung 4:** Mittelwerte der fein-samigen Komponente der sechs verschiedenen Probeteilungsverfahren (\* = signifikant vom wahren Wert 12,5 % (rote Linie) verschieden bei alpha = 0,05).

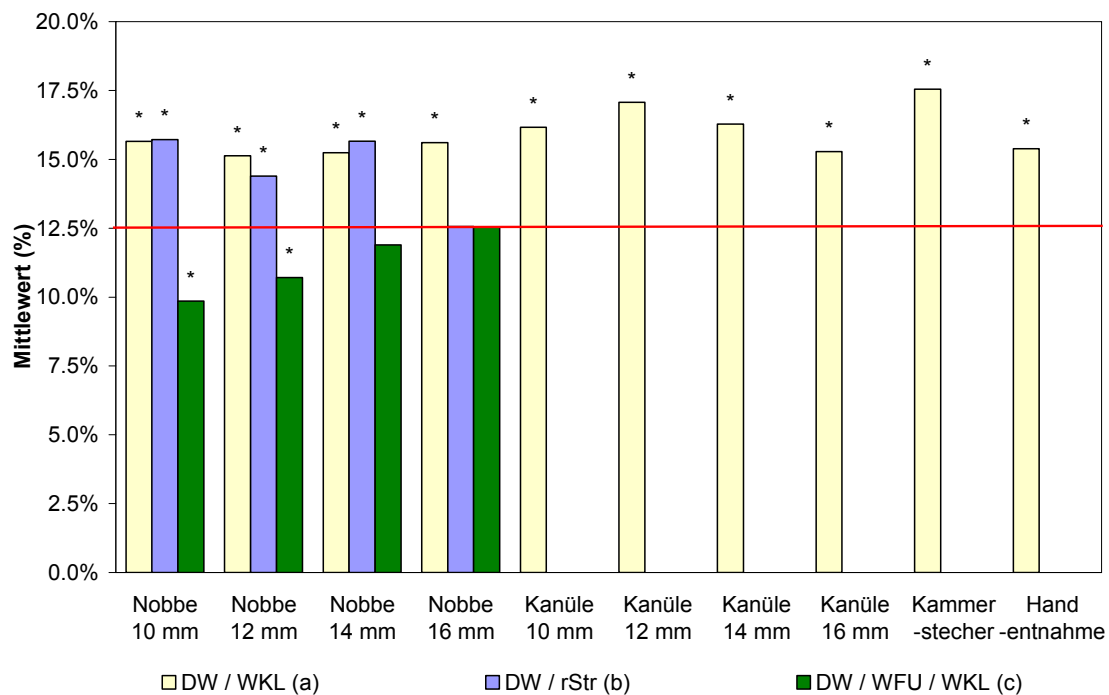
Eine repräsentative Probe ist dadurch definiert, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Bestandteil in ihr vertreten ist, nur durch die Häufigkeit seines Auftretens in der Partie bestimmt werden darf. Also muss eine Probe einer Zufallsstichprobe entsprechen. Deshalb muss zusätzlich zur Treffgenauigkeit der Probenahme auch deren Wiederholgenauigkeit bewertet werden. Für die Wiederholgenauigkeit wurde die beobachtete Standardabweichung mit der erwarteten Standardabweichung verglichen. Die erwartete Standardabweichung entspricht einer Zufallsstichprobe nach der Binomial-Verteilung und wurde nach der Formel von Kruse (1996) berechnet. Besonders die Handhalbierung sticht bei der Höhe der Standardabweichung heraus (Abbildung 5). War die Treffgenauigkeit dieser Methode noch vergleichsweise gut, so ist die Wiederholgenauigkeit der Handhalbierungsmethode mit Abstand die Schlechteste. Auch der Zentrifugalteiler zeigte eine unzureichende Wiederholgenauigkeit. Allein der Rotationsteiler zeigte keine signifikant höhere Streuung über alle Mischungen hinweg und damit eine exzellente Wiederholgenauigkeit.



**Abbildung 5:** Wiederholgenauigkeit an Hand der beobachteten Standardabweichung der verschiedenen Probeteilungsverfahren (rote Linie = mittlere erwartete Standardabweichung; \* = signifikant höhere Streuung als die erwartete Standardabweichung bei  $\alpha = 0,05$ ).

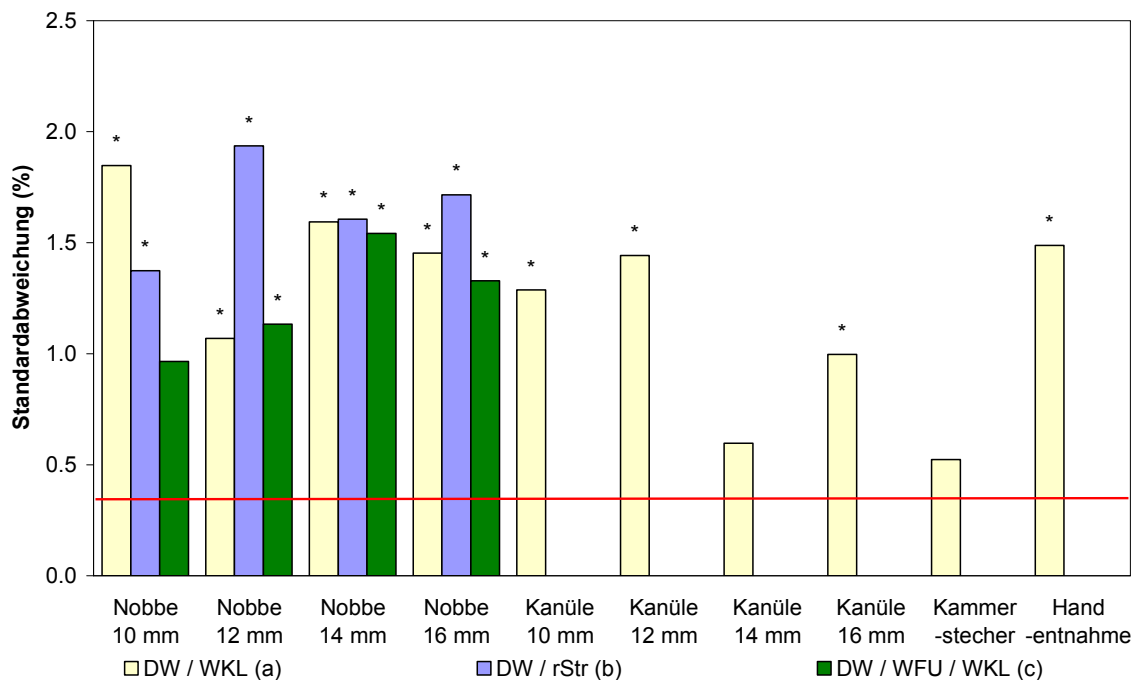
### 3.2. Probestecher:

Für die ersten Tests wurde nach dem Protokoll aus der Diplomarbeit von Herrn Spretnjak (2010) gearbeitet, die im Rahmen dieses Projektes durchgeführt wurde. Die untersuchte Treffgenauigkeit der verschiedenen Probestecher und Probenahmemethoden weicht sehr häufig signifikant vom Soll-Wert ab (Abbildung 6). Nur bei drei Kombinationen von Mischung und Probestecher waren die Abweichungen zwischen Mittelwert und wahren Wert nicht signifikant. Alle übrigen Abweichungen waren signifikant.



**Abbildung 6:** Mittelwerte der fein-samigen Komponente der zehn verschiedenen Probenahmemethoden unter Verwendung des ersten Mischungsprotokolls (\* = signifikant vom wahren Wert 12,5 % (rote Linie) verschieden bei  $\alpha = 0,05$ ).

Auch bei der Wiederholgenauigkeit waren mit Ausnahme von drei Kombinationen die beobachteten Standardabweichungen signifikant höher als die theoretische Standardabweichung (Abbildung 7).

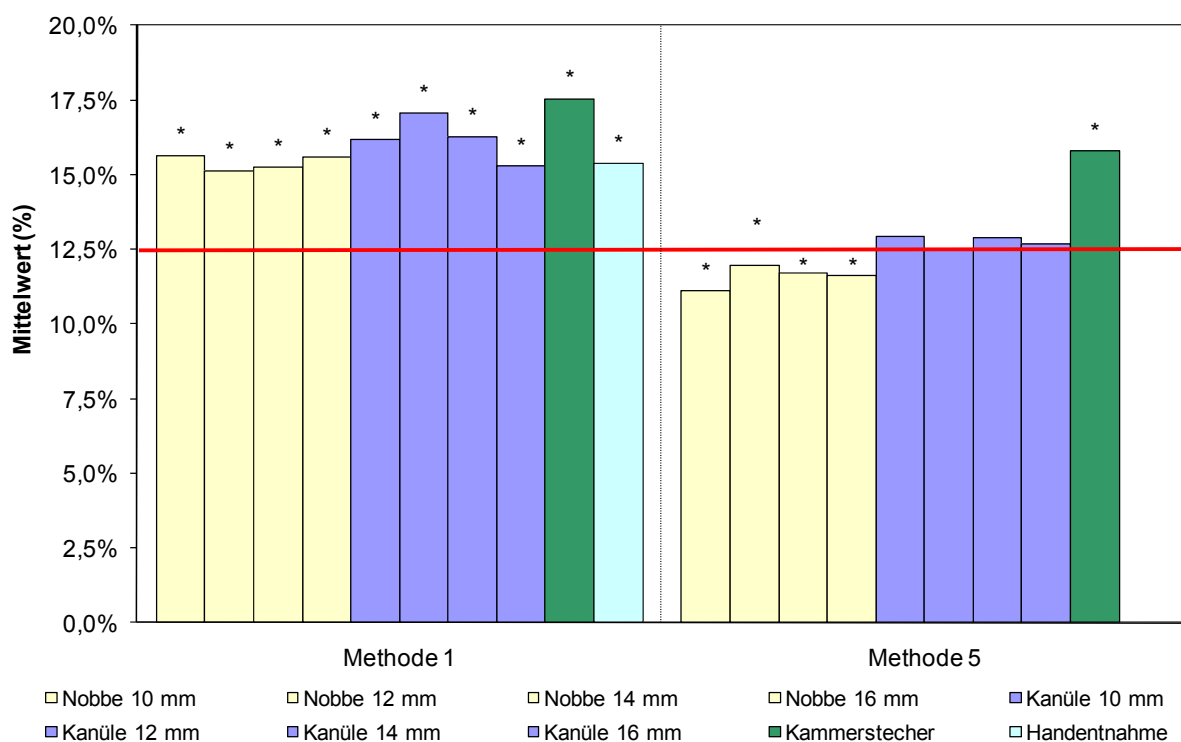


**Abbildung 7:** Wiederholgenauigkeit an Hand der beobachteten Standardabweichung der verschiedenen Probenmemethoden unter Verwendung des ersten Mischungsprotokolls (rote Linie = mittlere erwartete Standardabweichung; \* = signifikant höhere Streuung als die erwartete Standardabweichung bei  $\alpha = 0,05$ ).

Dieser erste Test der verschiedenen Probenmemethoden war nicht ermutigend. Keiner der Probesteher scheint für die Probenahme von Gräsersaatgutmischungen geeignet zu sein. Weitere Vortests sollten nun zeigen, ob durch die Mischungserstellung die Werte verschlechtert wurden oder die Probesteher alleine für die Abweichungen verantwortlich sind. Der ersten Schritt war die Zielrichtung, eine mögliche Heterogenität innerhalb des Stecherkastens ausfindig zu machen. Dazu wurde in verschiedene Richtungen eingestochen, jeweils mit dem alten Protokoll und dem neuen Protokoll (= Variante 5). Dabei sind die Einstichvarianten „waagr.“ und „li/re“ in einer und derselben horizontalen Ebene. Die zwei Einstichvarianten zeigten erwartungsgemäß ähnliche Werte von 17,7 % und 18,5 % mit dem Kammerstecher. Die Einstichvariante „schräg“ nach oben führt anscheinend bei dem alten Protokoll durch mehrere horizontale Schichten und zeigt nur noch einen Wert von 15,7 %. Die Werte mit der neuen Mischungsvariante 5 zeigen bei der Einstichvariante „waagr.“ dagegen den Wert 16,3 % und bei der Einstichvariante „schräg“ von 15,0 %. Somit konnte die Differenz der horizontalen Schichten um fast

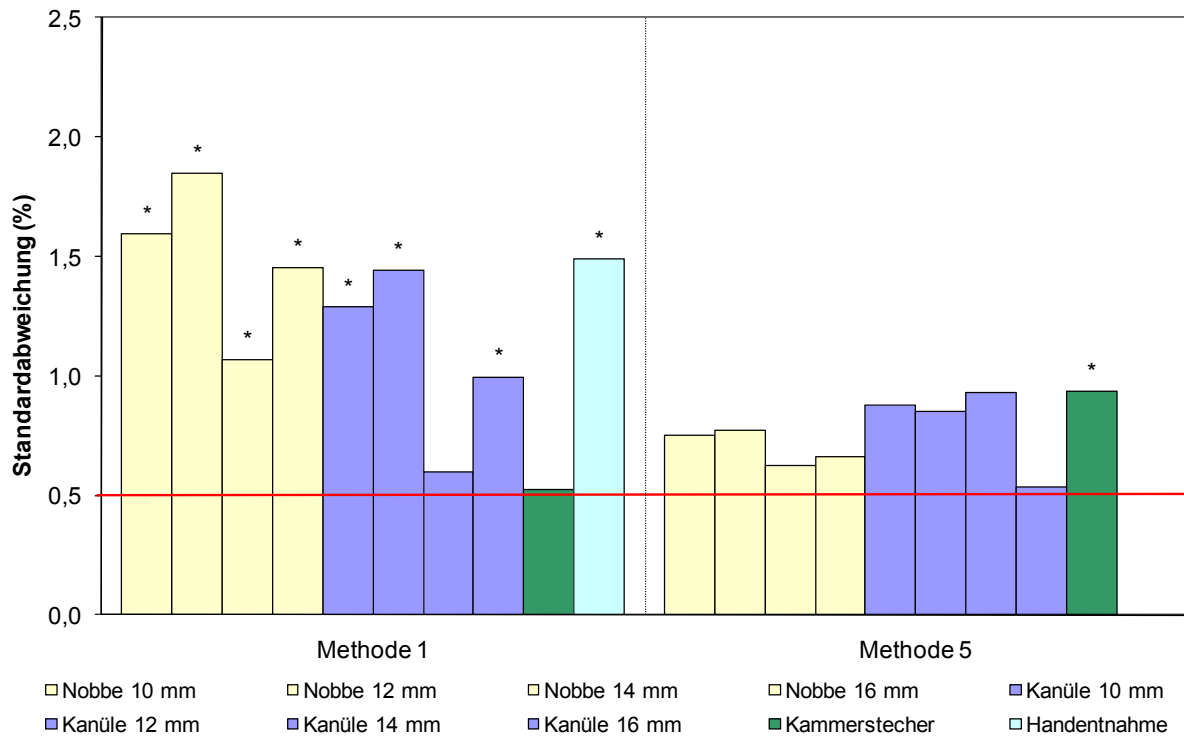
2 % reduziert werden. Auf die anderen untersuchten Varianten zur Erstellung der Mischungen wurden hier nicht weiter eingegangen.

Mit der neuen Mischungserstellung (= Variante 5) wurden alle Probestecher noch einmal getestet, aus Zeitgründen ausschließlich mit der Weissklee-Mischung (Mischung 1) und ohne die Handentnahme. In der Abbildung 8 sind die mittleren Ergebnisse der fein-samigen Komponente („Treffergenauigkeit“) der zwei Mischungsvarianten aufgezeigt. Die Ergebnisse zeigen deutlich die Unterschiede zwischen der alten und der neuen Mischungserstellung. Generell haben sich alle Werte reduziert und bei der neuen Mischungserstellung weicht keiner der Ergebnisse bei dem Kanülenstecher signifikant vom Soll-Wert 12,5 % ab. Bei dem Kammerstecher ist sichtbar, dass die Veränderungen relativ zu den anderen Probenahmemethoden geringer ausgefallen sind.



**Abbildung 8:** Vergleich der Mischungserstellungsvarianten (1 und 5) an Hand der Mittelwerte der fein-samigen Komponente und der verschiedenen Probenahmemethoden (\* = signifikant vom wahren Wert 12,5 % (rote Linie) verschieden bei alpha = 0,05).

Ebenfalls bei der Wiederholgenauigkeit sind Veränderungen aufgetreten. Die Kanülen- und die Nobbe-Probestecher zeigen keine erhöhte Standardabweichung (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Wiederholgenauigkeit an Hand der beobachteten Standardabweichung der verschiedenen Mischungserstellungsvarianten (1 und 5) und Probenahmemethoden (rote Linie = mittlere erwartete Standardabweichung; \* = signifikant höhere Streuung als die erwartete Standardabweichung bei alpha = 0,05).

### 3.3. Validierungsstudie

An Hand der Ergebnisse aus den Tests der Probenahme- und Probenteilungsmethoden wurden der Kanülenstecher sowie der Rotations- und der Riffelteiler für die Beprobung von Saatgutmischungen ausgewählt. Diese Geräte sollten nun in einer internationalen Validierungsstudie weiter geprüft werden. Zehn Labore in sieben Ländern nahmen an der Validierungsstudie teil und erhielten je drei Säcke einer definierten Mischung und einen Kanülenstecher. Diese Labore sandten die Ergebnisse der Reinheitsuntersuchungen ihrer Proben, den Resten der Untersuchungs- und der Erstproben zurück nach Hohenheim. Die Proben wurden daraufhin in Hohenheim noch einmal kontrolliert und den Rest der Erstprobe in die Mischungskomponenten getrennt. Die Ergebnisse der übermittelten Ergebnisse zeigen große Unterschiede zwischen den Laboren. Besonders die Labore 3, 4 und 5 zeigen eine erhöhte Streuung. Die Übersicht über die Ergebnisse ist in Tabelle 13 aufgelistet. Im Mittel wurde zu viel Weißklee in den Proben gefunden (13,1 % bis 13,2 %). Der Wert für das Deutsche Weidelgras stimmt mit dem Soll-Wert sehr gut überein. Der Rotschwengel dagegen liegt unter dem Soll-Wert (11,8 % bis 11,9 %).

**Tabelle 13:** Der Mittelwert (in Masse-%) und die Standardabweichung (in Klammern) der drei Mischungskomponenten aus der internationalen Validierungsstudie. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der Erstprobe, die übermittelten Ergebnisse der Untersuchungsproben und die überprüften Ergebnisse derselben Untersuchungsprobe.

		Erstprobe			übermitt. Untersuchungsergebnisse			überprüfte Untersuchungsprobe		
		<i>Festuca rubra</i>	<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	F. r.	L. p.	T. r.	F. r.	L. p.	T. r.
wahre Zusammensetzung		12,5	75	12,5						
Labor	1	11,9 (0,28)	75,8 (0,18)	12,3 (0,14)	11,3 (0,79)	75,9 (0,71)	12,7 (0,10)	11,3 (0,77)	75,9 (0,76)	12,8 (0,02)
	2	11,4 (0,19)	75,2 (0,36)	13,4 (0,55)	11,2 (0,27)	75,8 (0,56)	13,0 (0,80)	11,3 (0,31)	75,7 (0,53)	13,0 (0,82)
	3	11,8 (0,30)	73,9 (0,73)	14,3 (0,80)	11,9 (0,62)	73,1 (0,73)	15,0 (1,34)	11,4 (0,73)	73,7 (0,67)	14,9 (1,32)
	4	12,2 (0,65)	74,6 (1,34)	13,2 (1,28)	11,5 (0,92)	75,7 (1,80)	12,8 (1,52)	11,5 (0,92)	75,7 (1,82)	12,8 (1,50)
	5	11,4 (0,72)	75,9 (1,46)	12,6 (2,17)	12,2 (0,96)	75,9 (1,27)	11,9 (2,13)	12,1 (1,00)	76,0 (1,20)	11,9 (2,12)
	6	12,5 (0,28)	75,4 (0,69)	12,1 (0,95)	12,1 (0,91)	74,9 (1,04)	13,0 (0,92)	12,1 (0,72)	74,6 (0,37)	13,3 (0,37)
	7	11,4 (0,21)	75,0 (0,36)	13,6 (0,55)	11,4 (0,79)	75,1 (0,62)	13,5 (0,61)	11,5 (0,78)	75,0 (0,64)	13,5 (0,65)
	8	11,9 (0,08)	75,0 (0,11)	13,1 (0,20)	12,2 (0,89)	74,7 (0,49)	13,0 (0,61)	12,3 (0,90)	74,8 (0,48)	12,9 (0,55)
	9	11,9 (0,59)	74,9 (0,28)	13,3 (0,85)	12,5 (0,37)	74,5 (0,58)	13,0 (0,43)	12,5 (0,35)	74,5 (0,52)	13,0 (0,43)
	10	11,7 (0,11)	74,7 (0,40)	13,6 (0,33)	12,3 (0,53)	74,2 (0,78)	13,5 (0,72)	12,4 (0,62)	74,3 (0,88)	13,4 (0,77)
Mittelwert		11,8	75,0	13,2	11,9	75,0	13,1	11,8	75,0	13,1

#### 4. Heterogenitätsprüfung

Neben der Eignung der verschiedenen Probenahme und –teilungsmethoden ist die auftretende Varianz zwischen Proben einer Partie für ein Probenahmeprotokoll von Interesse. Für diesen Zweck wurden 31 Partien aus dem Handel beprobt. 28 dieser Partien wurden für die Varianz innerhalb der Partie und somit zwischen den Behältern ausgewählt. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse des Heterogenitätstests (nach ISTA 2008; für art-reine Ware) der einzelnen Untersuchungen (Reinheit, Mischungskomponenten, Samen anderer Arten, Keimfähigkeit und Tausendkornmasse) dieser 28 Partien aufgeführt.

Alleine unter Betrachtung der Reinheit (ohne Unterscheidung der Mischungskomponente) gilt die Hälfte der Partien als heterogen. Bei den Mischungsklassen 3 und 5 sind im Gegensatz zu den anderen Klassen (außer Klasse 7) weniger heterogen Partien anteilig zu finden. Betrachtet man nun die Zusammensetzung der Mischungen wird das Problem der Entmischung und der schlechten Eignung des Heterogenitätstest für art-reine Ware am deutlichsten. Nach der Betrachtung der Mischungskomponenten sind alle Partien heterogen. Nach den Samen anderer Arten sind dagegen nur zwei Partien auffällig. Durch den großen Zeitaufwand für die Keimfähigkeitsuntersuchung konnten nur 21 der 28 Partien auf die Keimfähigkeit untersucht werden. Aber auch hier liegt der Anteil an heterogenen Partien bei 80,9 %. Auch für bei Tausendkornmassenbestimmung wurden nur 26 der 28 Partien untersucht. Da für die Tausendkornmasse in den ISTA Vorschriften (ANONYMUS 2008) kein Heterogenitätstest vorgesehen wurde, wurde die Streuung zwischen den acht Wiederholungen und den 20 Proben als Maß verwendet. Mit dieser Berechnungsweise sind nur 11,5 % der Partien heterogen bzw. die „innere“ Streuung ist signifikant kleiner als die „äußere“ Streuung.



**Tabelle 14:** Ergebnisse der Heterogenitätsuntersuchung der 28 Saatgutpartien unterteilt in die Mischungstypen (in Klammern: Anteil an beprobten Partien in %).

Nr.	Zusammensetzung	Anteil aus der Umfrage (in Masse-%)	Anzahl beprobter Partien	Anzahl heterogener Partien				
				Reinheit	Mischungs-komponente	Samen anderer Arten	Keimfähigkeit (21 Partien getestet)	TKM (26 Partien getestet)
1	- Weidel- und Schwingelgräser - Rotschwingel - Wiesenrispe	48,6 %	9	5 (55,5 %)	9 (100 %)	0 (0 %)	7	2
2	- Weidel- und Schwingelgräser - Rotschwingel	16,1 %	1	1 (100 %)	1 (100 %)	0 (0 %)	1	
3	- Weidel- und Schwingelgräser - Rotschwingel - kl.-körn. Leguminosen - Wiesenlieschgras	14,9 %	7	2 (28,6 %)	7 (100 %)	1 (14,3 %)	5	
4	- Weidel- und Schwingelgräser - Rotschwingel - Wiesenlieschgras	9,8 %	4	3 (75,0 %)	4 (100 %)	1 (25,0 %)	2	
5	- Weidel- und Schwingelgräser - Rotschwingel - kl.-körn. Leguminosen	5,3 %	3	0 (0 %)	3 (100 %)	0 (0 %)		
6	- Weidel- und Schwingelgräser - Rotschwingel - Straußgras	3,9 %	3	3 (100 %)	3 (100 %)	0 (0 %)	2	1
7	- Sonstige	1,4 %	1	0 (0 %)	1 (100 %)	0 (0 %)		
Summe		100 %	28	14 (50 %)	28 (100 %)	2 (7,1 %)	17 (80,9 %)	3 (11,5 %)

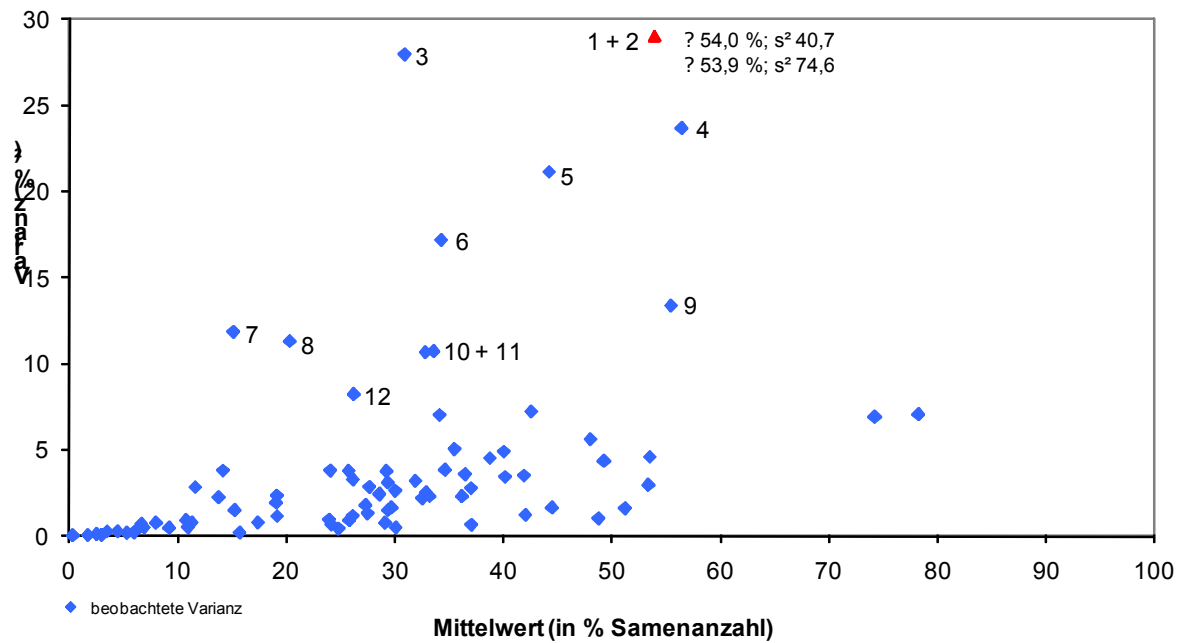
## 5. Schätzung der Varianzkomponenten

Die Varianzkomponenten werden nach der binomial-Formel mit entsprechenden Divisoren berechnet. Ein sehr hoher Divisor lässt die Varianz der Varianzkomponente sinken. Aus dem Datenmaterial der Validierungsstudie können die Varianzkomponenten „Stecher“, „Teiler“ und „Analyst“ geschätzt werden. Durch den Vergleich zwischen den Laboren kann sowohl der Anteil der Varianz von „innerhalb“ (Wh`s) und „zwischen“ (zwischen den Laboren bzw. Personen) getrennt werden. Ein Beispiel für eine kleine Varianz ist die Varianzkomponente „Analyst“ (Tabelle 15). Bereits Miles (1963) hat bei dieser Varianzkomponente eine sehr geringe Varianz unterstellt. Allerdings ist der Unterschied zwischen den Divisoren nach Miles (1963) und nach der Validierungsstudie erheblich (1:20 und 1:120). Bei den Varianzkomponenten „Stecher“ und „Teiler“ verursachen die Varianzkomponenten „zwischen“ eine geringere Varianz als „innerhalb“. Die Geräte an sich verursachen somit mehr Varianz als wenn zusätzlich verschiedene Personen die Geräte bedienen. Da diese Varianzkomponenten nicht in der Berechnung von Miles (1963) vorkommen, kann hier kein direkter Vergleich durchgeführt werden. Bei der Berechnung der Varianzkomponente „Stecher“ wurde die Ergebnisse des Labors Nr. 5 und bei der Berechnung der Varianzkomponente „Analyst“ die Ergebnisse des Labors Nr. 6 nicht berücksichtigt. Grund dafür waren übermäßige Unterschiede zu den restlichen neun Laboren.

Für die Berechnung der Varianzkomponenten zwischen und innerhalb eines Behälters wurden die Ergebnisse aus den Heterogenitätstests herangezogen. Bei der notwendigen schrittweisen „Schätzung der Varianzkomponenten“ wurden hier nicht ausschließlich die Varianzkomponenten, die bereits aus der Validierungsstudie berechnet wurden, verwendet. Für die Heterogenitätsuntersuchung in Hohenheim gelten besondere Bedingungen. Durch die Abweichung zwischen den A- und B-Proben einer Erstprobe ist die Varianz des Teilers und des Laboranten direkt berechenbar (siehe Spalte 3 und 4 der Tabelle 15). Die Varianzkomponente innerhalb des Behälters wirkt sich geringer aus, als die Varianz des Stechers. Allerdings können die beiden Varianzkomponenten nicht sauber getrennt werden und können nicht getrennt beurteilt werden.

Um die Varianzkomponente zwischen den Behältern zu schätzen, musste geklärt werden, welche Varianz toleriert werden kann. Die Verteilung der beobachtete

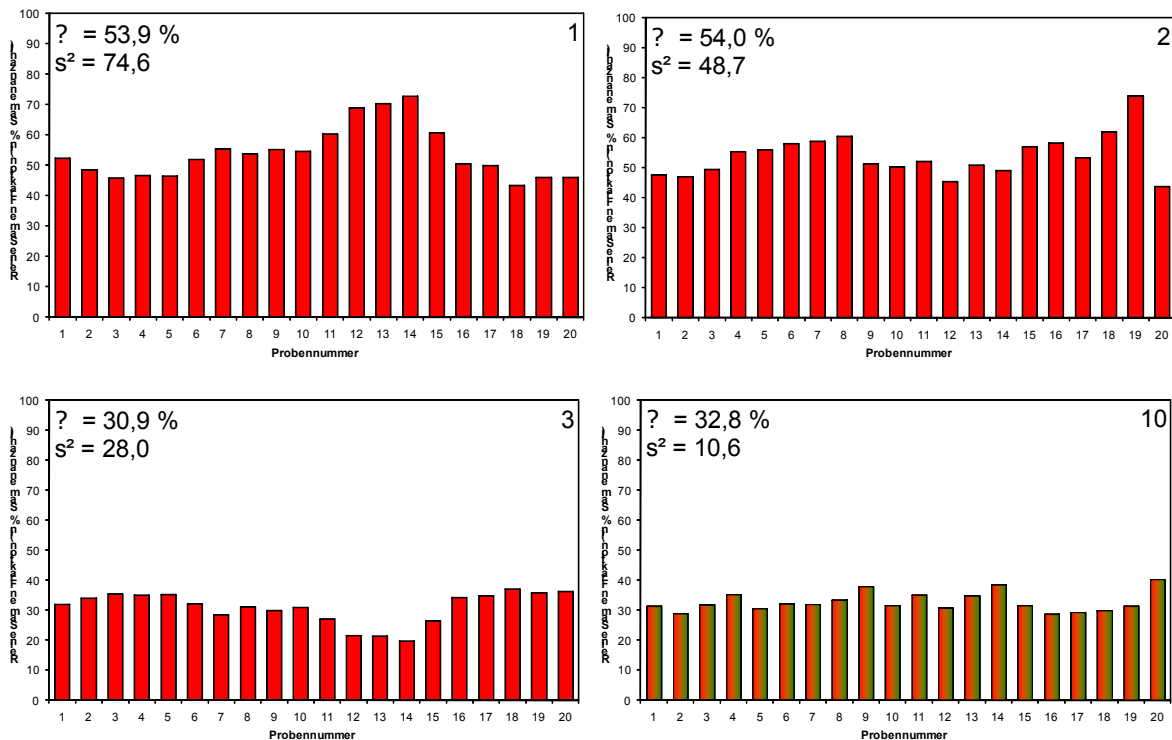
Varianzen zeigen einige wenige Ausreißer. Zur Veranschaulichung der großen Unterschiede der Varianzen sind in der Abbildung 10 die beobachteten Varianzen der 92 Mischungskomponenten der 28 Partien aufgetragen. Zu sehen ist eine Ballung der Varianz zwischen 0 und 7. Die Ausreißer aber zeigen Varianzen bis zu 74,6.



**Abbildung 10:** Beobachtete Varianzen aus den Heterogenitätstests der 92 Mischungskomponenten der 28 Partien.

Welche Varianzen Ausreißer sind, wird mit Hilfe der guten fachlichen Produktionspraxis bestimmt. Diese gute fachliche Produktionspraxis kann an Hand der beobachteten Varianz der 20 Proben aus den Heterogenitätstests abgeleitet werden. Dazu wurden die betreffenden Mischungskomponenten näher betrachtet (Abbildung 11). Die betrachteten Mischungskomponenten zeigen absolut, aber auch durch eine Bereinigung der Werte nach der binomial Verteilung ( $Var/p \cdot q$ ), die höchste Varianz. An der Mischungskomponente 1 ist ein deutlicher „Berg“ zwischen Probe 12 und 15 (Abbildung 11 links oben) oder bei Mischungskomponente 3 ein Tal (Abbildung 11 links unten) zu sehen. Es kommen auch Sprünge am Ende des Mischvorgangs wie bei der Mischungskomponente 2 vor (Abbildung 11 rechts oben). Erst bei der Mischungskomponente 10 (Abbildung 11 rechts unten) ist kein systematischer Trend mehr zu erkennen. Die Varianz dieser Mischungskomponente

wurde als noch tolerierbar definiert und als Grenzwert für die Berechnung der Varianzkomponenten gesetzt.



**Abbildung 11:** Beispielhafte Darstellung der 20 Ergebnisse von vier Mischungskomponenten aus dem Heterogenitätstest.

Der daraus resultierende Divisor ist nur noch halb so groß wie von Miles (1963) berechnet und zeigt somit die starke Bedeutung der Heterogenität zwischen den Behältern, wie im Heterogenitätstest bereits sichtbar war. Die einzelnen Divisoren sind in der letzten Spalte der Tabelle 15 noch einmal zusammengefasst.

An Hand dieser Varianzkomponenten kann nun für verschiedenste Probenahmeprotokolle die erwartete Varianz zwischen Proben berechnet werden. Ebenfalls kann mit dem Korrekturfaktor aus dem Quotient aus der maximal tolerierbaren Streuung und der Zufallsstreuung, hier der Mischungskomponente 10 auch der H-Wert-Test für art-reine Ware an die erhöhte Streuung der Saatgutmischungen angepasst werden.

$$W = \frac{\bar{X} * (100 - \bar{X})}{n} * 27,73$$

Mit dem Faktor 27,73 konnte der Anteil an Partien, die als heterogen deklariert wurden, von vorher 100 % auf 29,6 % reduziert werden. Werden die einzelnen 85 Mischungskomponenten betrachtet, sind nur noch 12,9 % als heterogen zu bezeichnen. Zu erwähnen ist noch, dass der zweite f-Wert zur Korrektur des H-Wertes nicht verwendet wurde, weil bereits bei der Berechnung des W-Wertes die gesamte Mehrstreuung enthalten ist.

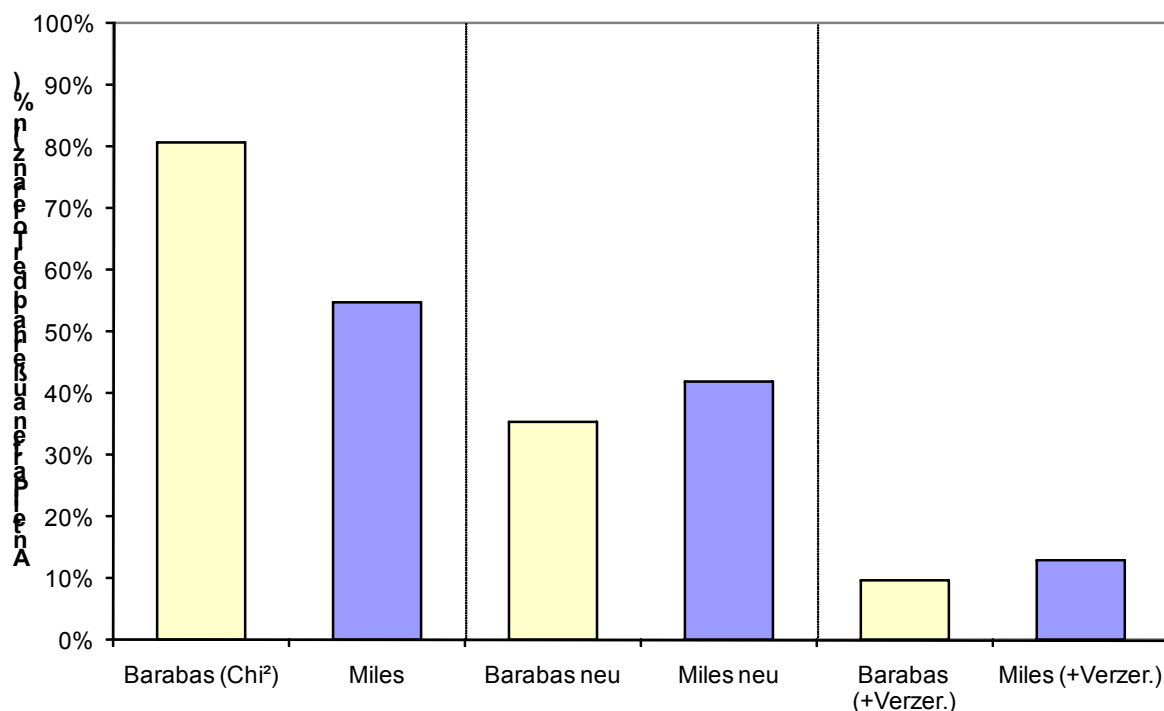
**Tabelle 15:** Divisoren für die Schätzung der Varianzkomponenten nach der Methode von Miles (1963).

Varianzkomponente	Ergebnisse aus den einzelnen Untersuchungen					nach Miles	Zusammenfassung
	Validierungsstudie	Heterogenitätstest (Vergleich A- vs. B-Probe)	Heterogenitätstest (Vergleich A- vs. B-Probe)*	Heterogenitätstest (innerhalb des Behälters)*	Heterogenitätstest (zwischen Behältern)		
zwischen Behälter						<b>289</b>	<b>289</b>
innerhalb ...				<b>9580</b>	9580	} <b>2000</b>	<b>9580</b>
innerhalb Stecher	} <b>1058</b>			1058	1058		<b>1058</b>
zwischen ...	<b>1994</b>						<b>1994</b>
zwischen Teiler	<b>2726</b>						<b>2726</b>
innerhalb ...	<b>1105</b>						<b>1105</b>
innerhalb Analyst	<b>146090</b>	} <b>4390</b>	} <b>5268</b>	} 5268	} 4390	<b>7500</b>	<b>146090</b>
zwischen ...	<b>920313</b>					<b>7500</b>	<b>920313</b>
Zufallsstichprobe		3465	3743	3743	3465	<b>2300</b>	--

\* nur die Partien 11 und 30

## 6. Toleranzberechnung und Vergleich der Methoden

Für die Toleranzberechnung wurden zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Zum einen die Methode nach Miles (1963), die ebenfalls in den ISTA Vorschriften verwendet wird (ANONYMUS 2008) und zum anderen die Berechnung mit Hilfe der  $\chi^2$  Verteilung nach Barabas und Gregoire (2004). Unter Verwendung der Mittelwerte der Partien aus dem Heterogenitätstest wurde die Abweichung zur Deklaration verglichen. In Abbildung 12 ist klar zu erkennen, dass die unveränderte Berechnung der Toleranzen in der Praxis zu Problemen führen würde. 80,6 % bzw. 54,8 % der Partien würden als abweichende Partien deklariert. Erst die Anpassung der Toleranzberechnung an die erhöhte Varianz aus Kapitel 5 verbessert die Werte auf 35,5 % und 41,9 %. Der Anteil der abzulehnenden Partien ist zwar erheblich gesunken, allerdings unter dem Augenmerk, dass alle Partien repräsentativ ausgewählt wurden, stellt ein Anteil von abzulehnenden Partien von über ein Drittel für die Firmen und der Saatgutverkehrskontrolle ein nicht tolerierbares Problem dar.



**Abbildung 12:** Vergleich der Toleranzberechnungen nach Barabas und Gregoire (2004) und Miles (1963) zum einen ohne Anpassung (links), mit der Anpassung der erhöhten Varianz (Mitte) und mit der Anpassung an die Verzerrung (rechts).

Dieser hohe Anteil kann nur erklärt werden, wenn bei einem Vergleich von einem Reinheitsergebnis mit einer Deklaration, eine weitere Varianzkomponente die Toleranzberechnung beeinflusst wird. Diese Verzerrung kann durch Schwierigkeit der Erstellung durch die Produktionstechnik erklärt werden. Diese zusätzliche Varianzquelle muss somit mit berücksichtigt werden. Dazu wurde im ersten Schritt die Abweichung zwischen dem Mittelwert der 20 Proben und der Deklaration nach der Binomial-Formel (Abweichung/Wurzel( $p \cdot q/n$ )) bereinigt. Für Anpassung der Normalverteilung der bereinigten Abweichungen wurden sieben der größten Werte nicht gewertet. Die resultierende Varianz der bereinigten Abweichungen beträgt nun 8,0. Erwartet wird allerdings nach der Neuberechnung für die Datensätze eine mittlere Varianz von 1,4. Die zu erklärende Restspanne wurde nach der Binomial-Formel wie folgt berechnet:

$$D_{\text{Verz.}} = \frac{p \cdot q}{V_{\text{beob}} - V_{\text{erwart}}} = 268$$

$D_{\text{Verz.}}$ : Divisor für die Verzerrung

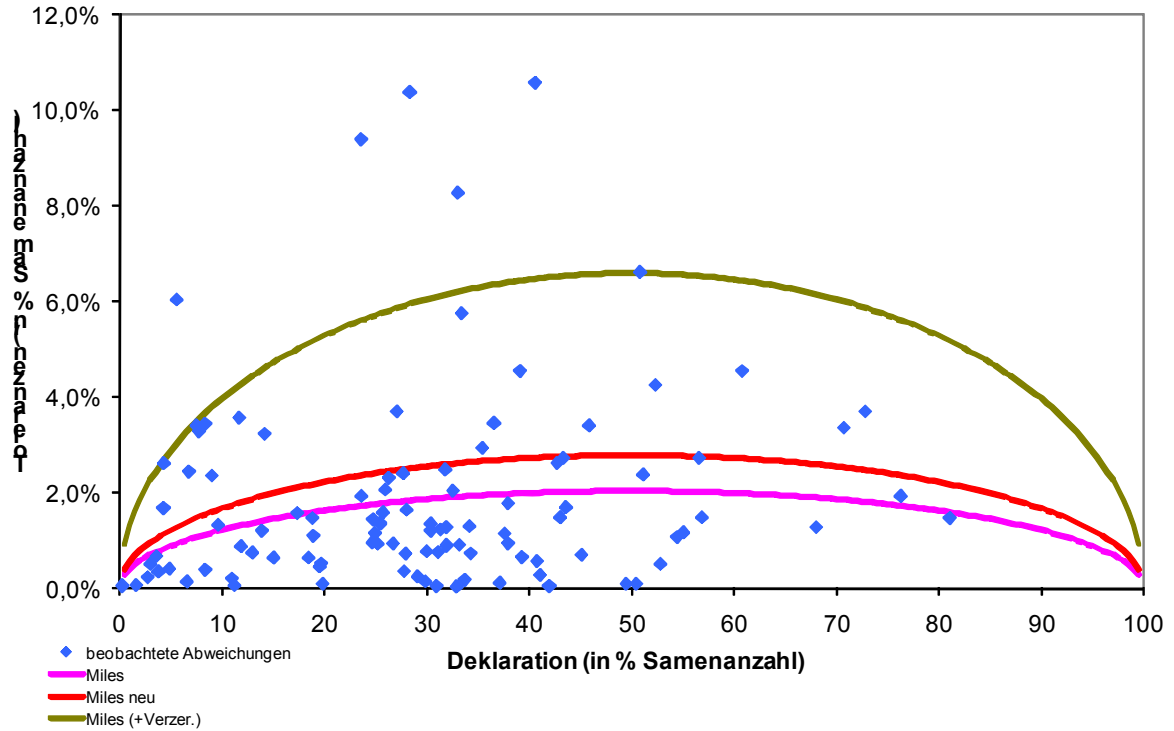
$V_{\text{beob}}$ : beobachtete Varianz = 8,0

$V_{\text{erwart}}$  erwartete Varianz = 1,4 (nach der neuen Berechnung)

$p \cdot q$ : mittlerer Wert der Eigenschaft  $p \cdot (100-p)$  in diesem Fall 1775

Nach der Berücksichtigung dieser speziellen Varianzkomponente sinkt der Anteil abzulehnender Parteien auf 9,7 % bzw. 12,9 %. Auch bei der Verwendung der 43 Ergebnisse von den anderen Laboren, liegt der Anteil der abzulehnenden Parteien bei 16,3 % bzw. 23,2 %. Die Veränderungen durch die verschiedenen Anpassungen sind graphisch gut ersichtlich, wenn die berechneten Toleranzen mit den Abweichungen aus den Heterogenitätstests gegenüber gestellt werden. In der Abbildung 13 ist gut die große Spanne zwischen den Toleranzberechnungen und den tatsächlichen Abweichungen sichtbar. Auffällig ist trotz der großen Änderung der Varianzberechnung zwischen der Berechnung von Miles (1963) und der Neuanpassung (neu), dass die Auswirkung auf die Toleranz weniger stark ist. Den größten Unterschied bildet die Berücksichtigung der Verzerrung. Erst nach der Berücksichtigung der Verzerrung sind nur noch wenigen Abweichungen außerhalb der Toleranz.





**Abbildung 13:** Darstellung der drei Toleranzberechnungen nach Miles (1963), nach den neu berechnete Varianzkomponenten (neu) und unter Berücksichtigung der Verzerrung (+Verzer.) (zweiseitig;  $\alpha$  0,05) und der tatsächlichen Abweichungen der Mischungskomponenten aus dem Heterogenitätstest.

## 3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

### 1. Umfrage zu Saatgutmischungen

Die Auswertung der Umfrageergebnisse haben die Strukturen des Handels mit Saatgutmischungen klar dargestellt. Die Mischungszusammensetzung einzelner Mischungen können sehr komplex sein, bewegen sich aber in einem relativ festen Rahmen. Der Verwendungszweck einer Mischung muss berücksichtigt werden. Sollen nun Mischungen gezielt beprobt werden, ist eine repräsentative Auswahl aus dem Handel möglich.

### 2. Entwicklung einer Bildanalyse-gestützten Schnell-Methode

Die Schnell-Methode wurde entwickelt, um den Zeitbedarf einer Reinheitsuntersuchung zu reduzieren. Die Cluster-Analyse hat gezeigt, welche Arten an Hand der morphologischen Eigenschaften ihrer Samen mit hoher Wahrscheinlichkeit unterschieden werden können. Die Zusammenstellung von Modellmischungen mit diesen Arten zeigten die Möglichkeiten und Grenzen der Schnell-Methode. Ein Nachteil der Schnell-Methode konnte nicht vollständig ausgeglichen werden. Der Zeitbedarf durch das Vereinzeln der Samen ist erheblich. Die Reduktion der Probengröße mit Hilfe verschiedener Siebe brachte zwar eine Verbesserung, aber die erhoffte wesentliche Zeiteinsparung im Gegensatz zur klassischen Reinheitsuntersuchung wurde nicht erreicht. Die gewonnene relativ kleine Zeitersparnis ist durch die nicht vermeidbare Ungenauigkeit erkaufte. Die erwarteten Selektionseffekte der Probenahme- und -teilungsmethoden waren letztendlich geringer als die Schwankungen der Schnell-Methode. Der Vergleich der Schnell-Methode mit einer Reinheitsuntersuchung hat gezeigt, dass die Schnell-Methode nicht mit einer Reinheitsuntersuchung konkurrieren kann. Zusammengefasst ist die Schnell-Methode zur Detektion der Selektionseffekte nicht geeignet.

### 3. Test geeigneter Probenahmegeräte für die Beprobung von Saatgutmischungen

Für den Test der Probenahmegeräte wurde eine breite Auswahl an Geräten verwendet. Ausgewählt wurden Probenahmegeräte, die bereits in den ISTA-

Vorschriften (ANONYMOUS 2008) für art-reine Ware beschrieben und validiert sind (mit Ausnahme des Kanülenstechers). Für den Innendurchmesser der Nobbe- und Kanülenstecher sind verschiedene Durchmesser je nach Art bei der Beprobung empfohlen (ANONYMOUS 2007). Aus Zeitgründen konnten nicht alle in den ISTA-Vorschriften beschriebenen Probenahmegeräte untersucht werden. Nur einige der wichtigen Typen wurden ausgewählt. Im speziellen wurden die Auswirkungen verschiedener Protokolle des Zentrifugalteilers und die Auswirkung unterschiedlicher Größen des Riffelteilers getestet. Für die Auswahl der Probeteiler wurden zwischen dem minimalen und maximalen Durchmesser, der in diesem Projekt verwendeten Arten, eine weitere Stufe eingefügt und eine über dem maximalen Durchmesser. Das Ergebnis sind die Innendurchmesser von 10, 12, 14 und 16 mm.

### 3.1. Test verschiedener Probeteiler und -teilungsmethoden

Keiner der Probeteiler zeigt bei allen fünf verwendeten Mischungen gleichermaßen eine gute Treffsicherheit. Nur bei dem Rotationsprobenteiler und den Riffelteilern wurden wenige signifikante Abweichungen ohne einen erkennbaren Trend gefunden. Ein klareres Bild zeigt die Wiederholgenauigkeit. Alleinig der Rotationsprobenteiler zeigt bei keiner Mischung eine signifikant höhere Varianz als erwartet. Die Riffelteiler dagegen zeigen signifikant Varianzen. Das Ausmaß ist allerdings wesentlich geringer als bei der Handhalbierung und dem Zentrifugalteiler. Trotz der einzelnen signifikanten Abweichungen sind die besten Methoden zur Probenteilung von Grassaatumischungen der Rotationsprobenteiler und die Riffelteiler.

### 3.2. Test verschiedener Probenehmer

Der erste Durchlauf der Probesteuertests erbrachte keine Ergebnisse für eine Empfehlung. Nur einzelne Varianten waren nicht signifikant. Keiner der Probestecher konnte somit für die Probenahme von Grassaatumischungen empfohlen werden. Da keiner der Probestecher geeignet schien, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die Mischungserstellung Probleme verursachen könnte. Mit dem Probesteuerteststand und dem ausgearbeitetem Protokoll sollte eine standardisierte und reproduzierbare Probenahme durchgeführt werden. Durch einen Mischungsgang mit dem Rotationsprobenteiler sollte eine homogene Verteilung erreicht werden. Die Tests nach dem ersten Durchgang zeigten ein anderes Bild. Eine vertikale Schichtung konnte festgestellt werden. Zwei mögliche Ursachen für die Schichtungen

wurden diskutiert. Zum einen, ob die Mischung im Rotationsprobenteiler homogen gemischt wurde, oder zweitens, ob das Ausschütten der 16 Tüten in den Probesteckerkasten zu Entmischungen führt. Erst das mehrmalige Mischen und das direkte Befüllen des Probesteckerkastens haben die vertikale Schichtung reduziert. Wenn alle Ergebnisse dieser Vortests und die verschiedenen Nachteile der Methoden berücksichtigt werden, ist die geeignetste Methode der Mischungserstellung die Variante 5. Die Vortests und die spezielle Probenahme der Partie 29 haben ebenfalls einen Unterschied zwischen den Probenstecher gezeigt. Der Kammerstecher scheint die feinsamige Komponenten zu selektieren. Die Werte liegen im Durchschnitt über dem Soll Wert und über den Werten des Kanülenstechers.

Mit dem neuem Protokoll wurden die Probesteckertests wiederholt. Durch die langen Vortest konnte aus Zeitgründen die Probestecker nur an Hand schwierigsten Mischung der Weißkleemischung getestet werden. Der unterschiedlichen Fließeigenschaften der Samen des Weidelgrases und des Weißklees lassen im Vergleich zu den fünf Modellmischungen hier die höchste Gefahr einer Entmischung erwarten. Nach dieser Wiederholung sind alle Nobbe- und Kanülenstecher hinsichtlich der Treffsicherheit nicht signifikant vom Soll-Wert verschieden. Erst bei der Wiederholbarkeit zeigt nur der Kanülenstecher keine signifikant höhere Varianz. Der Kammerstecher war, wie aus den Vortest erwartet, bei der Treffsicherheit und der Wiederholgenauigkeit unbefriedigend. Der Kammerstecher kann durch seine selektive Wirkung nicht für Grassaatgutmischungen empfohlen werden. Eine Probenahme mit dem Kanülenstecher dagegen entspricht einer Zufallsstichprobe in Hinsicht der Treffgenauigkeit und der Wiederholgenauigkeit. Der Nobbe-Probestecker zeigt dagegen bei der Treffgenauigkeit Problem und nicht bei der Wiederholgenauigkeit.

Mit diesen Probnahmegeräten wurde die Validierungsstudie mit zehn Laboren durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass die Ergebnisse der einzelnen Labore vergleichbar sind, haben die Labore Mischungen erhalten, die in Hohenheim gemischt wurden. Diese Mischungen wurden in Säcke vakuumverschweißt, um eine Entmischung während des Transportes zu minimieren. In der Mischung wurde der gefärbte Rotschwengel verwendet. Durch die erleichterte Trennung der Weidelgras- und Rotschwengel-Samen unter UV-Licht haben, im Gegensatz zu den teilnehmenden Laboren, die gewonnen Ergebnisse in Hohenheim einen wesentlich

kleineren bzw. minimalen Fehlerwert. Der Effekt des Laboranten konnte auf diese Weise auf ein Minimum reduziert werden. Für die Berechnungen konnten daher die Werte aus Hohenheim als Null-Werte verwendet werden.

## 4. Heterogenitätsprüfung

### 4.1. Reinheitsuntersuchung

Die Heterogenitätsuntersuchung der Reinheitsuntersuchungen hat ein klares Bild über die Eignung bei Grassaatgutmischungen aufgezeigt. Bei Anwendung des Heterogenitätstests für artreine Ware ist die Hälfte der Mischungspartien heterogen bezüglich der technischen Reinheit. Alle Partien sind heterogen auf Grund mindestens einer Mischungskomponente. Für die Beurteilung der Heterogenität von Saatgutmischungen ist die Heterogenitätsuntersuchung für art-reine Ware ungeeignet.

### 4.2. Keimfähigkeitsuntersuchung

Bei der Untersuchung der Keimfähigkeit sind ebenfalls viele Komponenten heterogen. Heterogenen Komponenten waren unter anderen bei der Wiesenrispe zu finden. Einen Effekt von Entmischungen auf die Keimfähigkeit konnte nicht bestätigt werden.

### 4.3. Tausendkornmassenbestimmung

Für die Beurteilung der Tausendkornmasse ist in den ISTA-Vorschriften (ANONYMOUS 2008) kein Heterogenitätstest vorgesehen. Um dennoch die Varianz zwischen den 20 Proben beurteilen zu können wurde diese „äußere“ Varianz mit der Varianz der acht Wiederholungen innerhalb einer Probe („innere“ Varianz) verglichen. Nach den Ergebnissen der F-Tests zeigen nur drei Partien eine signifikant erhöhte Varianz. Die Tausendkornmasse ist somit nicht von eventuell vorhandenen Entmischungsvorgängen beeinflusst. Dieser Test zeigte ebenfalls die Eignung als Heterogenitätstest für die Tausendkornmasse.

## 5. Varianzkomponenten

Miles (1963) beschrieb fünf Varianzkomponenten, die die Gesamtvarianz einer Reinheitsuntersuchung beschreiben soll. In diesem Projekt wurden vier weitere Varianzkomponenten hinzugefügt. Hierbei wurde jeder Schritt von der Probenahme bis zur Reinheitsuntersuchung berücksichtigt. Das Versuchsdesign der Validierungsstudie und der beprobten Partien für den Heterogenitätstest wurde auf die schrittweise Berechnung der Varianzkomponenten ausgelegt.

Die Ergebnisse der internationalen Validierungsstudie wurden für die Berechnung der Varianzkomponenten Analyst, Teiler und Stecher verwendet. Durch das Versuchsdesign mit zehn verschiedenen Laboren konnte hierbei der Effekt von verschiedenen Personen bzw. in diesem Fall Laboren berücksichtigt werden. Der Fehler der Nachuntersuchungen in Hohenheim ist durch die UV-Färbung auf ein Minimum reduziert worden. Diese Ergebnisse konnten als fehlerfrei als Nullwert bei der Berechnung verwendet werden.

Nach der Berechnung der Varianzkomponenten 3 bis 8 bleiben noch die Effekte der Varianz innerhalb und zwischen den Säcken. Bei der Berechnung dieser Varianzkomponenten konnte nicht, wie bei der Validierungsstudie, die Varianzkomponente direkt berechnet werden. In den Ergebnissen fließen ebenfalls die Effekte der Beprobung und der Reinheitsuntersuchung ein. Diese müssen zuerst von der Gesamtvarianz abgezogen werden. Erst die restliche Varianz stellt die gewünschte Varianzkomponente dar.

In der Zusammenfassung kann die erwartete Varianz einer Probe je nach Probenahmeplan berechnet werden und so auch die Abweichungen zwischen zwei Probenergebnissen einer Partie beurteilt werden. Mit dieser neuen erwarteten Varianz kann ebenfalls der H-Wert-Test der ISTA (ANONYMUS 2008) auf das erhöhte Maß an Varianz der Proben angepasst werden.

## 6. Toleranzberechnung

Zwei unterschiedliche Toleranzberechnungen sind denkbar (Miles, 1963; Barabas und Gregoire, 2004). Nach der Korrektur beider Methoden ist der Anteil der heterogenen Partien erheblich gesunken. Beide Methoden wären nun denkbar für eine Beurteilung einer Mischungspartie. Diese zwei Methoden unterscheiden sich in der Berechnungsgrundlage. Die Methode nach Miles (1963) wertet jede Mischungskomponente für sich. Die Methode nach Barabas und Gregoire (2004) begutachtet die Mischung an sich ohne auf jede Mischungskomponente einzeln

einzugehen. Hierbei sind alle Mischungskomponenten gleich gewichtet. Wenn die Toleranz für jede einzelne Mischungskomponente einzeln berechnet werden würden, könnte eine Mischung an Hand von nur einer Mischungskomponente als heterogen deklariert werden. Dieses Ungleichgewicht der Mischungskomponenten kann bei der Berechnung nach Miles (1963) entstehen. Beide Toleranzberechnungen arbeiten mit Fehlerquoten (alpha-Fehlern). Mit einer Fehlerquote von 5 % werden fünf Partien von 100 Untersuchungen falsch als heterogen deklariert, obwohl sie eigentlich homogen sind. Bei einer Mischung mit 20 Mischungskomponenten wird statistisch gesehen eine Mischungskomponente falsch deklariert. Für die Toleranzberechnung nach Miles (1963) spielt dieses Problem bei zunehmender Anzahl an Mischungskomponenten ein steigendes Problem dar. Nicht so dagegen bei der Toleranzberechnung von Barabas und Gregoire (2004). Aus diesem Grund sollte die Methode nach Barabas und Gregoire (2004) mit dem neuen Korrekturfaktor A bei der Überprüfung von Reinheitsergebnissen angewandt werden. Der einzige Nachteil dieser Berechnungsmethode ist das Fehlen von Toleranztabellen. Für jede Mischungspartie müssen die Ergebnisse mit Hilfe des Excel-Programmes berechnet werden und ein einheitlicher Toleranzwert ist nicht sichtbar. Für diese Methode ist zu mindestens ein Laptop mit dem installierten Programm notwendig.

## 4. Zusammenfassung

Das Ziel dieses Projektes ist die Erstellung und Validierung einer Verfahrensvorschrift für die Probenahme von Saatgutmischungen insbesondere von Gräsern. Diese Verfahrensvorschrift soll der ISTA zur Aufnahme in die ISTA-Vorschriften und anderen nationalen Methodenvorschriften vorgeschlagen werden. Die Untersuchung der Eignung verschiedener Probenahme- und Probenteilungsmethode zeigen klare Unterschiede zwischen den Methoden. Mit diesen Ergebnissen ist ein Probenahmeprotokoll erstellt worden. Empfohlen Geräte sind der Kanülenstecher bei der Probenahme und der Riffel- und der Rotationsprobenteiler für die Probenreduktion. Dieses neue Probenahmeprotokoll ist in einer internationalen Validierungsstudie überprüft worden.

Das Problem der erhöhten Varianz bei Mischungen wurde bereits bei den Heterogenitätstests nach den ISTA Vorschriften ersichtlich (ANONYMOUS 2008). Alle der beprobten Partien sind nach dem Heterogenitätstests (H- und R-Wert-Test) für art-reine Ware als heterogen anzusehen, ob nur für eine oder mehrere Kategorien. Der Unterschied zwischen der beobachteten und erwarteten Varianz nach Miles bei Mischungen zeigt das gleiche Problem. Mit diesen Ergebnissen ist nun das Problem einer erhöhten Varianz bei Mischungen sehr gut sichtbar. Die Heterogenitätstests nach ISTA müssen somit notwendigerweise an die erhöhte Varianz in Mischungen angepasst werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Arbeitspaketen 3 und 8 ist die erwartete Varianz neu kalkuliert worden. Aus der neuen erwarteten Varianz kann die Toleranz für Abweichungen ermittelt werden. Nach den neuen Toleranzen mit den mittleren Ergebnissen aus den Heterogenitätstests sind nur noch 12,9 % der Partien auffällig. Hierbei musste eine weitere Varianzkomponente mit berücksichtigt werden, die die Verzerrung bei dem Vergleich mit der Deklaration erklären soll. Mit diesem Anteil auffälliger Partien kann in der Probenahmepraxis besser gearbeitet werden, als ohne die Anpassungen an die erhöhte Varianz bei Mischungen.



## 5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

### 1. Umfrage zu Saatgutmischungen

Ziel: Ermittlung der Anzahl und der Zusammensetzung der pro Jahr in Deutschland gehandelten Mischungen zur Auswahl repräsentativer Mischungen für die Analyse in Arbeitspaket 3.

Ergebnis: Insgesamt wurden 17.075 Mischungsanträge (= Mischungspartien) von insgesamt 53 Mischungsbetrieben in Deutschland der zwei Wirtschaftsjahre mit einer Gesamtmasse von über 63.000 t erfasst. Diese Zahl überstieg bei Weitem die Anzahl der Anträge, die nach einem Vorgespräch mit den Anerkennungsstellen vermutet wurde. Mit Hilfe dieser Datenbank konnte die repräsentativen Mischungen definiert werden. Ebenfalls wurde die Dynamik über Art und Weise der Erstellung von Mischungen beleuchtet (Ort der Produktion, Partiegröße, Zusammensetzung, Packungsgröße ...).

### 2. Einrichtung des optimalen Arbeitsplatzes

Ziel: Für die Untersuchung der gezogenen Mischungsproben soll ein optimierter Arbeitsplatz eingerichtet werden.

Ergebnis: Für den technischen Mitarbeiter wurde der Arbeitsplatz ergonomisch angepasst. Die Geräte wie das Binokular und die Schüttelrinne mit der transparenten Rinne wurden bis zur Untersuchung der ersten Proben installiert.

### 3. Untersuchung von Saatgutmischungen

Ziel: Ziehung von je etwa 20 Erstproben aus etwa 25 Saatgutmischungspartien sowie Ermittlung der Reinheit, des Besatzes und der Artzusammensetzung sowie der Tausendkornmasse und der Keimfähigkeit der Komponenten.

Ergebnis: Insgesamt von 31 Partien wurden Proben gesammelt. Von 28 Partien wurden von 20 Stellen je eine Probe gezogen. Bei der Probenahme von zwei Partien bzw. Säcken wurden die 20 Proben von einem Behälter genommen, um die Heterogenität innerhalb eines Behälters zu definieren. Für die Überprüfung der Eignung der Probenehmer wurde eine Partie mit zwei verschiedenen Probestecher beprobt.

Die Auswertung der H- und R-Wert-Tests zeigen deutliche höhere Varianz als erwartet. Erst nach der Anpassung der erwarteten Varianz kann der H- und der R-Wert-Test für Mischungen verwendet werden.

#### 4. Vorbereitung und Teilnahme am ISTA Kongress

Ziel: Ein Zwischenbericht unter Einschluss der Ergebnisse aus der ersten Hälfte der untersuchten Mischungsproben soll als Vortrag zum ISTA Kongress 2010 in Köln eingereicht werden.

Ergebnis: Für die Präsentation im TCOM auf dem ISTA Kongress (Köln 2010) wurden die bisherigen Ergebnisse des Projektes zusammengefasst. Verwendet wurden die Ergebnisse von 14 Partien, um die Streuung der Proben darzustellen. Mit dieser Streuung wurden die bisherig verwendeten Toleranzen neu an der von uns beobachteten Streuung angepasst.

Zusätzlich zur Präsentation im TCOM wurde ein Poster erstellt, um das Projekt allen Teilnehmern vorzustellen. Auf diesem Poster wurden die Streuung und die Ergebnisse mit dem Heterogenitätstest für art-reiner Ware dargestellt.

Ein Jahr später wurde auf dem ISTA Meeting in der Schweiz 2011 das vorläufige Endergebnis der Neuberechnung der erwarteten Varianz präsentiert.

#### 5. Entwicklung der Schnellbestimmungsmethode

Ziel: Entwicklung einer Methode, die es mittels einer digitalen Bildaufnahme und einer Bildverarbeitungssoftware erlaubt Mischungskomponenten mit morphologisch deutlich verschiedenen Samen eindeutig voneinander zu unterscheiden und deren Mischungsanteile zu schätzen.

Ergebnis: Die Schnell-Methode wurde entwickelt. Mit Einschränkungen funktioniert die Erkennung von Samen mit eindeutig morphologischen Unterschieden. Für das Projekt waren allerdings die Abweichungen zu groß. Weiter war die Arbeitersparnis nicht so groß wie erwartet. Aus diesem Grund wurde in den anderen Arbeitspaketen die Trennung der Mischungskomponenten von Hand und mit Hilfe von Sieben durchgeführt. An der Schnell-Methode muss weiter gearbeitet werden. Sie hat mit Sicherheit Potential, den Zeitaufwand für eine Reinheitsuntersuchung zu reduzieren.

#### 6. Untersuchung zur Eignung von Probenahme und Probenteilungsgeräten

Ziel: Bestimmung der für die Probenahme und –teilung von Grassaatgutmischungen geeigneten Geräte.

Ergebnis: Fünf Probeteiler und vier Probenahmemethoden wurden untersucht. Für Mischungen waren nur der Riffel- und der Rotationsprobenteiler für die Probenreduktion und der Kanülenstecher für die Probenahme geeignet. An Hand dieser Ergebnisse waren klare Unterschiede zwischen den Techniken zu erkennen und wo Selektionseffekte vorkommen. Mit diesen Ergebnissen wurde ein Probenahmeprotokoll erstellt.

#### 7. Erstellung der Methodenvorschrift

Ziel: Formulierung eines Änderungsvorschlags für die ISTA Vorschriften.

Ergebnis: Aus den Empfehlungen der Probenahmemethoden wurde eine Probenahmevorschrift erstellt und bei der Validierungsstudie verwendet.

#### 8. Validierung der Methode

Ziel: Entsprechend der Vorgaben der ISTA durch das ISTA Method Validation Handbook soll in einer internationalen Validierungsstudie die entwickelte Methode validiert werden.

Ergebnis: Die aus Arbeitspaket 7 ermittelten Probenahme- und Probereduktionsgeräte wurden in einer internationalen Validierungsstudie getestet. Zehn Labore erhielten jeweils drei Saatgutpakete mit einer definierten Mischung. Die geplante Anzahl von 20 teilnehmenden Laboren wurde für die Erhöhung der Wiederholungszahl der einzelnen Labore auf 10 reduziert.

#### 9. Einreichen der Methode an die ISTA

Ziel: Einreichen des erstellten Methodenvorschlags für die validierte Methode an die ISTA und Aufnahme in die ISTA Vorschriften.

Ergebnis: Im November 2011 soll die Methodenvorschrift in Form eines Artikels in dem wissenschaftlichen Journal „Seed Science and Technology“ der ISTA eingereicht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Anonymus (2001). Rules for testing seeds. Association of Official Seed Analysts. Ithaca, USA.

Anonymus (2005) ISTA/ISF Experiment on herbage seed lot size; technical protocol, Dezember 2005.

Anonymus (2007). Probennehmer-Richtlinie. Arbeitsgemeinschaft der Anerkennungsstellen für landwirtschaftliches Saat- und Pflanzgut, Jena.

Anonymus (2008). International rules for seed testing. The International Seed Testing Association, Bassersdorf, Schweiz.

Anonymus (2009). ISTA Handbook on Seedling Evaluation. International Seed Testing Association, 3rd Edition, Bassersdorf, Schweiz

Barabas, J. und Gregoire, S. (2004). A statistical method for testing the composition of seed mixtures. *Seed Science and Technology*, **32**, 485-492.

Coster, R. (1993). Seed lot size limitation as reflected in heterogeneity testing. *Seed Science and Technology*, **21**, 513-520.

Kruse, M. (1996). Der Probenahmefehler: Maßnahmen zur Qualitätssicherung bei der Probenteilung in der Saatgutprüfung. *Bericht über die 47. Arbeitstagung 1996 der Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtleiter im Rahmen der „Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter“*, BAL Gumpenstein, 26.-28. November 1996.

KRUSE, M. (1999). Uniformity of seed lots as a quality trait – the statistical aspects. *World Seed Conference 1999*, Cambridge, Book of abstracts, 139-143.

Kruse, M. (2005). ISTA Handbook on Seed Sampling. The International Seed Testing Association, Bassersdorf, Schweiz.

Miles, S.R. (1963). Handbook of tolerances and of measures of precision for seed testing. *Proceedings of the International Seed Testing Association*, **28** No.3, Wageningen, Holland.

Piepho, H. P. (2005). Vorlesungsskript zur Statistik für Studierende der Agrarbiologie. Institute of crop science, Universität Hohenheim.

Spretnjak, S. (2010). Ermittlung geeigneter Nobbe - Probesteher zur Probenahme von Gräsermischungen mittels eines neu konzipierten Prüfstandes, Diplomarbeit aus dem Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik der Universität Hohenheim.