



Owies nagoziarnisty na polu doświadczalnym w Radzikowie

Fot. Bogusław Łapiński

BIULETYN
INSTYTUTU HODOWLI
I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
Nr 275/2015



Owies nagoziarnisty na polu doświadczalnym w Radzikowie. *Fot. Bogusław Łapiński*

RADZIKÓW 2015
INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY — RADZIKÓW
05-870 BŁONIE pod WARSZAWĄ

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Dyrektor: Prof. dr hab. Edward Arseniuk

Komitet Redakcyjny:
Editorial Committee:

DANUTA BOROS (Przewodnicząca — Editor-in Chief)
HENRYK J. CZEMBOR, RENATA LEBECKA, ANNA LINKIEWICZ, WIESŁAW MĄDRY,
KATARZYNA MIKOŁAJCZYK, WOJCIECH NOWACKI, BARBARA ZAGDAŃSKA
GABRIELA WODZYŃSKA-ŁAPIŃSKA (Sekretarz Redakcji — Editorial Secretary)

Redaktor Statystyczny — WIESŁAW MĄDRY

CZASOPISMO UKAZUJE SIĘ OD 1951 ROKU

Redaktor techniczny i skład komputerowy
GABRIELA WODZYŃSKA-ŁAPIŃSKA

Druk: Biuro Wydawnictw i Reklamy „WiR”

AGNIESZKA NIEDZIELA**WERONIKA JARSKA****PIOTR T. BEDNAREK**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Wybrane elementy nowoczesnych rozwiązań wpływające na skuteczność programów hodowlanych

Up-to-date solutions in modern plant breeding programs

Postęp hodowli roślin uzależniony jest od technologii pozwalających na identyfikację markerów cech ilościowych takich jak profilowanie DNA, czy też ich fenotypowanie. Coraz większe znaczenie zaczynają odgrywać metody statystyczne wykorzystywane w mapowaniu asocjacyjnym i selekcji genomowej. W ostatnich latach obserwuje się zmianę podejścia do selekcji. Zamiast wykorzystywać pojedyncze markery cech poszukuje się wielu markerów tych cech lub też stosuje całą dostępną pulę markerów opisujących daną populację dla potrzeb selekcji. Większość ze stosowanych metod selekcji związanych jest z wykorzystaniem wydajnych technologii markerowych, natomiast problemem pozostaje ograniczona dostępność i wysokie koszty fenotypowania roślin. W pracy przedstawiono wybrane elementy nowoczesnych rozwiązań mogących wpływać na skuteczność oraz czas realizacji programów hodowlanych.

Słowa kluczowe: genotypowanie; fenotypowanie; mapowanie; cechy ilościowe; selekcja

Advances in plant breeding depend on technologies that allow the identification of markers linked to agronomical traits that could be achieved via genotyping and phenotyping. There is a growing interest in the application of statistical methods developed for association mapping and genomic selection. In the last few years, a change in attitude towards plant selection is being observed. Instead of the tendency of identifying single markers for some traits the attention is focused on the evaluation of numerous markers from the QTL regions or the whole available pool of markers is utilized in a selection process. Most of the modern approaches are based on the efficient marker technologies whereas phenotyping on a large scale, is still a problem. This paper is devoted to the aspects affecting efficiency of numerous stages of selection used in plant breeding and involving advances in molecular biology.

Key words: genotyping; phenotyping, mapping, QTL, selection

WPROWADZENIE

Wśród obecnie stosowanych metod molekularnych wspierających proces hodowlany należy wymienić selekcję wspartą markerami molekularnymi. Metoda ta, w wielu przypadkach zakłada identyfikację markerów cechy, ich lokalizowanie na mapach genetycznych, a następnie walidację na szerszej puli genowej. Do realizacji takich badań wykorzystuje się odpowiednie modele genetyczne. Model mendlowski bazuje na populacjach o ściśle zdefiniowanych formach rodzicielskich wykazujących różnicowanie pod względem badanej cechy. Umożliwia to jej mapowanie, a następnie typowanie markerów do selekcji. Inną strategią jest podejście populacyjne. W tym przypadku model genetyczny nie jest tak ściśle zdefiniowany, a jego analiza wiąże się z zastosowaniem narzędzi genetyki populacji. Odrębną możliwość stwarza selekcja genomowa. Każda z wymienionych metod bazuje na określonych założeniach dotyczących populacji wykorzystywanej do analizy cech ilościowych, sposobie ich fenotypowania, metod genotypowania oraz identyfikacji markerów do selekcji czy wręcz podejścia w jaki selekcja będzie realizowana. W pracy zostaną omówione możliwości nowoczesnych strategii hodowlanych mających wpływ na efektywność selekcji materiałów roślinnych oraz racjonalizację procesu decyzyjnego na poszczególnych etapach hodowli.

POPULACJE MAPUJĄCE PODSTAWĄ DO IDENTYFIKACJI MARKERÓW CECH

Przygotowanie odpowiedniej populacji mapującej stanowi kluczowy element, od którego zależy powodzenie każdego projektu mającego na celu mapowanie *loci* cech użytkowych oraz identyfikację markerów przydatnych w selekcji. Przy wyborze populacji mapującej należy zwracać uwagę przede wszystkim na: 1) różnicowanie form rodzicielskich 2) sposób jej wyprowadzenia (żywołność, czas konieczny na jej otrzymanie) oraz 3) liczebność.

Zróżnicowanie form rodzicielskich

Do tworzenia populacji mapujących zwykle wybiera się osobniki możliwie najbardziej homozygotyczne lecz oddalone pod względem genetycznym lub pod względem badanych cech użytkowych. Dobór form rodzicielskich jest jednak zależny od konkretnych potrzeb eksperymentalnych. W niektórych przypadkach, gdy celem jest opracowanie mapy ograniczonego obszaru genomu uzasadnionym jest wybór rodziców silnie spokrewnionych czy wręcz linii izogenicznych, lecz różniących się pod względem badanej cechy (Niedziela i in., 2014), gdy celem jest uzyskanie silnie zagęszczonej mapy genetycznej dla cech złożonych preferowane są formy rodzicielskie oddalone genetycznie (Semagn i in., 2010).

Sposób wyprowadzenia i charakterystyka populacji mapujących

Populacje mapujące, zależnie od potrzeb mogą być wyprowadzone w taki sposób, by można było realizować analizy w oparciu o model mendlowski lub model populacyjny. Wybór modelu, warunkowany jest między innymi złożonością badanej cechy, dostępnym materiałem roślinnym oraz podejściem eksperymentalnym. W przypadku modelu mendlowskiego formy rodzicielskie są zdefiniowane, natomiast model bazujący na metodach genetyki populacyjnej nie wymaga znajomości pochodzenia badanych form.

Zakłada jednak, że powinny być one zróżnicowane, a w zależności od przyjętej strategii mniej lub bardziej wyrównane genetycznie. W modelu mendlowskim wykorzystuje się populacje dwurodzicielskie, takie jak: pokolenie F_2 , linie podwojonych haploidów (DH, ang. Double Haploid), linie bliskoizogeniczne (NIL, ang. Near Isogenic Lines) i rekombinacyjne linie wsobne (RIL, ang. Recombinant Inbred Lines) oraz populacje wielorodzicielskie takie jak zagnieżdżone populacje asocjacyjne (NAM, ang. Nested Association Mapping), oraz wielorodzicielskie zaawansowane pokolenia mieszańców (MAGIC, ang. Multi-parent Advanced Generation Inter-Cross populations). Inny podział związany jest z żywotnością populacji mapujących. Możemy wyróżnić populacje "śmiertelne" i "nieśmiertelne". Do pierwszej grupy należą np. populacje pokolenia F_2 uzyskiwane poprzez samozapylenie roślin F_1 będących potomstwem roślin rodzicielskich. Populacje takie zwykle mają ograniczone zastosowanie i raczej służą do weryfikowania segregacji badanych cech, czy też wstępnej ich lokalizacji na mapach genetycznych. Zdecydowanie bardziej racjonalnym, choć czasowo- lub/i pracochłonnym jest wykorzystanie populacji "nieśmiertelnych" do których zalicza się linie DH, RIL, NIL, NAM i MAGIC. Ich zaletą jest niezmienność (wyrównanie w obrębie poszczególnych linii) w kolejnych pokoleniach, a tym samym możliwość realizacji doświadczeń polowych w różnych latach i środowiskach bez obawy, że obserwowana zmienność fenotypowa będzie wynikiem rozszczepiania się cech. Linie DH charakteryzuje wysoka (~100%) homozygotyczność. Są one istotne dla hodowców ponieważ nie „gubią” ustabilizowanych cech, a ich zastosowanie może istotnie skrócić proces hodowlany (Semagn i in., 2010). Populacje DH mogą być jednak obciążone błędem wynikającym z włączenia do analizy tak zwanych klonów. Ponadto, proces rekombinacji zostaje "zamrożony" już na poziomie wyprowadzania podwojonych haploidów. Kolejnym problemem jest zjawisko zmienności somaklonalnej (Bednarek i in., 2007). Zwykle regeneranty wymagają kilku cykli chowu wsobnego by wyeliminować mutacje indukowane w kulturach *in vitro*. W tym kontekście populacje RIL są zdecydowanie korzystniejszym rozwiązaniem, które wymaga niewiele więcej czasu na ich wyprowadzenie. Wielokrotne procesy rekombinacji mające miejsce podczas wyprowadzania populacji RIL wpływają pozytywnie na późniejsze uzyskanie silnie zagęszczonych map genetycznych. Populacje te są przydatne do mapowania rzadkich alleli (Rafalski, 2010). Poważnym ograniczeniem dwurodzicielskich populacji mapujących jest kwestia zawartej w nich zmienności cechy, która ogranicza się do genotypów roślin rodzicielskich. W związku z tym wytypowane markery selekcyjne będą miały zastosowanie jedynie w obrębie danej populacji. Alternatywą staje się wówczas zastosowanie modelu populacyjnego i populacji asocjacyjnych (AMP, ang. Association Mapping Population) stanowiących zbiór różnych linii, odmian, czy też form dzikich, a więc reprezentują szeroką (historyczną) pulę alleli danego gatunku (Zhu i in., 2008). W tym przypadku zakłada się, że pomiędzy osobnikami przez wiele pokoleń zachodziły spontaniczne akty rekombinacji. W obszarach genomu ściśle powiązanych z cechą takie akty są rzadsze co stwarza możliwość powiązania markera z cechą. Stopień powiązania markera i cechy jest określany za pomocą zjawiska nie zrównoważenia genetycznego (LD, ang. linkage disequilibrium) (Hall i in., 2010). Ponieważ AMP bazuje na zróżnicowanej puli genetycznej wykazującej zmienność fenotypową badanej cechy jest ona warunkowana

ekspresją różnych *loci* oraz form allelicznych genów. Identyfikowane markery powinny więc odzwierciedlać tę zmienność. AMP mogą być pełniej wykorzystane, gdy do badań włącza się dane pochodzące z map genetycznych lub wręcz map konsensusowych. Dzięki temu można również wnioskować o lokalizacji cech na poszczególnych chromosomach. Populacje te mają jednak swoje ograniczenia. Do badań należy wykorzystywać od 200 do 1000 osobników (zależnie od gatunku, badanej cechy), które powinny być wielokrotnie fenotypowane (w latach i środowiskach) (Zhu i in., 2008; Hall i in., 2010). Koszty zarówno markerowania jak i prac polowych są więc relatywnie wysokie. Ponadto nie dla każdego gatunku możemy dysponować tak rozległą pulą zróżnicowanych pod względem badanej cechy roślin. Cechą AMP jest również możliwość wystąpienia silnej struktury, która wpływa na wartość LD zwiększając prawdopodobieństwo identyfikacji błędnych asocjacji (Hall i in., 2010).

W ostatnich latach wzrasta znaczenie populacji wielorodzicielskich takich jak NAM i MAGIC opartych o krzyżowania w obrębie niewielkiej puli roślin rodzicielskich (Kover i in., 2009; Rafalski, 2010). Populacje te łączą zalety mapowania ilościowego i asocjacyjnego z wykorzystaniem map genetycznych i informacją o lokalizacji markerów na poszczególnych chromosomach (Yu i in., 2008). Charakteryzuje je wystarczająca do uzyskania map o wysokiej rozdzielczości liczba rekombinacji, większe niż u RIL zróżnicowanie zmienności allelicznej i fenotypowej oraz brak silnej struktury (Rafalski, 2010). Do utworzenia NAM wykorzystuje się zróżnicowane genetycznie linie danego gatunku, które krzyżuje się z jedną wybraną linią referencyjną (Yu i in., 2008). Powstałe w ten sposób potomstwo prowadzi się aż do uzyskaniu pokoleń o wysokim poziomie homozygotyczności, podobnie jak ma to miejsce w przypadku linii RIL. W populacjach MAGIC wyjściową pulę zwykle ośmiu wyrównanych linii rodzicielskich o zróżnicowanych genotypach krzyżuje się ze sobą w taki sposób by uzyskać potomstwo pokolenia F₁ będące kombinacją wszystkich form rodzicielskich (Bandillo i in., 2013). W kolejnym cyklu generatywnym wyprowadza się wszelkie możliwe kombinacje czteroliniowe. Ostatecznie krzyżuje się ze sobą czteroliniowe potomstwo łącząc tym samym osiem wyjściowych genotypów i wyprowadza populacje RIL. Znane są również populacje MAGIC, do których uzyskania wykorzystano mniejszą (Huang i in., 2012), bądź większą pulę linii rodzicielskich (Kover i in., 2009). Otrzymane populacje NAM i MAGIC poddaje się fenotypowaniu oraz genotypowaniu, poszukuje asocjacji cecha - marker z wykorzystaniem mapowania asocjacyjnego, konstruuje mapy i nanosi na nie QTL-e.

Liczebność populacji mapujących

Liczebność populacji mapujących jest niezwykle istotnym czynnikiem decydującym o uzyskaniu wysokiej rozdzielczości map genetycznych, a tym samym możliwości oraz poprawności lokalizacji poszukiwanych *loci* i właściwej ocenie ich efektów fenotypowych (Xu, 2003). Przy ustalaniu wielkości populacji należy kierować się zasadą, że im mniejszy efekt QTL-a, tym większa ilość osobników potrzebna do jego identyfikacji. Teoretycznie, jeśli wiemy jakiego efektu QTL-a możemy się spodziewać istnieje możliwość oszacowania wielkości populacji. Przykładowo dla F₂ oraz BC₁ można zastosować następujący wzór (Francis i Merk, 2012): $N_{F_2(BC_1)} = [1 - r^2_{F_2(BC_1)} / r^2_{F_2(BC_1)}] \times \{ [Z_{(1 - (\alpha / 2))} / (1 - r^2_{F_2(BC_1)})]^{1/2} + Z_{(1 - \beta)} \}^2 \times [1 + (k^2 / 2)]$, gdzie: r^2 — frakcja wariancji fenotypowej wytłumaczonej przez

QTL, k — współczynnik dominacji, α — błąd I stopnia, β — błąd II stopnia, $z_{(1-(\alpha/2))} = 1,96$, a $z_{(1-\beta)} = 1,28$ (według tabeli rozkładu normalnego).

Należy jednak pamiętać, że większość cech fenotypowych jest wynikiem sumowania się genów o niewielkim efekcie jednostkowym. W takich przypadkach ważna jest identyfikacja możliwie jak największej liczby QTL-i determinujących badaną cechę. W latach 90. William D. Bavis przeprowadził eksperyment w celu oceny wydajności mapowania interwałowego do detekcji i szacowania efektów poligenów (Bavis i in., 1998). Wykazał on, że średnia ocena wariancji fenotypowej asocjowanej z prawidłowo zidentyfikowanym QTL-em będzie znacznie przeszacowana jeśli materiał roślinny ograniczymy do 100 osobników, w niewielkim stopniu przeszacowana jeśli będzie to 500 osobników i bardzo bliska prawidłowej wartości jeśli osobników będzie 1000 (Bavis i in., 1998; Xu, 2003). Jednym słowem jeśli populacja będzie zbyt mała, zidentyfikujemy tylko kilka QTL-i o wysokich, często zawyżonych efektach fenotypowych. Musimy liczyć się również z możliwością przesunięcia QTL-i względem rzeczywistej pozycji, co może wpłynąć na błędną ocenę siły sprzężenia wytypowanych markerów z badaną cechą. W praktyce, ze względów ekonomicznych (koszty genotypowania i fenotypowania) oraz fakt, że do celów selekcji brane są pod uwagę przede wszystkim QTL-e o dużych efektach fenotypowych, wielkość dwurodzicielskich populacji mapujących ograniczana jest zazwyczaj do 100–200 osobników (Semagn i in., 2010). Podobne liczebności osiągają populacje asocjacyjne, jakkolwiek w niektórych badaniach są one rozszerzane do ponad 500 osobników (Zhu i in., 2008; Hall i in., 2010). Jeszcze liczniejsze są populacje NAM i MAGIC liczące często ponad 1000 roślin (Yu i in., 2008; Bandillo, 2013). Eksperymenty angażujące duże populacje AMP, NAM i MAGIC mają na celu identyfikację możliwie szerokiego spektrum alleli powiązanych z badaną cechą (mapowanie asocjacyjne) lub ustalenie sumarycznej wartości poszczególnych roślin stanowiących badaną populację odzwierciedlających badaną cechę (selekcja genomowa).

WYSOKOPRZEPUSTOWE METODY FENOTYPOWANIA

Zastosowanie nowoczesnych narzędzi (mapowanie asocjacyjne, selekcja genomowa) do selekcji materiałów roślinnych daje nadzieję na osiągnięcie znacznego postępu hodowlanego w niedalekiej przyszłości. Należy jednak podkreślić, że techniki te angażują niezwykle rozbudowane (kilkaset do kilku tysięcy osobników) populacje mapujące prowadzone w wielu odległych lokalizacjach środowiskowych co znacznie utrudnia bądź wręcz uniemożliwia ich fenotypowanie. Przykładowo doświadczenie z wykorzystaniem populacji NAM składającej się z 5000 linii (Yu i in., 2008) wymaga założenia 20000 poletek (w systemie: stres, kontra dwa powtórzenia). Przyjmując, że poletka będą miały wymiar 4m x 1m to eksperyment zajmie powierzchnię 8 ha (bez wliczania ścieżek i pasów granicznych). Nawet wizualny monitoring takiego obszaru zająłby jednej osobie ponad dobę, a synchronizacja oceny poszczególnych cech w czasie byłaby niemożliwa (White i in., 2012). Również gromadzenie danych byłoby procesem długotrwałym. Rozwiązaniem może być wdrożenie rozwijalnych obecnie nowoczesnych wysokoprzepustowych systemów fenotypowania (HTPPs, ang. high-throughput phenotyping platforms). Ich

zaletą jest możliwość oceny zdolności i efektywności wykorzystania promieniowania słonecznego, wody i składników odżywczych w czasie (przez cały cykl hodowlany) i przestrzeni (na poziomie łąnu) (Araus i Cairns, 2014). HTPPs działają z wykorzystaniem zjawiska teledetekcji, które jest rodzajem badania wykonywanego z pewnej odległości przy wykorzystaniu specjalistycznych sensorów (czujników). Pozyskiwanie informacji w sposób zdalny oznacza, iż badany obiekt i badający go sensor nie wchodzi ze sobą w bezpośredni kontakt dzięki czemu metoda ta jest bezinwazyjna dla roślin. Informacja o kondycji roślin uzyskiwana jest poprzez analizę przemian — odbicia, przechodzenia i pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego. Techniki teledetekcyjne możemy podzielić na pasywne i aktywne biorąc pod uwagę źródło promieniowania rejestrowanego przez sensory. Techniki pasywne są uzależnione od zewnętrznego źródła promieniowania (np. promieniowanie emitowane przez obiekty), natomiast aktywne wykorzystują własne źródła promieniowania generowane przez specjalistyczne urządzenia (radary i lidary). W teledetekcji wykorzystywanej do celów fenotypowania roślin korzysta się z wielu rodzajów obrazowania począwszy od kamer rejestrujących obraz w paśmie widzialnym, poprzez obrazowanie w podczerwieni, fluorescencyjne, spektroskopowe, 3D i tomograficzne (Li i in., 2014).

Obrazowanie w paśmie widzialnym

Do obrazowania w paśmie widzialnym wykorzystuje się tradycyjne kamery cyfrowe lub kamery RGB/CIR. W warunkach kontrolowanych (szklarnie, komory wzrostowe) zastosowanie tego typu kamer daje możliwość oceny koloru i powierzchni liści, dynamiki wzrostu, wigoru i morfologii nasion, architektury korzeni, zakresu uszkodzeń liści przez choroby, liczby i rozmieszczenia owoców (Li i in., 2014). Obrazowanie w paśmie widzialnym ma ograniczone zastosowanie w warunkach polowych pozwalając jedynie na ocenę powierzchni i zabarwienia łąnu (Li i in., 2014). Jakkolwiek połączenie danych z kilku kamer daje możliwość przeanalizowania struktury łąnu (tj. liczby roślin po wschodach, krzewienia, liczby pędów kłosośnych i płonnych na jednostce powierzchni) (Huang i in., 2013).

Obrazowanie termiczne

Obrazowanie termiczne wykorzystuje pasmo średniej podczerwieni (3-14µm) pozwalając na wizualizację promieniowania cieplnego emitowanego przez obiekt w przedziale temperatur spotykanych w warunkach codziennych. Stosowane jest do pomiaru temperatury powierzchni liści pozwalając na ocenę relacji wodnych w roślinie, co jest bezpośrednio związane z określeniem stopnia przewodności aparatów szparkowych (Araus i Cairns, 2014). Przewodność szparkowa jest istotnym wskaźnikiem stanu wodnego rośliny i dostarcza ważnych informacji na temat wzrostu roślin i ich adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych. Obrazowanie termiczne jest z powodzeniem stosowane w licznych programach hodowlanych, szczególnie tych dotyczących poprawy tolerancyjności roślin na suszę (Jones i in., 2009; Monneveux i in., 2012). Należy jednak pamiętać, że w warunkach polowych pomiary mogą być zaburzone przez szybkie zmiany temperatury otoczenia, intensywność światła, prędkość wiatru, wilgotność oraz problemy z odseparowaniem temperatury gleby od temperatury roślin (Araus i Cairns, 2014).

Obrazowanie fluorescencyjne

Obrazowanie fluorescencyjne bazuje na właściwościach chlorofilu do rozpraszania nadmiaru pochłoniętej energii (Li i in., 2014). Zjawisko takie zachodzi między innymi podczas różnego rodzaju stresów, kiedy zostaje naruszona równowaga pomiędzy podażą siły asymilacyjnej (ATP i NADPH) wytwarzanej w reakcjach fotochemicznych, a zmniejszonym popytem na te produkty w enzymatycznych reakcjach cyklu Calvina-Bensona (Kalaji i Łoboda, 2010). Pomiar intensywności fluorescencji w zależności od długości fali lub pomiar stosunku zmian intensywności fluorescencji dla różnych długości fal wzbudzenia pozwala na ocenę funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego roślin w warunkach stresowych. Obrazowanie fluorescencyjne może być stosowane zarówno w warunkach kontrolowanych, jak i polowych, jednakże na poziomie łąnu pomiar jest znacznie utrudniony poprzez możliwość zakłóceń słabego sygnału (Li i in., 2014).

Obrazowanie spektroskopowe

Obrazowanie spektroskopowe jest obecnie najbardziej obiecującą i intensywnie rozwijaną metodą umożliwiającą fenotypownie roślin zarówno w warunkach polowych jak i szklarniowych. Technika ta wykorzystuje zdolności zielonych części roślin do odbijania różnych zakresów promieniowania w różnych proporcjach (Gausman, 1985; Li i in., 2014). Wielkość odbicia będzie zależna przede wszystkim od zawartości poszczególnych barwników (głównie chlorofilu), ale również od mikrostruktury komórkowej, uwodnienia oraz zawartości składników odżywczych. Do analiz roślinności najczęściej wykorzystuje się pasmo widzialne oraz bliską i średnią podczerwień (400 do 2500 nm). W zakresie światła widzialnego (400–700 nm) wartości odbicia będą niskie ze względu na wysokie zdolności barwników, głównie chlorofilu a i b, do pochłaniania promieniowania (Knipling, 1970). Bardzo wyraźny wzrost odbicia nastąpi w zakresie bliskiej podczerwieni (750–900 nm). Widmo spektralne w tym przedziale związane jest ze strukturą komórkową liści i zależy od zawartości oraz sposobu ułożenia komórek mezofilu (Gausman, 1985). Modyfikacja odpowiedzi spektralnych roślin będzie uwidaczniała zmiany ich kondycji w warunkach stresowych. Destrukcja chloroplastów spowoduje wzrost odbicia od aparatu asymilacyjnego w zakresie widzialnym, natomiast destrukcja mezofilu i dehydratacja tkanek — silne zmiany odbicia w podczerwieni. Wyższe zakresy promieniowania (1300–2500 nm) służą do badania zawartości wody oraz innych elementów struktury roślin takich jak celuloza, karotenoidy, czy ligniny (Knipling, 1970). Do charakterystyki roślin na podstawie danych spektralnych wykorzystuje się teledetekcyjne wskaźniki roślinności. Ze względu na sposób wyliczenia można je podzielić na dwie grupy. Pierwszą stanowią wskaźniki oparte na stosunku wybranych kanałów (ang. Ratio Based Indices) takie jak RVI (ang. Ratio Vegetation Index) (Pearson i Miller, 1972) i NDVI (ang. Normalized Difference Vegetation Index) (Rouse i in., 1973). Do drugiej zaliczane są wskaźniki wykorzystujące istnienie tzw. linii gleby, takie jak PVI (ang. Perpendicular Vegetation Index) (Richardson i Wiegand, 1977) czy SAVI (ang. Soil Adjusted Vegetation Index) (Huete, 1988). W hodowli roślin (m.in. selekcji genomowej) najczęściej stosuje się NDVI obliczany jako wagowanie odpowiedzi spektralnych bliskiej podczerwieni (NIR) i czerwieni (R) według wzoru: $NDVI = (NIR - R) / (NIR + R)$. Wskaźnik ten oraz jemu podobne mogą charakteryzować fotosyntetycznie aktywną biomasę, efektywność zużycia

azotu, zawartość barwników i status wodny (Ramoelo, 2015). Innym wskaźnikiem jest tzw. indeks liściowy LAI (ang. Leaf Area Index) należący do grupy podstawowych miar opisujących strukturę roślinności. LAI jest wielkością bezwymiarową opisaną wzorem: $LAI = s/G(m^2/m^2)$, gdzie: s — funkcjonalna powierzchnia liści; G — jednostka powierzchni terenu. Pozwala on na określenie przebiegu i efektywności procesów takich jak ewapotranspiracja, transpiracja, fotosynteza oraz warunkuje produkcję pierwotną, wielkość plonów i równowagę energetyczną (Darvishzadeh i in., 2006). Wymienione wskaźniki wyliczane są w oparciu o zdjęcia wielospektralne składające się z wielu kanałów będących uogólnieniem kanałów barw podstawowych (RGB) na dowolne zakresy spektralne. Obecnie do charakterystyki roślin uprawnych zaczyna się również konstruować wskaźniki korzystające z wąskich zakresów spektralnych generowanych przez sensory hiperspektralne (Darvishzadeh i in., 2006.). Poszczególne kanały są tu znacznie gęściej rozmieszczone i obejmują niewielkie fragmenty spektrum elektromagnetycznego (10–20 nm) dzięki czemu mamy więcej możliwości wykrycia różnic w charakterze odbicia spektralnego badanych obiektów.

Obrazowanie 3D

Spośród dostępnych technologii obrazowania 3D do celów mapowania roślin używane są obecnie: LIDAR (ang. Light Detection And Ranging), PMD (ang. Photon Mixer Devices), Microsoft Kinect i systemy stereowizyjne (Li i in., 2014). Ze względu na wysoką precyzję i rozdzielczość obrazu najczęściej użytkowanym systemem zdalnego pozyskiwania informacji jest LIDAR. Wykorzystuje on skoncentrowaną wiązkę promieni świetlnych (laserowych), która wysyłana w kierunku obiektu ulega od niego odbiciu (i rozproszeniu), a wiązka zwrotna jest rejestrowana i następnie analizowana. Lasery skanerowe używane są do szybkiego szacowania LAI (Gebbers i in., 2011) oraz określenia profilu gęstości roślin na danej powierzchni (Hosoi i in., 2009). Mogą również z dużą dokładnością dostarczać danych dotyczących wysokości, pokrycia i struktury ładu (Hosoi i in., 2009).

Obrazowanie z zastosowaniem tomografii komputerowej

Do charakterystyki roślin wykorzystywane są również techniki tomografii komputerowej (CT, ang. X-ray Computed Tomography), rezonansu magnetycznego (MRT, ang. Magnetic Resonance Imaging) oraz pozytonowej tomografii emisyjnej (PET, ang. Positron Emission Detectors). Metody te mają jednak wiele ograniczeń (niska przepustowość, duża segmentacja obrazu) i mogą być stosowane głównie w warunkach kontrolowanych (Li i in., 2014). Służą do określenia zawartości wody, oceny transportu, krzewienia i jakości ziarna (Li i in., 2014). Niemniej jednak próby zastosowania CT do pomiaru wilgotności podłoża i masy korzeni w polu dały obiecujące wyniki w przypadku sorga i kukurydzy (Srayeddin i Doussan, 2009).

Platformy służące fenotypowaniu roślin

Opisane powyżej metody obrazowania można zestawiać w dowolny sposób w zależności od potrzeb konstruując platformy służące jak najdokładniejszej charakterystyce roślin (Araus i Cairns, 2014). Niewątpliwie platformy takie będą się znacznie różniły w zależności od tego, czy mają służyć fenotypowaniu roślin w polu, czy w szklarni. W warunkach kontrolowanych istnieją większe możliwości pełnego

zrobotyzowania całego procesu hodowli poprzez automatyzację dozowania nawozów i wody, montowanie specjalnych taśmociągów, które przesuwają i obracają rośliny w celu ich równomiernego oświetlenia oraz transportują je do pomieszczeń, w których przeprowadza się analizę poprzez fotografowanie w wybranych zakresach światła. Platformy takie są obecnie projektowane i sprzedawane komercyjnie do celów naukowych, chociaż oferta jest ograniczona głównie do roślin o małych rozetach takich jak rzodkiewnik (Arvidsson i in., 2011) oraz zbóż (Hartmann i in., 2011; Golzarian i in., 2011). Platformy konstruowane dla celów fenotypowania w warunkach polowych wymagają zastosowania pojazdów kołowych (np. specjalnie przystosowanych traktorów) i/lub powietrznych (helikoptery, drony, balony) wyposażonych w sensory oraz kamery umożliwiające pomiar wartości cechy w określonym czasie i na dużej przestrzeni (White i in., 2012; Li i in., 2014). Monitoring możliwy jest również poprzez obrazowanie z pokładów wysokorozdzielczych satelitów teledetekcyjnych (Ramoelo i in., 2015).

Pełna charakterystyka fenotypu roślin to nie tylko ocena polowa, ale także jakościowa i ilościowa ocena laboratoryjna. Od wielu lat do tego celu z powodzeniem wykorzystywana jest spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni (NIRS). Umożliwia ona szybką analizę zawartości białek, tłuszczu, cukrów, azotu, popiołu, fenoli, a także wagi, tekstury i wielu innych cech ziarna (Rhodes i in., 2014; Ferreira i in., 2015). NIRS stosowana jest również do analizy dyskryminacji izotopu węgla (C^{13}) w badaniach dotyczących wydajności wykorzystania wody w warunkach suszy (Li i in., 2014). Obiecującym rozwiązaniem stają się próby montowania sensorów bliskiej podczerwieni do maszyn żniwnych, co daje możliwość fizycznej i chemicznej oceny próbek, bez względu na to, czy są to tkanki wegetatywne, czy nasiona (Araus i Cairns, 2014). Prace laboratoryjne wspomagają odpowiednio zaprojektowane roboty dające możliwość mielenia, ważenia i analizy tkanek roślinnych (White i in., 2012).

Wysokoprzepustowe systemy fenotypowania roślin generują ogromne ilości danych, których nie sposób przetworzyć bez odpowiedniego zaplecza komputerowego i programów statystycznych. Zarządzanie danymi oraz umiejętność poradzenia sobie z ich przetworzeniem wymaga zatrudnienia w tego typu doświadczeniach biegłych bioinformatyków. Wydaje się, że wkrótce wąskim gardłem stanie się pozyskanie, opis i przechowanie prób zanim będą one poddane analizie.

GENOTYPOWANIE NOWEJ GENERACJI

Kolejnym czynnikiem mającym znaczenie przy identyfikacji markerów cech jest wybór systemu markerowego. Jest on w pewnym stopniu niezależny od modelu eksperymentalnego (mendelowski, populacyjny). Ponieważ obecnie znanych jest szereg obszernych opracowań poświęconych systemom markerowym (Semagn i in., 2006), a pewną lukę stanowią wysoce wydajne technologie generujące markery hybrydizacyjne oraz markery bazujące na sekwencjonowaniu nowej generacji poniżej zostaną przedstawione ich wady i zalety.

Markery hybrydizacyjne DArT

Technologia DArT (Jaccoud i in., 2001) pod wieloma względami jest podobna do AFLP (Vos 1995). Genomowy DNA jest traktowany enzymami restrykcyjnymi rozpoznającymi unikalne sekwencje DNA. Zwykle do tego celu wykorzystuje się enzym PstI wrażliwy na metylację DNA. Tym samym trawione są wyłącznie takie miejsca restrykcji, które nie są metylowane. Ponieważ uważa się, że miejsca niemetylowane są powiązane z sekwencjami kodującymi, uzyskana frakcja fragmentów DNA jest wzbogacana o te, które mogą być powiązane z cechami użytkowymi. Po dołączeniu syntetycznych adaptorów, będących dupleksami DNA, uzyskane fragmenty restrykcyjne ulegają powieleniu. W metodzie DArT wykorzystuje się również enzym rozpoznający czteronukleotydowe sekwencje DNA i niewrażliwy na metylację DNA. Taki enzym restrykcyjny dobiera się empirycznie odpowiednio do gatunku (Wenzl i in., 2004). Zastosowanie drugiego enzymu prowadzi do redukcji złożoności genomu. W ten sposób przygotowuje się zarówno biblioteki genomowe dla danego gatunku bazujące na szerokiej puli zróżnicowanego materiału roślinnego, jak i próby DNA populacji przeznaczonych do analiz. Frakcja powielonych a następnie pociętych drugim enzymem restrykcyjnym fragmentów DNA przeznaczonych do utworzenia biblioteki jest klonowana do odpowiedniego wektora, który następnie wprowadza się do komórek bakteryjnych. Wybrane klony są nanoszone na płytki, obszary markerów są powielane w wyniku reakcji PCR, a uzyskane produkty są nanoszone w ściśle zdefiniowanych pozycjach na szkiełkach tworząc macierze do genotypowania. Takie macierze są hybrydizowane z fragmentami reprezentującymi DNA badanych pojedynków. Wektorowe fragmenty DNA oraz te reprezentujące pojedynki barwione są fluorescencyjnie na dwa różne kolory, co umożliwia ich rozpoznanie przez analizę wyników doświadczeń hybrydizacyjnych. W zależności od zróżnicowania badanych materiałów uzyskuje się od kilku do kilkunastu tysięcy dominujących markerów DNA.

Markery polimorfizmu pojedynczych nukleotydów GBS (ang. Genotyping-By-Sequencing) i DArTseq (ang. Diversity Arrays Technology sequencing)

Technologia GBS (Elshire i in., 2011), podobnie jak DArTseq (Carling i in., 2015) bazuje na sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS). Jak w przypadku markerów DArT genomowy DNA jest trawiony rzadko tnącym enzymem restrykcyjnym PstI (Poland i in., 2012) w połączeniu z innym, często tnącym enzymem. Dla GBS w systemie jednoenzymowym stosowano początkowo ApeKI (Elshire i in., 2011). Otrzymane fragmenty DNA poddaje się ligacji z dwoma rodzajami adaptorów komplementarnych do lepkich końców powstałych po trawieniu enzymami rzadko tnącymi. Adaptory różnią się obecnością lub brakiem kilkunukleotydowych (4–8pz) sekwencji identyfikatorowych zwanych w języku angielskim "barcode". Po inaktywacji ligazy DNA T4 preparaty pochodzące od pojedynczych osobników łączy się ze sobą i powiela z wykorzystaniem odpowiednich starterów komplementarnych do sekwencji adaptorów. Po weryfikacji wielkości uzyskanych fragmentów DNA uzyskanej biblioteki następuje etap sekwencjonowania. Dzięki "barcode'om" polimorfizm pojedynczych nukleotydów identyfikowany w obrębie poszczególnych sekwencji DNA występujących w badanej puli obiektów jest przypisany do określonych roślin. Opisane technologie generują od kilkunastu do kilkuset tysięcy głównie kodominujących markerów DNA.

Technologia hybrydizacyjna i sekwencyjna różnią się więc zarówno pod względem metodycznym, wydajnością jak i typem uzyskiwanych markerów. Ponadto, polimorfizm markerów DArT wynika ze zmian identyfikowanych w obszarach miejsc restrykcyjnych natomiast w przypadku markerów DArTseq czy GBS istotniejszą rolę odgrywają zmiany sekwencyjne. Nie należy jednak wykluczać sytuacji kiedy zmienność jest wynikiem zróżnicowania w obrębie miejsc restrykcyjnych poszczególnych osobników. To właśnie takie zmiany mogą prowadzić do powstawania markerów dominujących (silicoDArT) widocznych w technologii DArTseq. Zaletą markerów sekwencyjnych jest obecność informacji o konkretnej sekwencji w genomie. Ułatwia to ich konwersję do markerów specyficznych ukierunkowanych bezpośrednio na miejsce polimorfizmu. W przypadku markerów DArT koniecznym jest projektowanie starterów do sekwencji markerowych. Ponieważ zmienność jest wynikiem różnic w obrębie miejsc restrykcji markery specyficzne nie muszą być polimorficzne.

PODSUMOWANIE

Konwencjonalna hodowla roślin uprawnych opiera się na wizualnym doborze odpowiednich osobników rodzicielskich do krzyżowań. W ich wyniku otrzymuje się segregujące pod względem danej cechy, liczne pokolenie generatywne, które podlegają dalszej selekcji. Takie podejście jest kosztowne, pracochłonne, wymaga posiadania dużej powierzchni do obsiewu i daje możliwość uzyskania nowej odmiany dopiero po 8–10 latach. Ponadto liczba cech przejawiających się w wyglądzie zewnętrznym (tzn. markerów morfologicznych, fenotypowych) jest ograniczona, a poziom ich ekspresji będzie uzależniony od genotypu (organizmu) i warunków środowiska. Zintegrowanie genetyki molekularnej z tradycyjnymi metodami selekcji roślin gwarantuje obiektywną ocenę fenotypu z uwzględnieniem czynników środowiskowych i daje możliwość eliminacji niepożądanych genotypów już na etapie siewki skracając tym samym czas hodowli. Rozwój biologii molekularnej, a w szczególności metod kultur *in vitro*, technologii markerowych (np. sekwencjonowanie nowej generacji), opracowanie map genetycznych gatunków uprawnych, czy też wykorzystanie mapowania genetycznego, mapowania cech ilościowych, a ostatnio również mapowania asocjacyjnego w połączeniu z odpowiednio dobranymi populacjami mapującymi oraz zautomatyzowanymi metodami fenotypowania roślin otwierają przed hodowlą nowe możliwości.

LITERATURA

- Araus J. L., Cairns J. E. 2014. Field high-throughput phenotyping: the new crop breeding frontier. *Trends in Plant Science* 19, 1: 52 — 61.
- Arvidsson S., Pérez-Rodríguez P., Mueller-Roeber B. 2011. A growth phenotyping pipeline for *Arabidopsis thaliana* integrating image analysis and rosette area modeling for robust quantification of genotype effects. *New Phytol.* 191: 895 — 907.
- Bandillo N., Raghavan C., Muyco P. A., Lynn Sevilla M. A., Lobina I. T., Dilla-Ermita C. J., Tung C.-W., McCouch S., Thomson M., Mauleon R., Singh R. K., Gregorio G., Redoña E., Leung H. 2013. Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: progress and potential for genetics research and breeding. *Rice* 6: 11.

- Beavis W. D. 1998. Molecular dissection of complex traits. QTL analyses: power, precision, and accuracy. Eds A. H. Paterson. CRC Press, New York, pp. 145 — 162.
- Bednarek P. T., Orłowska R., Koebner R. M. D., Zimny J. 2007. Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). BMC Plant Biology 7: 10.
- Carling J., Heller-Uszyńska K., Jaccoud D., Machado A., Hopper C., Xia L., Vippin C., Caig V., Uszyński G., Kilian A. 2015. DARrTTM and DARtseqTM genome profiling for breeding, pre-breeding and population genetics applications. Contribution P0052, XXIII Plant and Animal Genome, San Diego, CA pp. 10 — 14.
- Darvishzadeh R., Atzberger C., Skidmore A. K. 2006. Hyperspectral vegetation indices for estimation of leaf area index. ISPRS Commission VII Mid-term Symposium "Remote Sensing: From Pixels to Processes", Enschede, the Netherlands, 8–11 May.
- Elshire R. J., Glaubitz J. C., Sun Q., Poland J. A., Kawamoto K., Buckler E. S., Mitchell S. E. 2011. A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. PLoS ONE 6, 5: e19379.
- Ferreira D. S., Pallone J. A. L., Poppi R. J. 2015. Direct analysis of the main chemical constituents in Chenopodium quinoa grain using Fourier transform near-infrared spectroscopy. Food Control 48: 91 — 95.
- Francis D. M., Merk H. L. 2012. Equation to estimate sample size required for QTL detection. Plant Breeding and Genomics. http://www.extension.org/pages/32355/equation-to-estimate-sample-size-required-for-qlt-detection#.VP7P9fmG__E.
- Gausman H. W. 1985. Plant leaf optical properties in visible and near-infrared light. Texas Tech Press; Lubbock, Texas, Graduate Studies No. 29.
- Gebbers R., Ehlert D., Adamek R. 2011. Rapid mapping of the leaf area index in agricultural crops. Agron. J. 103: 1532 — 1541.
- Golzarian M. R., Frick R. A., Rajendran K., Berger B., Roy S., Tester M., Lun D. S. 2011. Accurate inference of shoot biomass from high-throughput images of cereal plants. Plant Methods 7: 1 — 11.
- Hall D., Tegström C., Ingvarsson P. K. 2010. Using association mapping to dissect the genetic basis of complex traits in plants. Brief. Funct. Genomics 9, 2: 157 — 165.
- Hartmann A., Czauderna T., Hoffmann R., Stein N., Schreiber F. 2011. HTPPheno: An image analysis pipeline for high-throughput plant phenotyping. BMC Bioinf. 12: 148.
- Hosoi F., Omasa K. 2009. Estimating vertical plant area density profile and growth parameters of a wheat canopy at different growth stages using three-dimensional portable lidar imaging. ISPRS J. Photogramm. Remote Sens. 64: 151 — 158.
- Huang B. E., George A. W., Forrest K. L., Kilian A., Hayden M. J., Morell M. K., Cavanagh C. R. 2012. A multiparent advanced generation inter-cross population for genetic analysis in wheat. Plant Bio. J. 10: 826 — 839.
- Huang C., Yang W., Duan L., Jiang N., Chen G., Xiong L., Liu Q. 2013. Rice panicle length measuring system based on dual-camera imaging. Comput. Electr. Agric. 98: 158 — 165.
- Huete A. R. 1988. A Soil-Adjusted Vegetation Index (SAVI). Remote Sensing Of Environment 25: 295 — 309.
- Jaccoud D., Peng K., Feinsein D., Kilian A., 2001. Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. Nucleic Acids Research 29, 4: 25.
- Jones H. G., Serraj R., Brian R. L., Xiong L., Wheaton A., Price A.H. 2009. Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. Funct. Plant Biol. 36: 978 — 989.
- Kalaji M. H., Łoboda T. 2009. Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Knipling, E. B. 1970. Physical and physiological basis for the reflectance of visible and near-infrared radiation from vegetation. Remote Sens. Environ. 1: 155 — 159.
- Kover P. X., Valdar W., Trakalo J., Scarcelli N., Ehrenreich I. M., Purugganan M. D., Durrant C., Mott R. 2009. A multiparent advanced generation inter-cross to fine-map quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. PLoS Genet 5, 7: e1000551.
- Li L., Zhang Q., Huang D. 2014. A review of imaging techniques for plant phenotyping. Sensors 14: 20078 — 20111.

- Monneveux P., Jing R., Misra S. C. 2012. Phenotyping for drought adaptation in wheat using physiological traits. *Frontiers in Physiology* 3, 429: 1 — 12.
- Niedziela A., Bednarek P. T., Labudda M., Mańkowski D. R., Anioł A. 2014. Genetic mapping of a 7R Al tolerance QTL in triticale (x *Triticosecale* Wittmack). *J. App. Genetics* 55, 1: 1 — 14.
- Pearson R. L., Miller L. D. 1972. Remote mapping of standing crop biomass for estimation of the productivity of the short-grass. *Prairie, Pawnee National Grassland, Colorado: 8th international symposium on remote sensing of environment*. pp. 1357 — 1381.
- Poland J. A., Brown P. J., Sorrells M. E., Jannink J.-L. 2012. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS ONE* 7, 2: e32253.
- Rafalski J. A. 2010. Association genetics in crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 174 — 180.
- Ramoelo A., Dzikiti S., van Deventer H., Maherry A., Cho M. A., Gush M. 2015. Potential to monitor plant stress using remote sensing tools. *J. Arid Env.* 113: 134 — 144.
- Rhodes D. H., Hoffmann L. Jr, Rooney W. L., Ramu P., Morris G. P., Kresovich S. 2014. Genome-wide association study of grain polyphenol concentrations in global sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) germplasm. *J. Agric Food Chem.* 62, 45: 10916 — 27.
- Richardson A. J., Wiegand C. L. 1977. Distinguishing vegetation from soil background information. *Photogramm. Eng. Remote Sens.* 43: 1541 — 1552.
- Semagn K., Bjørnstad Å., Ndjiondjop M. N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 25: 2540 — 2568.
- Semagn K., Bjørnstad Å., Xu Y. 2010. The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electron J Biotechnol.* 13: 5, <http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue5-fulltext-14>.
- Srayeddin I., Doussan C. 2009. Estimation of the spatial variability of root water uptake of maize and sorghum at the field scale by electrical resistivity tomography. *Plant Soil* 319: 185 — 207.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Rijans M., Van de Lee T., Hormes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407 — 4414.
- Wenzl P., Carling J., Kudrna D., Jaccoud D., Huttner E., Kleinhofs A., Kilian A. 2004. Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9915 — 9920.
- White J. W., Andrade-Sanchez P., M. A. Gore, Bronson K. F., Coffelt T. A., Conley M. M., Feldmann K. A., French A. N., Heun J. T., Hunsaker D. J., Jenks M. A., Kimball B. A., Roth R. L., Strand R. J., Thorp K. R., Wall G. W., Wang G. 2012. Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crops Research* 133: 101 — 112.
- Xu S. 2003. Theoretical basis of the Beavis effect. *Genetics* 165: 2259 — 2268.
- Yu J., Holland J. B., McMullen M. D., Buckler E. S. 2008. Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. *Genetics* 178: 539 — 551.
- Zhu C., Gore M., Buckler E. S., Yu J., 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *Plant Gen.* 1: 5 — 20.

WERONIKA JARSKA
AGNIESZKA NIEDZIELA *
RENATA ORŁOWSKA
PIOTR T. BEDNAREK

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Strategie molekularne w nowoczesnej hodowli roślin

Molecular strategies in modern plant breeding

Rozwój biologii molekularnej, a w szczególności technologii markerowych oraz narzędzi statystycznych umożliwiających analizę dużej liczby danych uzyskiwanych dla szerokiego typu populacji mapujących sprawia, że zmienia się podejście do selekcji materiałów roślinnych dla potrzeb hodowli. Coraz silniejszy nacisk kładzie się na selekcję wielu cech użytkowych przy jednoczesnym wykorzystaniu elitarnych, zwykle niespokrewnionych ze sobą lecz wyrównanych pod względem genetycznym materiałów roślinnych. Rozwijane obecnie metody umożliwiające prowadzenie selekcji za pomocą markerów DNA w oparciu o złożone populacje mapujące są znane tylko wąskiej grupie specjalistów natomiast metody wykorzystujące ściśle zdefiniowane modele genetyczne, ze względu na ich liczne ograniczenia, zdają się być negowane. Niniejsza praca poświęcona jest omówieniu możliwości metod selekcji wykorzystujących szeroki wachlarz metod biologii molekularnej.

Słowa kluczowe: mapowanie genetyczne, mapowanie asocjacyjne, selekcja genomowa

Advances in molecular biology, including the new marker technologies and statistical tools allow analysis of large data sets evaluated for different types of mapping populations and change approaches to selection of breeding materials. The emphasis is put on selecting many traits simultaneously based on elite, usually non-related but genetically uniform, plant materials. Currently available methods for selecting forms via DNA-based marker technologies using complex mapping populations are well known to a limited number of specialists whilst applications involving defined mendelian populations (due to their numerous limitations) are being neglected. Thus, the review is dedicated to describing wide range of selection approaches that could be applied to different breeding programs depending on experimental requirements.

Key words: association mapping, genetic mapping, genomic selection

*Autor korespondencyjny: Agnieszka Niedziela

Redaktor prowadzący: Barbara Zagdańska

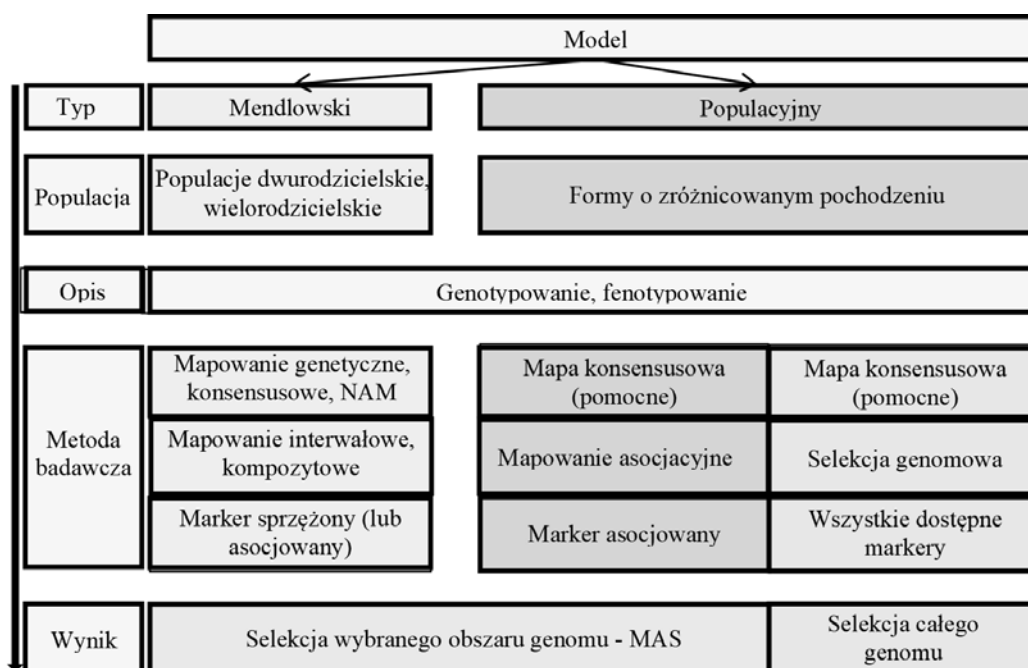
WSTĘP

Dynamiczny rozwój metod biologii molekularnej, a w szczególności technik bazujących na markerach DNA, coraz częściej znajduje odzwierciedlenie w hodowli roślin. Wraz z wykorzystaniem pierwszych markerów DNA do selekcji form o podwyższonej tolerancyjności na choroby (Young i in., 1988; McMullen i Louie, 1989) czy opracowaniem markerów wybranych cech ilościowych (Lander i Botstein, 1989), oczywistym stało się, że taka selekcja nie zawsze spełnia wszystkie stawiane przed nią oczekiwania. Problemem stała się selekcja form o podwyższonych wartościach cech warunkowanych wieloma *loci*, czy szeregiem różnych alleli tylko częściowo tłumaczących obserwowaną zmienność (Kearsey i Farquhar, 1998). Konieczne było opracowanie takich narzędzi molekularnych i statystycznych, które podołałyby wymogom współczesnej hodowli. Wraz z rozwojem technologii umożliwiających uzyskanie dużej liczby użytecznych markerów DNA, włączeniem do selekcji narzędzi genetyki populacyjnej, rozwinięto takie metody jak mapowanie asocjacyjne (Pritchard i in., 2000) oraz selekcję genomową (Meuwissen i in., 2001). To właśnie te narzędzia mogą okazać się najbardziej użyteczne w selekcji. Ich potencjał nie jest jeszcze do końca poznany, a w przypadku selekcji genomowej wiele modeli znajduje się w fazie badań i wymaga weryfikacji eksperymentalnej (Nakaya i Isobe, 2012). Takie badania są już realizowane przez duże firmy hodowlane, jednak uzyskiwane wyniki nie są powszechnie dostępne. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie możliwości oraz zastosowań narzędzi badawczych wykorzystywanych do selekcji materiałów hodowlanych bez wnikania w złożoności matematyczno-statystyczne oraz pokazanie obszarów ich wykorzystania w hodowli roślin uprawnych.

MODELE SELEKCJI BAZUJĄCE NA MARKERACH DNA

Można wyróżnić dwa zasadnicze modele selekcji wspartej markerami DNA, a mianowicie model bazujący na genetyce mendlowskiej i genetyce populacyjnej (rys. 1). Pierwszy z nich bazuje na populacjach roślinnych, których formy rodzicielskie są zdefiniowane. W tym przypadku wyróżnia się populacje dwurodzicielskie takie jak: pokolenie F_2 , linie podwojonych haploidów (DH, ang. Double Haploid), linie blisko-izogeniczne (NIL, ang. Near Isogenic Lines) i rekombinacyjne linie wsobne (RIL, ang. Recombinant Inbred Lines) oraz populacje wielurodzicielskie takie jak MAGIC (ang. Multi-parent Advanced Generation Inter-Cross populations), czy NAM (ang. Nested Association Mapping). Model bazujący na metodach genetyki populacyjnej nie wymaga znajomości pochodzenia badanych form. Zakłada jednak, że są one zróżnicowane, a w zależności od przyjętej strategii wykorzystuje się formy mniej lub bardziej wyrównane genetycznie. Niezależnie od konkretnego modelu badane populacje są genotypowane za pomocą markerów DNA oraz fenotypowane. W przypadku populacji mendlowskich zwykle budowane są mapy genetyczne, które następnie służą do identyfikacji obszarów genomu kodujących badaną cechę. Jeśli w tych obszarach znajdują się markery silnie sprzężone z cechą mogą one zostać poddane weryfikacji, a następnie wykorzystane w

procesie selekcji wspartej markerami molekularnymi (MAS, ang. Marker Assisted Selection). Przy takim podejściu użytecznym jest konstruowanie map konsensusowych, gdyż uwzględniają one zmienność genetyczną wielu form rodzicielskich. Nie zawsze jednak dostępne są populacje właściwe do mapowania genetycznego. Zwykle łatwiej dostępny jest zróżnicowany materiał hodowlany. W zależności od tego, czy celem jest selekcja cech warunkowanych silnymi, czy słabymi genami odpowiedzialnymi za ekspresję cechy wyróżnia się mapowanie asocjacyjne oraz selekcję genomową. Pierwsza, analogicznie do markerów identyfikowanych za pomocą modelu mendlowskiego, umożliwia identyfikację markerów określonych obszarów genomu, druga uznaje, że ważne są wszystkie markery gdyż odzwierciedlają złożoność genomu i interakcję poszczególnych jego obszarów, a tym samym również złożoność samej cechy.



Rys. 1. Modele selekcji bazujące na markerach DNA

Fig. 1. Selection models based on DNA markers

MODELE MENDLOWSKIE

Metody selekcji bazujące na modelu mendlowskim składają się z kilku etapów: wyboru populacji mapującej, fenotypowania, genotypowania, konstruowania mapy genetycznej, analizy statystycznej powiązań cecha-marker, typowania markerów do selekcji, a następnie ich walidacji. Istnieje wiele możliwych strategii w zależności od złożoności badanej cechy.

Cechy monogenowe

W selekcji cech monogenowych zakłada się, że marker jest silnie sprzężony z genem odpowiedzialnym za ekspresję cechy. Identyfikacja takiego markera zwykle wymaga wyprowadzenia populacji mapujących typu F_2 , BC lub DH. Następnie taka populacja jest fenotypowana i genotypowana. Do celów statystycznych wykorzystuje się metodę analizy pojedynczego markera (SMA, ang. Single-Marker Analysis) zwaną też metodą regresji (Sax, 1923). Metoda ta pozwala na wytypowanie markerów sprzężonych z cechą poprzez określenie korelacji fenotypu z segregującymi markerami DNA (Mauricio, 2001). Wykorzystuje ona trzy podstawowe metody statystyczne: t-test, analizę wariancji (ANOVA) oraz regresję liniową (Boopathi, 2013). Po raz pierwszy w genetyce roślin SMA została zastosowana przez Karla Saxa w 1923, który udowodnił za jej pomocą istnienie powiązań pomiędzy kolorem nasion fasoli a ich wagą (Sax, 1923). Zaletą SMA jest brak konieczności konstruowania map genetycznych. Marker wykryty tą metodą będzie użyteczny głównie na puli roślin, na której został opracowany i może się okazać nieefektywny w przypadku innych materiałów roślinnych (Xu i Crouch, 2008). Ze względu na prostotę eksperymentalną opisane podejście znalazło zastosowanie w przypadku licznych chorób warunkowanych pojedynczymi genami oraz cech, których ekspresja zachodzi w późnych fazach rozwojowych bądź cech, które ujawniają się w zależności od warunków środowiskowo-klimatyczno-glebowych (Semagn i in., 2010; Boopathi, 2013).

Cechy wielogenowe

Identyfikacja markerów cech wielogenowych z wykorzystaniem genetyki mendlowskiej wymaga opracowania map genetycznych oraz dobrze fenotypowanych populacji, głównie dwurodzicielskich. Mapy genetyczne są zagęszczane markerami molekularnymi, a następnie analizowane statystycznie w celu wykrywania obszarów genomu warunkujących ekspresję cechy. Populacje dwurodzicielskie bazują na homozygotycznych roślinach rodzicielskich różniących się pod względem badanej cechy. Można je podzielić na dwie grupy: „śmiertelne” i „nieśmiertelne” (Boopathi, 2013). Pierwsze z nich mają ograniczone zastosowanie i służą zwykle do wstępnych badań. Przykładem takiej populacji są rośliny pokolenia F_2 . Natomiast takie populacje jak NIL, RIL, czy DH mogą być wykorzystywane wielokrotnie. Ich zaletą jest ustabilizowany genotyp i możliwość badania cechy w wielu powtórzeniach w różnych środowiskach bez konieczności prowadzenia wielokrotnych analiz molekularnych. Wybór populacji mapującej w znacznej mierze determinuje rozdzielczość uzyskiwanych map genetycznych (Soto-Cerda i Cloutier, 2012). Ze względu na liczbę procesów rekombinacyjnych najmniejszą rozdzielczością cechują się populacje pokolenia F_2 , a najwyższą linie RIL. W przypadku populacji DH częstość rekombinacji zostaje niezmienna z chwilą wytworzenia linii DH (Rafalski, 2010). Przy wyborze populacji mapującej należy uwzględnić czas potrzebny na jej wyprowadzenie. Najdłużej wyprowadza się linie RIL, najkrócej populacje DH. Kolejnym czynnikiem decydującym o wyborze populacji jest jej liczebność niezbędna do uzyskania pożądanej rozdzielczości przy mapowaniu oraz związane z tym koszty genotypowania i fenotypowania. Zależnie od wymaganego stopnia zagęszczenia map genetycznych do genotypowania wykorzystuje się różne systemy markerowe. Do niedawna były to markery kodominujące, takie jak markery polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych

(RFLP, ang. Restriction Fragments Length Polymorphism), następnie markery mikrosatelitarnego polimorfizmu krótkich tandemowych powtórzeń (SSR, ang. Simple Sequence Repeats) oraz markery dominujące polimorfizmu losowo powielonych fragmentów DNA (RAPD, ang. Random Amplification Polymorphic DNA), markery amplifikacji polimorficznego DNA z użyciem arbitralnie dobranego startera (AP-PCR, ang. DNA fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction), markery polimorfizmu długości amplifikowanego fragmentu (AFLP, ang. Amplified Fragments Length Polymorphism) czy DArT (ang. Diversity Arrays Technology). Obecnie, ze względu na malejące koszty sekwencjonowania oraz możliwość uzyskania nieograniczonej liczby markerów, zastosowanie znajdują markery GBS (Genotyping by Sequencing) czy DArTseq bazujące na sekwencjonowaniu nowej generacji (Next Generation Sequencing). Uzyskane markery DNA służą do opracowania map genetycznych niezbędnych do mapowania cech ilościowych.

Istotnym elementem mapowania cech ilościowych było rozwinięcie odpowiednich metod statystycznych. Pierwszą z takich metod było mapowanie interwałowe (IM, ang. Interval Mapping), które opracowano w 1989 roku (Lander i Botstein, 1989). Mapowanie interwałowe wykorzystuje informacje od dwóch brzegowych markerów i polega na ustaleniu sprzężenia między *locus* cechy ilościowej (QTL, ang. Quantitative Trait Loci), a markerami ograniczającymi wyznaczony przedział na mapie genetycznej (Zeng, 1993; Broman, 2001). Prawdopodobieństwo wystąpienia *locus* cechy ilościowej jest określane na podstawie krzywej prawdopodobieństwa rozkładu cechy (LOD, ang. logarithm of the odds ratio), a wiarygodność takiego wyniku jest testowana permutacyjnie (Lander i Botstein, 1989). Jeśli maksimum krzywej LOD przewyższa wartość krytyczną (wartość testu permutacji), to dany obszar genomu najprawdopodobniej jest odpowiedzialny za ekspresję badanej cechy. Praktyka pokazuje jednak, że uzyskiwany wynik niekoniecznie odzwierciedla rzeczywistą sytuację. Wielokrotnie obserwowano, że identyfikowany QTL nie był stabilny i zmieniał swoją lokalizację (Zeng, 1993). W niektórych przypadkach obserwowano występowanie silnych, ale całkowicie nierzeczywistych QTL-i (tzw. ghost QTL) (Jansen, 1993; Mauricio, 2001). Poza tym, jeśli cecha jest warunkowana kilkoma QTL-ami występującymi w bliskim sąsiedztwie, to uzyskiwane wyniki zwykle są silnie zniekształcone (Boopathi, 2013; Broman, 2001). Mimo ograniczeń metodę z powodzeniem wykorzystano do identyfikacji QTL-i związanych z cechami morfologicznymi soi takimi jak wielkość liści czy waga nasion (Mansur i in., 1993), do identyfikacji QTL związanych z cechami morfologicznymi i plonotwórczymi u ryżu (Thomson, 2003), określenia lokalizacji QTL-a determinującego wysokość roślin sorgo (Pereria i Lee, 1995), czy badań nad heterozją rzodkiewnika (Mitchel-Olds, 1995).

Rozwinięciem metody IM jest regresyjne mapowanie interwałowe (RIM, ang. Regression Interval Mapping), opracowane w roku 1992 przez Haleya i Knotta (Haley i Knott, 1992). RIM zwiększa prawdopodobieństwo mapowania i ogranicza czas poświęcony na obliczenia, jednakże zdolność wykrywania QTL-i w porównaniu z tradycyjnym IM jest tu mniejsza. W 1993 roku Jansen (1993) i Zeng (1993, 1994) połączyli mapowanie interwałowe ze złożoną analizą regresyjną. Zeng (1993) nazwał to podejście złożonym mapowaniem interwałowym (CIM, ang. Composite Interval Mapping). CIM

pozwała na sprawdzanie efektu QTL-i w innych interwałach lub chromosomach dzięki czemu zwiększa się precyzja ich wykrywania. Innym rozwiązaniem jest opisane w 1999 (Kao i in., 1999) wielokrotne mapowanie interwałowe (MIM, ang. Multiple Interval Mapping). Metoda ta pozwala na zredukowanie oddziaływania QTL-i w tej samej grupie sprzężeń. Dzięki temu uzyskane informacje o lokalizacji QTL-a pozbawione są błędów wynikających z jego obecności w innych regionach chromosomu. Poza tym stosowanie tej metody pozwala wykryć epistazę i oszacować indywidualną wartość genotypową oraz zdolność dziedziczenia. Wielokrotne mapowanie interwałowe jest obecnie najbardziej precyzyjną metodą wykrywania QTL. Z powodzeniem zostało wykorzystane do mapowania licznych QTL u wielu gatunków roślin (Qi in., 2014; Zeng i in., 2014; Chankaew i in., 2014).

Entuzjazm związany z wykorzystaniem IM, a następnie wariantów CIM został stopniowo zastąpiony umiarkowanym optymizmem. Okazało się, że mimo selekcji określonych obszarów genomu kontrolowanej za pomocą markerów DNA, podejmowane działania nie dawały oczekiwanych rezultatów (Mauricio, 2001; Broman, 2001). Uznano, że przyczyną niepowodzeń mogło być niekorzystne usytuowanie obszarów kodujących cechę w genomie biorcy, czy też brak sekwencji genomowych odpowiedzialnych za jej ekspresję. Nawet w przypadku udanej selekcji (np. gen przywracania płodności pyłku u żyta z CMS pampa lokalizujący się na chromosomie 4R) pożądanego genu za pomocą silnie sprzężonych markerów wraz z cechą przenoszone były geny niekorzystne (przeciąganie genetyczne) (Hospital, 2005). Kolejnym problemem okazała się niska powtarzalność lokalizacji cechy na mapach genetycznych. Uznano, że może to być przyczyną niepowodzenia przy próbach selekcji cech ilościowych (Boopathi, 2013). Kolejnym ograniczeniem metody mapowania cech ilościowych okazało się ich "uzależnienie" od form rodzicielskich populacji mapujących (Soto-Cerda i Cloutier, 2012). Możliwym było identyfikowanie wyłącznie tych QTL, które były reprezentowane przez rodziców populacji. Selekcja nie mogła wykorzystywać całej dostępnej puli genetycznej cechy czy też licznych form allelicznych poszczególnych genów (Semagn i in., 2010). Początkowo rozwiązaniem było prowadzenie wielu populacji mapujących. Jednak takie podejście okazało się kosztowne i pracochłonne i nie dawało gwarancji powodzenia. Istotne znaczenie miało to dla cech kodowany przez wiele *loci*, które miały średni i niski wkład do wytłumaczonej zmienności fenotypowej. Zaletą metody było jednak opracowanie licznych map genetycznych gatunków roślin uprawnych. Stworzyło to podwaliny rozwoju zaawansowanych metod analitycznych.

Omawiane powyżej metody w zdecydowanej większości bazują na jednej populacji mapującej. Takie podejście jest mało wydajne, gdyż uwzględnia zmienność dostępną jedynie w obrębie badanych form rodzicielskich, a identyfikowane QTL niekoniecznie muszą być najistotniejszymi QTL-ami cechy (Boopathi, 2013). Ponadto, pojedyncze mapy dostarczają ograniczonej informacji o lokalizacji markerów DNA i przez to typowanie nowych markerów cechy jest utrudnione i wymaga wyprowadzania dodatkowych populacji mapujących. Rozwiązaniem jest opisane w 1995 roku tworzenie zintegrowanych map konsensusowych. Polega ono na poszukiwaniu wspólnych markerów dla wielu populacji mapujących i aproksymowaniu lokalizacji pozostałych markerów na wirtualnych mapach

gatunku, co daje pełniejsze pokrycie genomu (Yap i in., 2003). Dane z różnych populacji stają się wspólną pulą informacji o położeniu *loci* na chromosomach i ich wzajemnego uszeregowania. Jako pierwsze powstały mapy konsensusowe dla jęczmienia (Langridge i in., 1995) i pszenicy (Gale i in. 1995). Następnie opracowano mapy m.in. dla żyta (Börner i Korzun, 1998; Milczarski i in. 2011), ryżu (Kennard, 1999) czy pszenżyta (Alheit i in., 2011).

Populacje wielorodzicielskie

Zwiększenie zmienności genotypowej można osiągnąć poprzez zastosowanie populacji wielorodzicielskich NAM lub MAGIC. Do utworzenia NAM wykorzystuje się liczne dwurodzicielskie populacje mapujące (najlepiej RIL), które mają wspólnego rodzica (Yu i in., 2008). Otrzymane populacje wykorzystuje się zarówno do mapowania interwałowego jak i asocjacyjnego. W populacjach MAGIC wyjściową pulę, zwykle ośmiu wyrównanych linii rodzicielskich krzyżuje się ze sobą tak by uzyskać zestaw roślin pokolenia F₁ o ściśle zdefiniowanym dwurodzicielskim pochodzeniu reprezentowanym przez wszystkie możliwe kombinacje form rodzicielskich (Cavanagh i in., 2008). Rośliny pokolenia F₁ krzyżuje się następnie, aż do uzyskania mieszańców łączących całą pulę ośmiu wyjściowych genotypów i wyprowadza populacje RIL. Taki model pozwala na bardzo precyzyjną detekcję QTL-i z dokładnością do sub-centymorganów przy 1000 osobników. Ponadto 8-rodzicielskie populacje RIL charakteryzuje wysokie zróżnicowanie zmienności allelicznej i fenotypowej oraz barak silnej struktury (Cavanagh i in., 2008).

MODELE POPULACYJNE

Omawiane powyżej metody u swej podstawy były ukierunkowane na ściśle zdefiniowane obszary genomu odpowiedzialne za ekspresję badanej cechy. Okazało się jednak, że markery identyfikowane za pomocą opisanych metod wykorzystujących populacje dwu- oraz wielorodzicielskie, choć umożliwiały selekcję cechy, nie zawsze prowadziły do oczekiwanego rezultatu (Heffner, 2009). Taka sytuacja może mieć miejsce gdy cecha jest złożona, a geny odpowiedzialne za jej ekspresję warunkują niewielki stopień wytłumaczonej wariancji. Na ekspresję cechy może mieć również wpływ tło genetyczne (Hamblin, 2011). Tak więc selekcja tylko wybranych obszarów może być mało wydajna. Alternatywą do omawianych wyżej metod wykorzystujących do mapowania modele mendelowskie są stosowane od niedawna modele populacyjne, do których możemy zaliczyć mapowanie asocjacyjne (Pritchard, 2000) oraz rozwijaną obecnie selekcję genomową (Meuwissen i in., 2001).

Mapowanie asocjacyjne

Mapowanie asocjacyjne (AM, ang. Association Mapping), zakłada, że do badań brane są liczne materiały roślinne (zwykle niespokrewnione lub daleko spokrewnione o dużym stopniu wyrównania w obrębie poszczególnych linii) (Rafalski, 2010). Liczebność badanej populacji jest zależna od gatunku oraz cechy. W celu osiągnięcia pożądanego efektu wielkość populacji mapującej może się wahać od około 200 do 800 osobników (Hall i in., 2010). Zwiększanie rozmiaru populacji zwykle nie jest uzasadnione ekonomicznie (Semagn i in., 2010). Zastosowanie zróżnicowanych materiałów roślinnych powoduje, że

akty rekombinacji zachodzące we wcześniejszych etapach wyprowadzenia materiałów były częste, a zawarta pomiędzy nimi zmienność odzwierciedla zmienność danej puli genetycznej (Soto-Cerda i Cloutier, 2012). Tak więc identyfikowane markery cechy powinny być użyteczne na szerszym materiale roślinnym. Metoda zakłada, że wszystkie analizowane materiały roślinne są badane pod względem konkretnej cechy oraz są profilowane za pomocą odpowiednich markerów DNA. W przeciwieństwie do metod bazujących na populacjach biparentalnych w mapowaniu asocjacyjnym zamiast sprzężenia markera z cechą określa się jego asocjację. Im silniej marker jest asocjowany z cechą tym silniejsze niezrównoważenie sprzężeń (LD, ang. linkage disequilibrium). Oznacza to, że prawdopodobieństwo identyfikacji obszaru występowania cechy w genomie ulega zawężeniu do węższego obszaru genomu niż to ma miejsce w przypadku badań prowadzonych na populacjach dwurodzicielskich (Soto-Cerda i Cloutier, 2012). Wynika to z faktu, że podczas wielu aktów rekombinacji tylko markery występujące bardzo blisko poszukiwanych genów pozostały w ich sąsiedztwie podczas gdy pozostałe obszary genomu, w miarę kolejnych aktów rekombinacji, wykazują coraz niższe niezrównoważenie. Aby móc identyfikować markery cechy należy dysponować dużą liczbą markerów, które gęsto i równomiernie pokrywają genom. Gęstość takiego pokrycia jest zależna od wartości niezrównoważenia sprzężeń, które będzie zależęć od gatunku oraz cechy (Hall i in., 2010). W efekcie do takich badań konieczne są markery uzyskiwane metodami sekwencjonowania nowej generacji takie jak GBS (Elshire i in., 2011) czy DArTseq (Carling i in., 2015) oraz stosunkowo duże moce obliczeniowe (Hall i in., 2010).

W mapowaniu asocjacyjnym wyróżniono dwa podejścia: asocjacja genów kandydatów (ang. Candidate gene asociacion) oraz skanowanie całego genomu (GWAS, ang. Genome — Wide Association Study). W przypadku asocjacji genów kandydatów sprawdzana jest hipoteza: „czy jest jakaś korelacja pomiędzy polimorfizmem DNA w określonym genie a cechą”. Przy braku szczegółowej wiedzy biochemicznej związanej z poszukiwaną cechą, uzasadnionym jest podejście GWAS. GWAS poszukuje asocjacji cecha-marker w całym genomie i zakłada, że w obrębie genomu warunkującego ekspresję cechy znajdują się markery wykazujące niezrównoważenie sprzężeń (Rafalski, 2010). Początkowo mapowanie asocjacyjne wykonano u kukurydzy (Bar-Hen i in., 1995), ryżu (Virk i in., 1996) i owsa (Beer i in., 1997) stosując izozymy, RAPD i RFLP. Prace te nie uwzględniały struktury populacji, której istotność została opisana przez Pritcharda i in. (2000), a następnie po raz pierwszy zastosowana w badaniach u kukurydzy (Pritchard 2001). Wraz z rozwojem wydajnych metod markerowania oraz udostępnieniem programów statystycznych liczba badanych gatunków wzrosła, a identyfikowane tą metodą markery DNA są obecnie stosowane w praktyce hodowlanej (Soto-Cerda i Cloutier, 2012). Mapowanie asocjacyjne okazało się użyteczne do identyfikacji markerów cech których loci ilościowe tłumaczą znaczną zmienności cechy (Soto-Cerda i Cloutier, 2012). Metoda ta ma jednak ograniczone zastosowanie w przypadku cech złożonych o słabych efektach poszczególnych loci (Hall i in., 2010).

Selekcja genomowa (SG)

Selekcja oparta o wybrane regiony genomu nie uwzględniała tła genetycznego oraz roli "mało" istotnych genów czy też ich oddziaływań epistatycznych. Dopiero podejście

populacyjne ukierunkowane na analizę efektów porozrzucanych po całym genomie, a występujących w populacji wydawało się być właściwym rozwiązaniem. Przez długi czas realizacja takich badań była praktycznie niemożliwa ze względu na niewystarczające moce obliczeniowe komputerów oraz brak odpowiednich narzędzi statystycznych. Wraz z rozwojem mocy obliczeniowych oraz opracowaniem statystycznych podstaw SG możliwym stało się przetwarzanie danych, które można wykorzystać do prowadzenia selekcji genomowej. Metoda po raz pierwszy została opisana przez Meuwissen w 2001 roku (Meuwissen i in., 2001). Selekcja genomowa wykorzystuje nowe modele statystyczne i narzędzia bioinformatyczne połączone z coraz większą wiedzą o genomie. W SG markerom molekularnym przypisuje się pewne wartości powiązania z badaną cechą bazując na precyzyjnym fenotypowaniu zróżnicowanych materiałów roślinnych. Takie powiązanie z badaną cechą określa się jako genomową szacunkową wartość hodowlaną (GEBV — Genetic Estimated Breeding Value) (Heffner i in., 2009), a rośliny charakteryzujące się najwyższą wartością GEBV są wykorzystywane do krzyżowań (Jonas i Koning, 2013). Żaden z zastosowanych markerów nie jest pomijany w analizie dzięki czemu uwzględniony jest całokształt zmienności cechy oraz tła genetycznego. Zastosowania GEBV stało się wykonalne w połączeniu z wysokoprzepustowymi platformami genetycznymi (Hamblin i in., 2011).

Aby prowadzić SG formuje się populację treningową składającą się z linii odzwierciedlających materiał programu hodowlanego. Taka populacja treningowa powinna składać się z co najmniej 500 form. Następnie przeprowadza się jej genotypowanie i fenotypowanie. Dzięki temu uzyskuje się zbiór danych zawierający zapis fenotypowej i genotypowej charakterystyki osobników. Populacja treningowa jest wykorzystywana jedynie w celu oszacowania wartości GEBV. Precyzyjne określenie GEBV jest znaczącym czynnikiem w selekcji genomowej. Pozwala ono ustalić prognozowaną wartość danej linii dla której zostaje wyznaczone dzięki czemu hodowca może określić jakimi cechami będzie charakteryzować się roślina przed jej wysianiem. Aby uzyskać dokładne GEBV stosuje się odpowiednie metody statystyczne. Najczęściej są to: najbliższa liniowa nieobciążona predykcja (BLUP ang. Best Linear Unbiased Prediction) i jej rozszerzenia RR-BLUP (Ridge Regression BLUP) czy GBLUP (Genomic BLUP) oraz metoda Bayesian (Meuwissen i in., 2001, Habier i in., 2013). Wszystkie te modele statystyczne ulegają ciągłym przekształceniom, przez co powstają nowe platformy wykorzystywane w SG (Habier i in., 2013).

Po oszacowaniu GEBV do dalszego krzyżowania wykorzystywane są osobniki o najwyższej wartości GEBV dzięki czemu uzyskuje się populacje mieszańców wzbogaconych o pożądane allele. Typowanie kolejnych osobników do krzyżowań odbywa się na podstawie genotypowej wartości hodowlanej (z pominięciem etapu fenotypowania). Zwykle przeprowadza się kilka cykli selekcji w oparciu o GEBV z ewentualnym etapem korygowania modelu treningowego. Wyselekcjonowaną pulę form wzbogaconych o pożądane allele zwykle należy wyrównać pod względem genetycznym poprzez chów wsobny lub metodami kultur *in vitro*. Zaletą SG jest zachowanie wyjściowej zmienności badanych materiałów z jednoczesnym wyprowadzeniem form wzbogaconych o pożądane allele. SG minimalizuje czasochłonną ocenę fenotypową cech wielokrotnie złożonych i

skraca długość cyklu hodowlanego powodując wzrost korzyści w jednostce czasu. Sprawdza się to zwłaszcza dla roślin wieloletnich, które wymagają kilkuletniej oceny fenotypowej (Jonas i Koning, 2013).

PODSUMOWANIE

Od dłuższego czasu można zauważyć wzrost nacisku na zwiększenie i zrównoważenie produkcji żywnościowej. W związku z tym opracowuje się coraz nowsze narzędzia gwarantujące większą dokładność selekcji. Obecnie wykorzystywane metody selekcji zostały wzbogacone o osiągnięcia biologii molekularnej oraz modele statystyczne umożliwiające zarówno identyfikację markerów poszczególnych cech będących wynikiem działania pojedynczych genów jak i takich które są uwarunkowane wieloma QTL-ami w różnym stopniu tłumaczącymi zmienność fenotypową cechy. Najnowsze metody selekcji umożliwiają realizację prac zarówno z wykorzystaniem modeli mendlowskich, jak i populacyjnych. Każdy z wymienionych modeli ma swój zdefiniowany obszar działania, które definiuje jego wykorzystanie w ramach konkretnych potrzeb eksperymentalnych.

LITERATURA

- Alheit K. V., Reif J. C., Maurer H. P., Hahn V., Weissmann E.A., Miedaner T., Würschum T. 2011. Detection of segregation distortion loci in triticale (x *Triticosecale* Wittmack) based on a high density DArT marker consensus genetic linkage map. BMC Genomics 12: 380.
- Bar-Hen A., Charcosset A., Bourgoïn M., Guiard J. 1995. Relationship between genetic markers and morphological traits in a maize inbred line collection. Euphytica 84, 2: 145 — 154.
- Beer S., Siripoonwiwat W., O'Donoghue L., Souza E., Mathews D., Sorrells M. 1997. Associations between molecular markers and quantitative traits in oat germplasm pool: can we infer linkages? J. Agric. Genom. 3 <http://wheat.pw.usda.gov/jag/papers97/paper197/jqt>.
- Boopathi M. N., 2013. Genetic mapping and marker assisted selection: basics, practice and benefits. Published by Springer India: 23–37 pp., 117 — 163 pp.
- Börner A., Korzun V. 1998. A consensus linkage map of rye (*Secale cereale* L.) including 374 RFLPs, 24 isozymes and 15 gene loci. Theor. Appl. Genet. 97, 8: 1279 — 1288.
- Broman K. W. 2001. Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. Lab Animal. 30, 7: 44 — 52.
- Carling J., Heller-Uszyńska K., Jaccoud D., Machado A., Hopper C., Xia L., Vippin C., Caig V., Uszyński G., Kilian A. 2015. DArTTM and DArTseqTM genome profiling for breeding, pre-breeding and population genetics applications. Contribution P0052, XXIII Plant and Animal Genome, San Diego, CA 10 — 14.
- Cavanagh C., Morell M., Mackay I., Powell W. 2008. From mutations to MAGIC: resources for gene discovery, validation and delivery in crop plants. Cur. Opin. Plant Biol. 11: 215 — 221.
- Chankaew S., Isemura T., Naito K., Ogiso-Tanaka E., Tomooka N., Somta P., Kaga A., Vaughan D. A., Srinives P. 2014. QTL mapping for salt tolerance and domestication-related traits in *Vigna marina* subsp. *oblonga*, a halophytic species. Theor. Appl. Genet. 127, 3: 691 — 702.
- Elshire R. J., Glaubitz J. C., Sun Q., Poland J. A., Kawamoto K., Buckler E. S., Mitchell S. E. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. PLoS ONE 6, 5: e19379.
- Gale M. D., Atkinson M. D., Chinoy C. N., Harcourt R. L., Jia J., Li Q. Y., Devos K. M. 1995. Genetic maps of hexaploid wheat. In Proc 8th Int. Wheat Genet Symp. China Agricultural Sciencetech Press, Beijing (pp. 29 — 40).
- Habier D., Fernando R. L., Garrick D. J. 2013. Genomic BLUP decoded: a look into the black box of genomic prediction. Genetics 194: 597 — 607.

- Haley C. S., Knot S. A. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315 — 324.
- Hall D., Tegström C., Ingvarsson P. K. 2010. Using association mapping to dissect the genetic basis of complex traits in plants. *Brief Funct Genomics* 9, 2: 157 — 165.
- Hamblin M. T., Buckler E. S., Jannink J. L. 2011. Population genetics of genomics-based crop improvement methods. *Trends Genet.* 27, 3: 98 — 106.
- Heffner E. L., Sorrells M. E., Jannink J.-L. 2009. Genomic selection for crop improvement. *Crop Sci.* 49: 1 — 12.
- Hospital F. 2005. Selection in backcross programmes. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360: 1503 — 1511.
- Jansen R. C. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205 — 211.
- Jonas E., de Koning D.-J. 2013 Does genomic selection have a future in plant breeding?, *Trends Biotechnol.* 31, 9: 497 — 504.
- Kao C.-H., Zeng Z.-B., Teasdale R. D. 1999. Multiple Interval Mapping for Quantitative Trait Loci. *Genetics*. 152, 3: 1203 — 1216.
- Kearsey M. J., Farquhar A. G. L. 1998. QTL analysis; where are we now? *Heredity* 80, 2: 137 — 142.
- Kennard W., Phillips R., Porter R., Grombacher A., Phillips R. L. 1999. A comparative map of wild rice (*Zizania palustris* L. 2n=2x=30). *Theor Appl Genet.* 99: 5: 793 — 799.
- Lander E. S., Botstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 1: 185 — 199.
- Langridge P., Karakousis A., Collins N., Kretschmer J., Manning S. 1995. A consensus linkage map of barley. *Mol Breed.* 1: 389 — 395.
- Mansur L. M., Lark K. G., Kross H., Oliveira A. 1993. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morphological, and seed traits of soybean (*Glycine max* L.). *Theor. Appl. Genet.* 86, 8: 907 — 913.
- Mauricio R. 2001. Mapping Quantitative Trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nature* 2: 370 — 380.
- McMullen M. D., Louie R. 1989. The linkage of molecular markers to a gene controlling the symptom response in maize to maize dwarf mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact.* 2: 309 — 314.
- Meuwissen T. H. E., Hayes B. J., Goddard M. E. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819 — 1829.
- Milczarski P., Bolibok-Brągoszewska H., Mysłowski B., Stojakowski S., Heller-Uszyńska K., Góralska M., Brągoszewski P., Uszyński G., Kilian A., Rakoczy-Trojanowska M. 2011. A high density consensus map of rye (*Secale cereale* L.) based on DArT markers. *PLoS ONE* 6:12: e28495.
- Mitchell-Olds T. 1995. Interval mapping of viability loci causing heterosis in Arabidopsis. *Genetics.* 140, 3: 1105 — 1109.
- Nakaya A., Isobe S. N. 2012. Will genomic selection be a practical method for plant breeding? *Ann Bot.* 110: 1303 — 1316.
- Pereira M. G., Lee M. 1995. Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize. *Theor Appl Genet.* 90, 3-4: 380 — 388.
- Pritchard J. 2001. Deconstructing maize population structure. *Nat Genet.* 28 (3): 203 — 204.
- Pritchard J. K., Stephens M., Rosenberg N.A., Donnelly P. 2000. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet.* 67: 170 — 181.
- Qi Z., Han X., Hou M., Xin D., Wang Z., Zhu R., Hu Z., Jiang H., Li C., Liu C., Hu G., Chen Q. 2014. QTL analysis of soybean oil content under 17 environments. *Can. J. Plant Sci.* 94: 245 — 261.
- Rafalski J. A. 2010. Association genetics in crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 2: 174 — 180.
- Sax K. 1923. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8: 552 — 560.
- Semagn K., Bjørnstad Å., Ndjiondjop M. N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 25: 2540 — 2568.
- Semagn K., Bjørnstad Å., Xu Y. 2010. The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electron J Biotechnol.* 13: 5, <http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue5-fulltext-14>.

- Soto-Cerda B. J., Cloutier S. 2012. Genetic Diversity in Plants. Association mapping in plant genomes. Red. Çalışkan M., <http://www.intechopen.com/books/genetic-diversity-in-plants/association-mapping-in-plant-genomes>, pp. 29 — 54.
- Thomson M. J., Tai T. H., McClung A. M., Lai X-H., Hinga M. E., Lobos K. B., Xu Y., Martinez C. P., McCouch S. R. 2003. Mapping quantitative trait loci for yield, yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza rufipogon* and the *Oryza sativa* cultivar Jefferson. Theor. Appl. Genet. 107, 3: 479 — 93.
- Virk P., Ford-Lloyd B., Jackson M., Pooni H., Clemeno T., Newbury H. 1996. Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. Heredity 76, 3: 296 — 304.
- Xu Y., Crouch J. H. 2008. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. Crop Sci. 48: 391 — 407.
- Yap I. V., Schneider D., Kleinberg J., Matthews D., Cartinhour S., McCouch S. R. 2003. A graph-theoretic approach to comparing and integrating genetic, physical and sequence-based maps. Genetics 165: 2235 — 2247.
- Young N. D., Zamir D., Ganai M. W., Tanksley S. D. 1988. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the Tm-2a gene in tomato. Genetics 120: 579 — 585.
- Yu J., Holland J. B., McMullen M. D., Buckler E. S. 2008. Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. Genetics 178: 539 — 551.
- Zeng A., Chen P., Shi A., Wang D., Zhang B., Orazaly M., Florez-Palacios L., Brye K., Song Q., Cregan P. 2014. Identification of quantitative trait loci for sucrose content in soybean seed. Crop Sci. 54, 2: 554 — 564.
- Zeng Z.-B. 1993. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 10972 — 10976.
- Zeng Z.-B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136: 1457 — 1468.

TADEUSZ DRZAZGA¹**MARCIN STUDNICKI**²¹ Małopolska Hodowla Roślin sp. z o.o. Oddział w Kobierzycach² Katedra Doświadczalnictwa i Bioinformatyki, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Analiza adaptacji środowiskowej rodów hodowlanych w wielokrotnych, jednorocznych doświadczeniach, na przykładzie plonowania rodów pszenicy ozimej

Evaluation of adaptability to environments of varieties in multiple annual trials: a case study of winter wheat

Celem pracy jest przedstawienie statystycznej metody wnioskowania o adaptacyjnej reakcji odmian na zróżnicowane warunki środowiskowe w miejscowościach, na podstawie danych kompletnych z jednorocznej serii doświadczeń przedrejestrów oraz ilustracja zastosowania i ocena przydatności tej metody dla plonu ziarna pszenicy ozimej. Rozpatrywane dane doświadczalne stanowią dwukierunkową kompletną klasyfikację o postaci odmiana $\times$ miejscowość. Obserwacje plonu odmian poddano analizie statystycznej metodą wykorzystującą mieszany model wielowymiarowy, realizowaną przez programy komputerowe *Sergen 4* i *Eksplan 2*. Badane odmiany pszenicy ozimej zostały podzielone na grupy o jednorodnych średnich genotypowych za pomocą analizy skupień metodą Warda. Proponowana metoda może być wspomagającym narzędziem w pracach hodowlanych do rozróżniania rodzajów adaptacyjnej reakcji odmian pszenicy ozimej na warunki środowiskowe, umożliwiając efektywne poszukiwanie genotypów o szerokiej i wąskiej adaptacji.

Słowa kluczowe: adaptacja odmian, analiza skupień, doświadczenia przedrejestrowe, plon ziarna, pszenica ozima

The objective of this work is presenting the statistical procedures and method of inference about varieties' responses to different environmental conditions in tested locations based on balanced dataset from annual pre-registration trials. Considered data set consisted of two-way genotype $\times$ environments classification. The two factor mixed model approaches included in *Sergen 4* and *Eksplan 2* softwares were used for analysis of the grain yield data. The evaluated winter wheat varieties were classified to groups with similar responses to the environments using Ward's method for cluster analysis. Proposed statistical methods may be supporting tools in the breeding processes to differentiate the types of adaptive response to the environments in winter wheat varieties and enabling an effective search for genotypes with wide and narrow adaptation.

Key words: cluster analysis, cultivar adaptation, grain yield, pre-registration trials, winter wheat

WSTĘP

Jednoroczne, wielokrotne serie doświadczeń z pszenicą ozimą prowadzone w ramach doświadczeń wstępnych w Polsce obejmują doświadczenia z podobnymi zestawami odmian, powtarzane w danym sezonie wegetacyjnym w 7–8 stacjach, należących do spółek hodowlanych. Wyniki z serii tych doświadczeń dostarczają informacji o przydatności badanych odmian do warunków agroekologicznych na podstawie zachowania się tych odmian w wielu środowiskach i są podstawą wnioskowania do ich dalszego testowania w doświadczeniach rejestrowych prowadzonych przez COBORU.

W stacjach, w których są zakładane doświadczenia, prowadzi się również hodowlę tego gatunku. Miejscowości te stanowią środowiska rolnicze, niestety nie są wybrane w sposób w przybliżeniu losowy w przestrzeni kraju, tak aby dobrze reprezentowały zmienność przyrodniczą najważniejszych rejonów uprawy pszenicy ozimej. Wyniki z serii takich doświadczeń dostarczają informacji o przydatności badanych odmian do warunków agroekologicznych na podstawie zachowania się tych odmian w wielu środowiskach, ale tylko w jednym sezonie wegetacyjnym. Ich wartość gospodarcza nie jest sprawdzona pod względem powtarzalności w innych warunkach pogodowych i biotycznych (Annicchiarico, 2002 a; Anderson, 2010).

Reakcja każdej badanej odmiany pod względem cech produktywności roślin (głównie plonu) na środowiska rolnicze, czyli agroekosystemy, nazywana jest adaptacyjną reakcją odmiany w środowiskach (Mądry i in., 2006, 2011; Paderewski i in., 2011; Pecetti i in., 2011). Każda odmiana charakteryzuje się odpowiednim rodzajem adaptacyjnej reakcji.

Do oceny adaptacji odmian na przestrzeni kilku lat obserwacji stosuje się przeważnie trzy metody, tj. analizę AMMI, łączną analizę skupień i analizę GGE (Paderewski i in., 2011). Najbardziej przydatną metodyką okazuje się łączne stosowanie wielowymiarowych metod klasyfikacji, czyli grupowania obiektów za pomocą analizy skupień z metodami ordynacyjnymi służącymi do oceny zróżnicowania obiektów (Chapman i in., 1997; Annicchiarico i in., 2009; Paderewski i in., 2011). Analiza skupień jest narzędziem służącym do analizy danych, której celem jest ułożenie obiektów w grupy w taki sposób, aby stopień powiązania obiektów z tej samej grupy był jak największy, a z obiektami z pozostałych grup jak najmniejszy. Grupowanie obiektów odbywa się na podstawie przyjętej miary podobieństwa lub niepodobieństwa dla zmiennych opisujących te obiekty. W analizie skupień najczęściej stosuje się technikę opartą na metodzie Warda (metodę Warda) z odległościami euklidesowymi, która pozwala na wyodrębnienie grup obiektów o dużym podobieństwie wewnętrznym (Ward, 1963). Pozwala to na podział odmian na grupy podobnie reagujących w rozpatrywanych środowiskach rolniczych. Ma to znaczenie w uproszczeniu wizualizacji reakcji odmian na środowiska, przede wszystkim w seriach doświadczeń wykonywanych z dużą liczbą odmian. W pracy Mądrego i in. (2012) efekty interakcji odmiana $\times$ miejscowość analizowano za pomocą metody AMMI. Na wartościach średnich, poprawionych za pomocą analizy AMMI dla plonu odmian w środowiskach przeprowadzono analizę skupień metodą Warda, grupującą badane odmiany. W ten sposób

uzyskano grupowe reakcje badanych odmian na środowiska, co pozwoliło na sprawne wnioskowanie o adaptacji grup odmian, zamiast opisu reakcji każdej odmiany z osobna. Łączne zastosowanie analizy AMMI oraz analizy skupień, umożliwia skuteczną ocenę i interpretację różnych rodzajów adaptacji odmian do określonych rodzajów środowisk rolniczych, przy danej intensywności agrotechniki.

Oceny reakcji odmian na środowiska z ich podziałem na grupy jednorodne pod względem ich reakcji adaptacyjnej oraz graficznym przedstawieniem można zastosować również do analizy danych z serii jednorocznych doświadczeń odmianowych. W toku dalszego postępowania dokonujemy szczegółowej analizy ocen reakcji pojedynczych odmian.

Celem niniejszej pracy jest:

- przedstawienie komplementarnej metody statystycznej do wnioskowania o adaptacyjnej reakcji badanych odmian na zróżnicowane warunki środowiskowe w miejscowościach, na podstawie danych kompletnych z jednorocznej, wielokrotnej serii doświadczeń,
- lustracja zastosowania i ocena przydatności tej metody dla plonu ziarna pszenicy ozimej.

MATERIAŁ I METODY

Do analiz wykorzystano dane plonowania rodów pszenicy z jednorocznej, wielokrotnej serii doświadczeń przedrejestranych — wstępnych, pochodzącymi z różnych ośrodków hodowlanych w Polsce. Doświadczenia były zakładane w sezonie 2010/11 w 7 miejscowościach (DED — Dębina, KOC — Kobierzyce, NAD — NAGRADOWICE, POB — Polanowice, SMH — Smolice, STH — Strzelce, SZD — Szelejewo), w układzie bloków niekompletnych z trzema powtórzeniami na poletkach o powierzchni 10 m². W doświadczeniach badano 61 rodów. Zabiegi agrotechniczne; nawożenie, ochronę przed chwastami i szkodnikami zastosowano odpowiednio do lokalnych potrzeb.

Przedstawiona metoda obejmuje łączną analizę wariancji, opartą na modelu stałym dla danych z wymienionej serii doświadczeń, analizę AMMI dla interakcji odmiany × miejscowości (interakcji GL) oraz analizę skupień dla odmian, w której zmiennymi opisującymi odmiany były średnie poprawione przez model AMMI dla plonu w badanych miejscowościach.

Obserwacje plonu rodów poddano analizie statystycznej metodą wykorzystującą mieszany model wielowymiarowy, realizowaną przez program komputerowy *Sergen 4* i (*Caliński i in.*, 2003) i *Eksplan 2* (*Krajewski i in.*, 2006).

Otrzymane wartości średnie poprawione plonu dla obiektów w środowiskach wykorzystano do oceny adaptacji odmian poprzez grupowanie obiektów za pomocą analizy skupień opartą na metodzie Warda (*Ward*, 1963).

WYNIKI I DYSKUSJA

Dla średnich poprawionych plonu ziarna wykonano analizę wariancji na podstawie modelu stałego AMMI (tab. 1). Stwierdzono, że 12,99% sumy kwadratów odchyłeń dla plonu w kombinacjach GL było wyjaśnione przez efekty główne odmian, zaś 57,75% tej sumy kwadratów wynikało z efektów głównych miejscowości. Pozostałe 29,26% zmienności plonowania w tych kombinacjach przypadało na efekty interakcji GL. Wyniki te potwierdzają ogólną prawidłowość polegającą na tym, że kluczowym źródłem zmienności plonu różnych gatunków roślin uprawnych w przestrzeni rolniczej jest przeciętny wpływ środowisk, czyli miejscowości i lat (Annicchiarico, 2002 b; Mądry i in., 2006; Drzazga i in., 2009). W programach hodowli roślin bardzo ważny jest wybór strategii i kierunku hodowli odmian o wąskiej lub szerokiej adaptacji. Uznaje się zwykle, że ten wybór powinien być zależny od proporcji wariancji efektów interakcji GE do wariancji głównych efektów genotypowych (odmianowych) plonu lub innych cech w danym układzie genetyczno-środowiskowym (Annicchiarico, 2002 b; de la Vega i Chapman, 2006). W badaniach własnych, znacząco przeważają efekty interakcji GE nad efektami genotypowymi, co sugeruje na możliwość prowadzenia bardziej skutecznej selekcji w kierunku hodowli odmian o wąskiej adaptacji, niż hodowla odmian szeroko przystosowanych do warunków w rejonie uprawy.

Tabela 1

Analiza wariancji dla plonu ziarna pszenicy ozimej z jednorocznej serii doświadczeń przedrejestrowych — wstępnych założonych w sezonie 2010/11
Analysis of variance in winter wheat grain yield in annual pre-registration trials in season 2010/2011

Źródło zmienności Source of variability	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	Suma kwadratów Sum of squares	Średni kwadrat Mean square	Statystyka F F statistic	Wartość krytyczna F Critical value of F	
α					0,05	0,01
Środowiska Locations	6	18550,72	3091,79	493,89	2,11	2,82
Genotypy Cultivars	68	4173,25	61,37			
Genotypy × Środowiska Genotype × Locations	408	9399,53	23,04	3,24	1,15	1,22
Regresja względem środowiska Regression on environment	68	1123,65	16,52			
Odchylenie od regresji Deviations from regression	340	8275,88	24,34	3,43	1,16	1,23
Błąd doświadczeń Experimental error	824		6,26			

Na podstawie wyników analizy skupień, dokonano podziału badanych rodów na 6 grup obiektów w ramach analizowanej serii (tab. 2). W każdej wydzielonej grupie jednorodnej, rody w grupach są relatywnie podobne pod względem plonu ziarna. Miejscowości na osi poziomej zostały ułożone w kolejności rosnących średnich środowiskowych plonu (rys. 1). Wykazane różnice plonu między odmianami w danym środowisku są równe różnicom faktycznej średniej odmian, co umożliwia ich podział na grupy jednorodne reagujących

podobnie w rozpatrywanych miejscowościach. W analizowanej serii najwyższą plennością wykazały się obiekty z grup 5. Rody z tej grupy plonowały w każdej miejscowości powyżej średniej środowiskowej. Grupa cechuje się najmniejszą liczebnością i zawiera tylko 4 obiekty. Wyższa plenność rodów z tej grupy nad pozostałymi rodami wynika z ich wyjątkowo wysokich plonów osiągniętych w miejscowościach DED — Dębina i STH — Strzelce. W pozostałych miejscowościach: SZD — Szelejewo, NAD — Nagradowice, SMH — Smolice, POB — Polanowice i KOC — Kobierzyce, te różnice w plonowaniu między grupami są mniejsze. Do odmian relatywnie słabiej plonujących należą rody z gr. 3 i 6, relatywnie źle przystosowane do warunków Polski reprezentowanych przez rozpatrywane stacje doświadczane. Ponadto rody z 6 grupy wykazały się bardzo zmiennym plonowaniem w środowiskach. Podobne zachowanie stwierdzono dla rodów z grupy 4. Rody z grupy 1 plonowały nieco powyżej lub na poziomie średniej środowiskowej, można je zaliczyć do genotypów stabilnych.



Rys. 1. Układ miejscowości w seriach doświadczeń przedrejestrowych — wstępnych z rodami pszenicy ozimej w sezonie 2010/11

Fig. 1. Geographical distribution of locations for pre-registration trials of winter wheat varieties in the seasons 2010/11

Rysunek 2 może być podstawą do wnioskowania o relatywnej zdolności adaptacyjnej odmian w badanych środowiskach, ponieważ pozwala wskazać te grupy odmian (o podobnej reakcji adaptacyjnej), które były wśród najwyżżej plonujących tylko w jednym środowisku lub grupie środowisk (odmiany o wąskiej adaptacji) lub we wszystkich lub prawie wszystkich środowiskach (odmiany o szerokiej adaptacji). Wykres średnich odmianowych plonu, obliczonych poprzez miejscowości podany w pracy, nie jest w pełni wiarygodnym i wystarczającą oceną plonowania odmian w zmiennych agroekosystemach i agrotechnice, zwłaszcza przy niewielkim zróżnicowaniu średnich genotypowych (odmianowych) plonu (Derejko i in., 2011). W związku z tym można przeprowadzić

grupowanie odmian podobnych pod względem kształtu reakcji plonowania na środowiska w miejscowościach za pomocą analizy skupień metodą Warda (Paderewski i in., 2008). Genotypowe profile ocen efektów interakcji GL wykorzystywane są do opisu kształtów reakcji plonu ziarna genotypów na warunki środowiskowe w badanych miejscowościach i do grupowania genotypów podobnych pod względem tych kształtów. W obrębie każdej jednorodnej grupy odmian, wydzielono podgrupy odmian jednorodnych pod względem średnich genotypowych dla plonu. Można więc uznać, że odmiany w każdej takiej podgrupie jednorodnej mają podobne (nieistotnie zróżnicowane) funkcje reakcji plonu na środowiska w miejscowościach.

Tabela 2

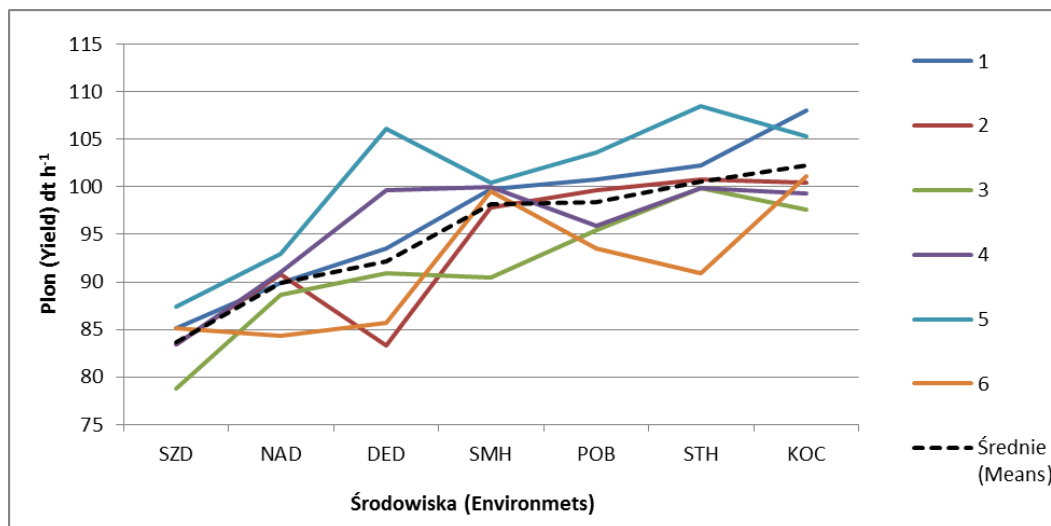
Grupy jednorodne rodów pszenicy ozimej pod względem plonu średniego poprawionego, wydzielone metodą Warda, seria doświadczeń wstępnych w sezonie 2010/11
Groups of winter wheat varieties clustered by Ward's method based on grain yield in the pre-registration trials in season 2010/11

Grupa 1 Group 1	Grupa 2 Group 2	Grupa 3 Group 3	Grupa 4 Group 4	Grupa 5 Group 5	Grupa 6 Group 6
AND_4008/10	AND_394/07	DC_621-1/9	AND_732/07	DC_557-2/9	DL_347/07
DC_705-1/9	AND_4015/09	DD_344/07	DC_3317-2/98	DC_648/06	NAD_08081
DD_323/07	AND_444/07	DL_463/07	DD_559/07	KBP_08.49	POB_597/07
DD_414/07-4	DC_3318-2/9D	HRSM_775	HRSM_752	NAD_08099	SMH_7124
DL_659/07	DD_229/07	HRSM_779	HRSM_761		STH_005
DS_2942/07	DS_3028/07	KBH_409/08	HRSM_772		
KBP_09.22	KBH_1220/07	SMH_8592	HRSM_773		
KBP_09.38	KBH_4785/04	STH_004	KBP_09.1		
KBP_09.6	KBP_08.53	Tonacja	NAD_0720		
KBP_09.7	MIB_08_220		SMH_8529		
KWS OZON	MIB_08_342		STH_006		
Muszelka	POB_1146/07		STH_007		
NAD_08047	POB_1210/07		STH_008		
NAD_08060	POB_572/07		STH_10		
NAD_08169	POB_573/07		STH_012		
SMH_8646	POB_623/07				
STH_002	STH_013				
STH_003					
STH_009					

W analizie różnic pomiędzy adaptacyjną reakcją badanych odmian za pomocą wykresów plonu, ważne jest wyróżnienie odmian o dużej adaptacji w określonych rodzajach (grupach) środowisk, czyli odmian o szerokiej i wąskiej adaptacji. Takie podejście znacząco upraszcza i ułatwia oraz usprawnia graficzną prezentację różnych rodzajów reakcji odmian na środowiska, zwłaszcza w przypadku, kiedy liczba badanych odmian jest duża.

Porównanie adaptacyjne reakcji odmian w środowiskach, głównie poprzez ocenę rankingu plonu odmian oraz jego ilościowego zróżnicowania międzyodmianowego w ramach analizowanej serii, wskazując odmiany o relatywnie najwyższym plonie w środowiskach, jest wystarczające do prowadzenia efektywnej selekcji nowych odmian. Otrzymane grupowe reakcje badanych odmian na środowiska, pozwala na sprawne wnioskowanie o adaptacji grup odmian (rys. 2). W dalszym etapie można uzupełnić o opis

reakcji każdej odmiany, wyznaczając parametry stabilności i adaptacji ocenianych genotypów: średniej genotypowej z badanych środowisk, wariancji stabilności, współczynnika regresji liniowej i determinacji dla zależności efektów (odchyłeń) interakcyjnych od środowiskowych efektów głównych, wariancji reszt (odchyłeń) regresyjnych dla tej zależności oraz miary Kanga (tab. 2, Krajewski i in., 2006).



Rys. 2. Reakcja grup rodów pszenicy ozimej na środowiska — seria doświadczeń wstępnych w sezonie 2010/11

Fig. 2. Grain yield response of the winter wheat varieties to the environments in pre-registration trials in season 2010/11

W pracy przedstawiono przykładowe wyniki analiz dla rodów z grupy 5 (tab. 3).

Ocena efektu głównego jest miarą przewagi średniej genotypowej *i*-tego genotypu nad średnią ogólną w serii doświadczeń. W obrębie omawianej grupy, istotność tego efektu stwierdzono dla rodów: DC_557-2/9 i KBP 08.49. Zauważyć należy, że jedynie genotyp 1 nie wykazał istotnej interakcji ze środowiskami, dla pozostałych były one istotne. Oznacza to, że te rody podlegają silnym wpływom środowiska, czyli są mniej stabilne w plonowaniu. Miarą zmienności efektów interakcyjnych dla genotypu oraz miarą podobieństwa tej reakcji na środowiska do reakcji stabilnej rolniczo jest ocena wariancji stabilności. W przypadku rodu DC_557-2/9 wariancja ta jest nieistotna, co pozwala uznać nam ten genotyp za stabilny rolniczo. Miarą podobieństwa reakcji genotypu pod względem plonowania do normy szerokiej adaptacji jest miara Kanga. Im większa wartość tego parametru, tym genotyp relatywnie wysoko plonuje w różnych środowiskach. Takim zachowaniem wykazał ród DC_557-2/9, co pozwala go zaliczyć do genotypów o szerokiej adaptacji.

Im większa ocena wariancji stabilności, tym reakcja plonowania *i*-tego genotypu jest bardziej odległa od normy stabilności rolniczej. Tego rodzaju reakcje wykazały pozostałe genotypy. Dla wyjaśnienia tego zachowania wykorzystujemy regresyjną zależność

interakcji genotypowo-środowiskowej (GE) od przeciętnego poziomu plonowania wszystkich genotypów w danym środowisku, tzn. od średniej środowiskowej. Oszacowane zależności regresyjnej dla genotypów DC 648/06 i KBP 08.49 były nieistotne, istotna dla NAD-08099 na poziomie 0,05. Jednak bardzo niska wartość współczynnika determinacji ogranicza wnioskowanie o jego reakcji na warunki środowiska.

Tabela 3

Testowanie poszczególnych genotypów z wydzielonej grupy 5 serii 1 doświadczeń wstępnych 2010/11 i ich interakcji ze środowiskami
Evaluation of selected genotypes from group 5 in pre-registration trials in season 2010/11 and their genotype × environments interaction

Odmiana Variety	DC_557-2/9	DC_648/06	KBP_08,49	NAD_08099
Średnia genotypowa plonu q/ha Genotype mean yield	102,664	100,106	100,235	99,482
Ocena efektu głównego Estimated main effect	7,747	5,188	5,317	4,565
Statystyka F dla efektu głównego F-Statistic for main effect	42,11	5,30	6,05	2,26
Poziom istotności Significance level	<0,001	0,061	0,049	0,183
Statystyka F dla interakcji GE F-Statistic for interaction	1,13	4,04	3,72	7,32
Poziom istotności Significance level	0,341	<0,001	0,001	<0,001
Wariancja stabilności Stability variance	2,747	26,747	24,453	53,203
Statystyka F F-Statistic	0,42	4,05	3,70	8,06
Poziom istotności Significance level	0,869	<0,001	0,001	<0,001
Współczynnik regresji Regression coefficient	-0,086	-0,150	0,031	0,107
Współczynnik determinacji (%) Determination coefficient	11,14	3,80	0,18	0,99
Statystyka F dla regresji F-Statistic for regression	0,63	0,20	0,01	0,05
Poziom istotności Significance level	0,464	0,675	0,928	0,832
Wariancja dla odchyleń od regresji Variance for deviations from regression	3,1946	30,3594	28,8365	61,7689
Statystyka F dla odchyleń regresyjnych F-Statistic for deviations from regression	0,48	4,60	4,37	9,36
Poziom istotności Significance level	0,788	<0,001	<0,001	<0,001
Miara Kanga YSi Kang's measure YSi	71*	61*	60*	59*
Ranking wg miary YSi Ranking by Kang's measure YSi	1	6	4	7

PODSUMOWANIE

Przedstawiona komplementarna metoda statystyczna, obejmująca łączną analizę wariancji kompletnych danych z jednorocznej, wielokrotnej serii jednoczynnikowych doświadczeń hodowlanych, analizę AMMI dla kombinacji średnich w klasyfikacji odmiany $\times$ miejscowości oraz analizę skupień dla odmian opartą na średnich odmianowych w miejscowościach, poprawionych przez analizę AMMI, może być efektywnym narzędziem do wnioskowania o adaptacyjnej reakcji plonu ziarna badanych odmian pszenicy ozimej na zmienne warunki środowiskowe. Z drugiej strony, wydzielanie grup odmian o podobnej reakcji na środowiska uprości postępowanie przy ocenie szerokiego materiału hodowlanego. Wyżej wymieniona metoda może być przydatna w pracach selekcyjnych i uwzględniona w przyszłej modernizacji programu Eksplan jako dodatkowe narzędzie statystyczne dla hodowców.

LITERATURA

- Anderson W. K. 2010. Closing the gap between actual and potential yield of rainfed wheat. The impacts of environment, management and cultivar. *Field Crops Res.* 116: 14 — 22.
- Annicchiarico P. 2002 a. Defining adaptation strategies and yield stability targets in breeding programmes In: Kang M. S. (Ed.) *Quantitative genetics, genomics and plant breeding*. CAB, Wallingford, UK: 165 — 183.
- Annicchiarico P. 2002 b. Genotype-environment interactions: challenges and opportunities for plant breeding and cultivar recommendations. *FAO Plant Production and Protection Paper No. 174*. Food and Agriculture Organization, Rome.
- Annicchiarico P., Royo C., Bellah F., Moragues M. 2009. Relationships among adaptation patterns, morphophysiological traits and molecular markers in durum wheat. *Plant Breed.* 128: 164 — 71.
- Caliński T., Czajka S., Kaczmarek Z., Krajewski P., Siatkowski I. 2003. *Podręcznik użytkownika programu SERGEN 4*. Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań.
- Chapman S. C., Crossa J., Edmeades G. O. 1997. Genotype by environment effects and selection for drought tolerance in tropical maize. I. Two mode pattern analysis of yield. *Euphytica* 95: 1 — 9.
- de la Vega A. J., Chapman S. C. 2006. Defining sunflower selection strategies for a highly heterogeneous target population of environments. *Crop Sci.* 46: 136 — 144.
- Derejko A., Mądry W., Gozdowski D., Rozbicki J., Golba J., Piechociński M., Studnicki M. 2011. Wpływ odmian, miejscowości i intensywności uprawy oraz ich interakcji na plon pszenicy ozimej w doświadczeniach PDO. *Biul. IHAR* 259: 131 — 146.
- Drzazga T., Paderewski J., Mądry W., Krajewski P., 2009. Ocena rodzajów reakcji plonowania odmian pszenicy ozimej w doświadczeniach PDO na przestrzennie zmienne warunki przyrodnicze w kraju. *Biul. IHAR* 293: 71 — 82.
- Krajewski P., Kaczmarek Z., Czajka S. 2006. *Podręcznik użytkownika programu Eksplan wersja 2*.
- Mądry W., Paderewski J., Drzazga T. 2006. Ocena reakcji plonu ziarna rodów hodowlanych pszenicy ozimej na zmienne warunki środowiskowe za pomocą analizy AMMI. *Fragm. Agron.* 92: 130 — 143.
- Mądry W., Paderewski J., Gozdowski D., Drzazga T. 2011. Adaptive yield response of winter wheat cultivars across environments in Poland using joint AMMI and cluster analyses. *Intern. J. Plant Prod.* 5: 299 — 310.
- Paderewski J., Mądry W., Pilarczyk W., Drzazga T., 2008. Retrospektywne badanie reakcji plonu odmian pszenicy ozimej na warunki środowiskowe w miejscowościach za pomocą łącznej analizy AMMI i skupień: ocena postępu genetycznego w plonowaniu. *Biul. IHAR* 250: 87 — 106.
- Paderewski J., Gauch H. G., Mądry W., Drzazga T., Rodrigues P. C. 2011. Yield response of winter wheat to agro-ecological conditions using additive main effects and multiplicative interaction and cluster analysis. *Crop Sci.* 51: 969 — 980.
- Mądry W., Iwańska M. 2012. Measures of genotype wide adaptation level and their relationships in winter wheat. *Cereal Res. Comm.* 40: 592 — 601.

- Pecetti L., Annicchiarico P., Abdelguerfi A., Kallida R., Mefti M., Porqueddu C., Simoes N., Volaire F., Lelievre F. 2011. Response of Mediterranean tall fescue cultivars to contrasting agricultural environments and implications for selection. *J. Agron. Crop Sci.* 197: 12 — 20.
- Ward J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58: 236 — 244.

BOGNA ZAWIEJA¹**ANDRZEJ BICHONSKI**²¹ Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu² Małopolska Hodowla Roślin — Spółka z o.o., Kraków

Selekcja rodów hodowlanych jęczmienia jarego na podstawie analizy statystycznej trzyletniej serii doświadczeń

The selection of breeding lines of spring barley on the basis of statistical analysis of three year trial series

W pracy przedstawiono wyniki analizy trzyletniego cyklu doświadczeń hodowlanych z rodami jęczmienia jarego. Były to: doświadczenie jednopowtórzeniowe, przedwstępne i wstępne wykonane odpowiednio w 2008, 2009 i 2010 roku przeprowadzone w stacji Hodowli Roślin w Polanowicach (Małopolska Hodowla Roślin). Przedstawiona w pracy koncepcja opracowania wyników serii doświadczeń z nowymi rodami oparta jest na szerokim wykorzystaniu metod statystycznych. Takie podejście umożliwia całościowe spojrzenie na wyniki doświadczeń przeprowadzonych dla rodów jęczmienia jarego z jednej stacji hodowli jak również rodów pochodzących z różnych stacji doświadczalnych. Przeprowadzona analiza wykazała małe zróżnicowanie pomiędzy plonami rodów badanych w doświadczeniu jednopowtórzeniowym. Uwypuklenie zróżnicowania pomiędzy rodami można uzyskać poprzez zastosowanie bardziej zaawansowanych metod statystycznych takich jak analiza wariancji doświadczeń ze wzorcami, analiza wariancji układów hierarchicznych (z powtórzeniami), analiza doświadczeń wieloletnich. Trzyletnia syntetyczna ocena genotypów pochodzących z hodowli Polanowice wykazała występowanie interakcji genotyp $\times$ lata objawiającą się niestabilnością w plonowaniu. Oddzielne analizowanie każdego roku badań może spowodować utratę cennych genotypów.

Słowa kluczowe: analiza wariancji, doświadczenia hodowlane, jęczmień jary, układy doświadczalne ze wzorcami, doświadczenia kilkuletnie

In this paper the results of the analysis of three year breeding trial cycle with lines of spring barley is presented. Single replication, pre-preliminary and preliminary trials were conducted in the 2008, 2009 and 2010 respectively. The analyzed trials were conducted at the plant breeding station in Polanowice (Małopolska Hodowla Roślin). The presented conception of description of the results of the trial series with breeding lines and controls is based on an extensive use of the statistical methods. This approach enables a holistic view on the results of the conducted trials for the spring barley lines both from given breeding station and from different experimental stations. The analysis made it possible

to show a small variation between the yields of breeding lines in a the not replicated trial. Variation between lines can be demonstrated when more advanced statistical methods, such as analysis of variance of augmented designs, analysis of variance of hierarchical designs or analysis of many years of trials, are used. On the basis of the three year synthetic evaluation of genotypes, which were bred in Polanowice, the interaction genotype $\times$ year has been shown by the revealed instability in yielding. A separate analysis of each year of the trials may result in the loss of valuable genotypes.

Key words: analysis of variances, breeding trials, spring barley, augmented design, several years trials

WSTĘP

W hodowli nowych odmian roślin, po uzyskaniu stabilnego materiału genetycznego, przeprowadzany jest cykl doświadczeń, które obejmują przeważnie trzy ostatnie lata, przed zgłoszeniem rodów do badań rejestracyjnych. Celem tych doświadczeń jest wyłonienie najbardziej wartościowych rodów. W każdym roku wybiera się tylko pewną liczbę genotypów, przy czym w pierwszym roku przeprowadza się najbardziej ostrą selekcję, na podstawie dość skąpych informacji uzyskanych z doświadczeń jednopowtórzeniowych ze wzorcami. Należy zaznaczyć, że doświadczenia jednopowtórzeniowe, w których cała informacja o danym rodzie jest zawarta w jednym pomiarze, należy analizować z wielką ostrożnością, ponieważ błędna interpretacja może być powodem utraty dobrze rokujących genotypów. Różne metody wyboru najlepszych genotypów, na podstawie wyników takich doświadczeń, przedstawione zostały m.in. w pracach Ambroży i in. (2008 a i b). W kolejnych latach badań, wybrane rody, pochodzące z kilku stacji hodowli roślin, wysiewa się w układach doświadczalnych z trzema powtórzeniami. W takich doświadczeniach dla każdego rodu wykonuje się trzy pomiary, co znacznie ułatwia i obiektywizuje analizę zwiększając szansę wyodrębnienia dobrych genotypów.

Celem pracy jest wskazanie metod statystycznej analizy doświadczeń hodowlanych, dających szansę wyboru najbardziej wartościowych genotypów oraz ocena trafności wyboru badanych rodów. W badaniach wykorzystano wyniki doświadczeń hodowlanych, wykonanych w latach 2008–2010 (jednopowtórzeniowe — 2008, przedwstępne — 2009 i wstępne — 2010) z jęczmieniem jarym w stacji Hodowli Roślin w Polanowicach (Małopolska Hodowla Roślin).

MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły wyniki trzyletniego cyklu porównawczych doświadczeń hodowlanych wykonanych w stacji Hodowli Roślin w Polanowicach (Małopolska Hodowla Roślin) z jęczmieniem jarym. Trzyletni cykl doświadczeń obejmuje jednopowtórzeniowe doświadczenie zakładowe, doświadczenie przedwstępne i wstępne. W doświadczeniu jednopowtórzeniowym (2008 rok) wysiano sto nowych rodów, pochodzących z hodowli w Polanowicach oraz jedną odmianę wzorcową (Stratus), stosowaną co dziesiąte poletko. Doświadczenie założono w układzie o blokach

niekompletnych z rozszerzonymi blokami. Zastosowano dwa bloki, z których pierwszy zawierał 89 obiektów a drugi 23 obiekty (Nawrocki, 1967; Węgrzyn, 2001).

W drugim roku badań (2009) przeprowadzono doświadczenia przedwstępne, w których wysiano łącznie 123 rody pochodzące z kilku różnych stacji hodowli (wśród nich 26 rodów wyselekcjonowanych z doświadczenia jednopowtórzeniowego wykonanego w 2008 roku w Polanowicach). Wybrane rody jęczmienia jarego zostały podzielone na dwie grupy, jedna z nich to jęczmień pastewny (dalej oznaczany jako PP), podzielony następnie (ze względu na dużą liczbę badanych nowych rodów) na dwie serie, każda po 33 nowe rody, oznaczone przez PPI i PPII, druga — browarny (dalej oznaczany jako PB) zawierająca 57 nowych rodów. Doświadczenia przedwstępne wykonano układzie zrównoważonym o blokach niekompletnych z trzema powtórzeniami, w przypadku jęczmienia pastewnego pojemność bloku wynosiła 6, w przypadku jęczmienia browarnego 7 i 8. Zastosowano trzy odmiany wzorcowe (Blask, Stratus i Conchita), które zostały rozlosowane łącznie z nowymi rodami. Nowe rody pochodziły z różnych stacji hodowanych (Choryń, Kobierzyce, Modzurów, Nagradowice, Polanowice).

Po dokonanej selekcji negatywnej w 2009 roku wybrano 38 rodów (26 pastewnych i 12 browarnych), które badano w 2010 roku w dwóch doświadczeniach wstępnych (dalej oznaczanych odpowiednio WP i WB). W doświadczeniach tych wysiano także 15 rodów (9 pastewnych i 6 browarnych) niebadanych w doświadczeniu w 2009 roku. Doświadczenia wstępne założono układzie zrównoważonym o blokach niekompletnych (o pojemności od 6 do 8) z trzema powtórzeniami. Zastosowano trzy odmiany wzorcowe: Blask, Conchita i Suweren. Ponieważ odmiany wzorcowe są wyznaczane przez COBORU (Centralny Ośrodek Badań Odmian Roślin Uprawnych), stąd w doświadczeniach w 2009 i 2010 roku pojawiły się różne wzorce.

Należy tutaj zaznaczyć, że dotąd, dokąd nie jest znana wartość browarna rodu, którą poznaje się po jego analizie technologicznej, przyjmuje się założenie, że jeśli wartość białka przekracza 12–12,5% uważane są za pastewne. Te rody, których białko oscyluje na poziomie 9–12% zaliczane są do grupy browarnej. Ponieważ wzorce w rozpatrywanych latach badań w obu grupach (browarnej i pastewnej) są takie same, zatem porównanie rodów do wzorców pod względem plonu pozwala wyeksponować te najbardziej plenne bez względu na ich dalsze przeznaczenie, stąd niektóre rody wysiane w doświadczeniu dla rodów pastewnych, w kolejnym roku mogą być wysiane w doświadczeniu dla rodów browarnych.

W niniejszym opracowaniu ograniczono się do rodów wyhodowanych w Polanowicach ze względu na to, że występowały one w całym trzyletnim cyklu doświadczeń (doświadczenie jednopowtórzeniowe było przeprowadzone tylko dla tych rodów).

Analiza statystyczna danych

Średnie poprawione dla plonu badanych rodów, w analizie doświadczeń jednopowtórzeniowych, wyznaczono za pomocą analizy wariancji doświadczeń ze wzorcami oraz metody, średnich ruchomych. W badaniach przeprowadzonych przez Ambroży i in. (2008 a i b) Metoda średnich ruchomych została uznana za najbardziej przydatną, spośród różnych analizowanych metod, do oceny plonu nowych rodów w doświadczeniu jednopowtórzeniowym, ponieważ dostarczała ona oceny estymatorów

efektów obiektowych najbliższe ocenom tych estymatorów uzyskanych z równolegle przeprowadzonych doświadczeń wielopowtórzeniowych.

Analizę wariancji przeprowadzono za pomocą oprogramowania opublikowanego na stronie internetowej Strengthening of Statistical Computing for NARS (<http://web.iasri.res.in/>) stosowanego w pakiecie statystycznym SAS. Wspomniane oprogramowanie opiera się na teorii zawartej w pracach Federera i Raghavarao (1975), Ceranki i Chudzik (1977), oraz Kielczewskiej (1984). Natomiast średnie ruchome wyznaczono stosując pakiet statystyczny Plabstat (Utz, 1997).

Jak widać z powyższego, wyboru najlepiej rokujących rodów wysianych w doświadczeniu jednopowtórzeniowym można dokonać w wieloraki sposób. W przypadku stosowania analizy wariancji doświadczeń jednopowtórzeniowych, Węgrzyn (2001) zaproponował zastosowanie wartości progowej $U_{bv} = S_{bv}t_{n-b-v_1-v_2+1;\alpha} + \bar{x}_{pop,wz}$, powyżej której badane obiekty uznaje się jako istotnie plenniejsze od wzorca, gdzie $S_{bv} = \sqrt{\frac{(b+1)(v_2+1)E}{bv_2}}$ oznacza błąd standardowy dla różnic pomiędzy dowolnymi średnimi (E — suma kwadratów dla błędów z analizy wariancji, b — liczba bloków, v_2 — liczba obiektów kontrolnych), $t_{n-b-v_1-v_2+1;\alpha}$ wartość dla jednostronnego testu rozkładu t-Studenta (v_1 — liczba nowych rodów, v_2 — liczba obiektów kontrolnych, $n = v_1 + r_1 + \dots + r_{v_2}$, r_i — liczba powtórzeń i -tego obiektu kontrolnego), $\bar{x}_{pop,wz}$ — poprawiona średnia plenniejszego wzorca. Można także zastosować znaną metodę Dunnetta porównania średnich plonów rodów ze średnią plonu wzorców. Stosując metodę średnich ruchomych wybiera się ustalony wcześniej procent rodów najlepiej plonujących (o najwyższych średnich). W rzeczywistości hodowca, dokonując wyboru rodów, bazuje nie tylko na plonie, lecz również na innych cechach, takich jak pokrój rośliny, wyrównanie, podatność i wyleganie, a często również zdając się na tzw. „nos hodowcy”. Należy tutaj dodać, że w analizowanych doświadczeniach wybór rodów został dokonany wcześniej niż przeprowadzona w niniejszym opracowaniu analiza, tak więc autorzy nie mieli wpływu na ten wybór.

W przypadku doświadczeń przedwstępnych (trzy doświadczenia) i wstępnych (dwa doświadczenia) zastosowano analizę wariancji układów doświadczalnych ze wzorcami oddzielnie dla każdej serii doświadczeń. Następnie wykonano łączną analizę serii doświadczeń (jednak oddzielnie w przypadku doświadczeń przedwstępnych i wstępnych) stosując model hierarchiczny analizy wariancji (bloki zagnieżdżone w seriach). Obliczenia wykonano stosując procedurę MIXED pakietu statystycznego SAS.

W celu przeprowadzenia syntetycznej oceny wyników trzyletniego cyklu doświadczeń nadano nowym rodowi rangi w taki sposób, że rangę 1 otrzymał ród (najwyższa ranga), którego poprawiona średnia była największa. Ranking taki ustalono oddzielnie w każdym z lat badań, i po zastosowaniu każdej z analiz statystycznych. Ze względu na różną liczbę rodów badanych w każdym z lat doświadczeń, rangi sprowadzono do wspólnej miary procentowej i na jej podstawie sprawdzano jak, pod względem badanej cechy, plasują się rody w kolejnych latach.

WYNIKI

Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji danych pochodzących z doświadczenia jednopowtórzeniowego, nie stwierdzono zróżnicowania nowych rodów pod względem plonu ($p = 0,3618$). Oznacza to, że nie stwierdzono, aby średni plon któregoś z badanych rodów był istotnie wyższy (lub też niższy) od plonu pozostałych badanych obiektów (rodów i wzorca). Kontrast pomiędzy rodami a wzorcem także okazał się nieistotny ($p = 0,9720$).

Ponieważ średnie plonu rodów mogą być obciążone efektami zmienności polowej, w celu wyeliminowania ewentualnego wpływu tego czynnika w doświadczeniu jednopowtórzeniowym, należałoby przeprowadzić analizę regresji plonów uzyskanych z poletek, na których wysiano odmianę wzorcową, względem ułożenia tych poletek. Należy w tym celu sprawdzić istotność gradientu liniowego w dwóch kierunkach: w poprzek i wzdłuż bloków. Po przeprowadzeniu obliczeń w analizowanym doświadczeniu, nie stwierdzono istotności tego gradientu ($p = 0,851$). Zatem można wnioskować, że pole doświadczalne charakteryzuje się losową żyznością (nie ma zmienności przestrzennej), stąd nie ma ona wpływu na plon uzyskany z poszczególnych poletek i tym samym średnie plonów badanych rodów nie były obciążone a wnioskowanie było poprawne.

W kolejnym kroku analizy danych z doświadczenia jednopowtórzeniowego nadano badanym rodowi rangi. Numerem 1 oznaczono ród o najwyższym poprawionym średnim plonie, natomiast numerem 100 ród o najniższym plonie. Ze względu na dużą liczbę badanych rodów i niekompletność danych w trzyletnim cyklu doświadczeń, wynikającą ze specyfiki tego typu doświadczeń, wyniki przedstawione zostaną jedynie dla rodów, które występowały w całym, trzyletnim cyklu. Rangi wybranych rodów oraz odpowiednie średnie, uzyskane po zastosowaniu obu metod (analizy wariancji i metody średnich poprawionych) przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Poprawione średnie plonu oraz numer w rankingu wybranych rodów
Adjusted average yields and number in ranking of the selected lines

Nazwa rodu Name of line	ANOVA		Średnie ruchome Moving averages		Nazwa rodu Name of line	ANOVA		Średnie ruchome Moving averages	
	A	B	A	B		A	B	A	B
POB 4246/06	92	5,66	56	6,62	POB 4212/06	28	7,13	89	6,31
POB 13672/06	5	8,15	1	7,69	POB 13943/06	56	6,54	21	7,09
POB 8266/06	27	7,14	73	6,50	POB 1284/06	60	6,49	65	6,56

A — Numer w rankingu — Number in ranking

B — Średnie poprawione — Adjusted means

Pogrubiona czcionka — doświadczenie PPI: **Bold font** — PPI trial

Ród, który w kolejnym roku wysiano w doświadczeniu dla odmian pastewnych (PPI, PPPII) wyróżniono pogrubioną czcionką, niewyróżnione rody wysiano w doświadczeniu dla odmian browarnych (PB). Jak widać, kolejność najlepiej plonujących rodów jest inna po zastosowaniu każdej z metod. Jednak trudno jest ocenić poprawność wyboru wykonanego na podstawie którejś z metod, ponieważ genotypy, które nie zostały wybrane do dalszych

badan, nie s wyiewane w kolejnych latach badan. Można jedynie próbować ocenić trafność wyboru określonych rodów.

Oprócz poprawionych średnich plonu, wybranych rodów (tab. 1), w celu lepszego zilustrowania wyników analizy doświadczeń, podane zostaną także następujące parametry: najwyższy poprawiony średni plon nowych rodów, najniższy średni plon oraz średnia średnich poprawionych plonów. W przypadku analizy wariancji otrzymano następujące wartości powyższych parametrów: 9,43, 4,83, 6,70, zaś po zastosowaniu metody średnich ruchomych wynoszą one odpowiednio: 7,69, 5,96 oraz 6,75. W pierwszej z metod uzyskano większą rozpiętość pomiędzy maksimum a minimum, co może być pomocne w wychwyceniu różnic pomiędzy rodami. Wartość progowa U_{bv} , dla $\alpha = 0,05$ i $\bar{x}_{pop,wz} = 6,6$ wyniosła tutaj 8,76. Okazuje się, że jedynie poprawiona średnia plonu rodu POB 1847/06 przewyższa U_{bv} . Podobny wynik uzyskano po zastosowaniu testu Dunnetta, tylko plon rodu POB 1847/06 był istotnie wyższy od zastosowanego wzorca (wartość $p = 0,0487$).

Do badań przedwstępnych wybrano łącznie 26 genotypów (1/4 wszystkich badanych), z czego 15 znajduje się wśród 25 (1/4 wszystkich badanych w tym doświadczeniu rodów) najlepiej plonujących, według rankingu uzyskanego na podstawie średnich poprawionych i 13, według rankingu uzyskanego na podstawie średnich ruchomych. Warto zaznaczyć, iż poprawiony średni plon, większości wybranych do dalszych badań rodów, był wyższy (jednak nie istotnie wyższy) od poprawionego średniego plonu wzorca (6,69 w przypadku analizy wariancji, 6,71 po zastosowaniu średniej ruchomej).

W wyniku analizy wariancji doświadczenia PPI, hipotezy o równości średniego plonu badanych rodów ($p < 0,0001$) i o równości średnich plonu odmian wzorcowych ($p = 0,0008$) zostały odrzucone, natomiast nie było podstaw do odrzucenia hipotezy o równości kontrastów pomiędzy rodami a wzorcami ($p = 0,6478$). W doświadczeniu PPII hipoteza o równości średnich plonów badanych rodów ($p < 0,0001$) została odrzucona, natomiast nie było podstaw do odrzucenia hipotez dotyczących równości średnich plonów wzorców ($p = 0,4511$) oraz kontrastów ($p = 0,3310$). W doświadczeniu PB hipotezę o równości średnich plonów badanych rodów ($p < 0,0001$) oraz kontrastów ($p = 0,0050$) należało odrzucić, jednak średnie dla wzorców $p = 0,9133$ nie różniły się istotnie. Podsumowując, można stwierdzić, że w przypadku wszystkich trzech doświadczeń badane rody różniły się istotnie, kontrast pomiędzy rodami i wzorcami był istotny jedynie w doświadczeniu PB, wzorce doświadczeniu PPI różniły się istotnie, natomiast w pozostałych nie wykazano różnic pomiędzy nimi.

Podobnie jak w doświadczeniu jednopowtórzeniowym, także i tutaj wyznaczono poprawione średnie wszystkich badanych obiektów. W doświadczeniu PPI największa średnia poprawiona plonu badanych rodów wyniosła 7,43, zaś najmniejsza 5,48, średnia wszystkich poprawionych średnich (rodów i wzorców) wyniosła 6,36, średnia poprawionych średnich rodów 6,37 oraz średnia średnich poprawionych dla wzorców 6,31, w doświadczeniu PPII średnie te wynosiły odpowiednio 7,48, 5,13 6,58, 6,57, 6,74 zaś w PB: 8,22 i 4,77, 7,01, 6,99, 7,50. W doświadczeniu PPI poprawione średnie dla poszczególnych wzorców wynosiły odpowiednio: 7,08 dla odmiany Blask, 6,05 dla odmiany Stratus i 5,80 dla odmiany Conchita. W doświadczeniu PPII średnie te wynosiły

odpowiednio: 6,70; 7,00 i 6,52, natomiast w doświadczeniu PB: 7,59, 7,45 i 7,44. Najbardziej zróżnicowane średnie poprawione otrzymano w przypadku odmiany Conchita. Najbardziej zbliżone średnie poprawione otrzymano w przypadku odmiany Blask. Ponadto średnia poprawionych średnich dla wzorców jest większa od średniej poprawionych średnich dla rodów w dwóch doświadczeniach: PPII i PB.

W tabeli 2 przedstawiono kolejność wybranych rodów, pod względem poprawionych średnich plonów (pogrubioną czcionką zaznaczono rody badane w doświadczeniu PPI, pozostałe były wysiane w doświadczeniu PB). Warto dodać, że poprawione średnie plonów 26 rodów wyhodowanych w Polanowicach (PPI — 6,22, PPII — 6,23, PB — 7,1) są zbliżone do średniego plonu wszystkich badanych w danym doświadczeniu rodów.

Tabela 2

Kolejność wybranych rodów w doświadczeniu przedwstępnym (2009). Oddzielna analiza każdego z doświadczeń

The order of selected lines in the pre-preliminary trial (2009). Separate analysis of each trial

Nazwa rodu Name of line	Numer w rankingu Number in ranking	Średnie poprawione Adjusted means	Nazwa rodu Name of line	Numer w rankingu Number in ranking	Średnie poprawione Adjusted means
POB 4246/06	22	6,155	POB 1284/06	11	7,635
POB 13943/06	5	7,871	POB 4212/06	15	7,531
POB 8266/06	8	7,744	POB 13672/06	45	6,498

Pogrubiona czcionka — doświadczenie PPI: **Bold font** — PPI trial

Łączną analizę doświadczeń PPI, PPII i PB przeprowadzono stosując analizę wariancji dla układu hierarchicznego, w której bloki były zagnieżdżone w doświadczeniach. W wyniku przeprowadzonej analizy można stwierdzić, że hipotezę o równości średnich plonów w poszczególnych doświadczeniach należy odrzucić ($p < 0,0001$). Wynika stąd, że uzyskane plony były zależne od doświadczenia, w którym wysiano daną odmianę (warunki panujące na polach były różne). Kolejno, hipotezę o równości średnich dla bloków w poszczególnych doświadczeniach także należy odrzucić ($p < 0,0001$), co oznacza, że podział na bloki był tutaj słuszny. Najbardziej interesujące badacza hipotezy dotyczące równości średnich nowych rodów ($p < 0,0001$) oraz kontrastów pomiędzy nowymi genotypami a wzorcami ($p < 0,0175$) zostały odrzucone. Nie było podstaw do odrzucenia hipotezy o równości średnich plonów wzorców ($p < 0,0600$). W wyniku analizy hierarchicznej uzyskano następujące wartości parametrów: najmniejsza poprawiona średnia plonów wszystkich rodów — 4,20, największa — 8,01, średnia średnich poprawionych — 6,66 oraz średnia średnich poprawionych plonów rodów — 6,65. Średnie poprawione plonów wzorców wynoszą odpowiednio: Blask — 7,18, Stratus — 6,91, Conchita — 6,61, a średnia średnich poprawionych plonów wzorców wynosi 6,90. W tabeli 3 przedstawiono ranking rodów wyhodowanych w Polanowicach. Pogrubionym drukiem wyróżniono odmiany wybrane do następnego etapu badań.

Tabela 3

Kolejność wybranych rodów w doświadczeniu przedwstępnym (2009). Łączna analiza doświadczeń PPI, PPII i PB w układzie hierarchicznym

The order of selected lines in the pre-preliminary trial (2009). Joint analysis of trials PPI, PPII and PB in hierarchical design

Nazwa rodu Name of line	PW	NR	SP	Nazwa rodu Name of line	PW	NR	SP
POB 13943/06	A	20	7,300	POB 4212/06	AB	46	6,953
POB 8266/06	A	28	7,185	POB 4246/06	ABCD	60	6,785
POB 1284/06	A	38	7,049	POB 13672/06	EF	108	5,901

PW — porównania wielokrotne — multiple comparisons

NR — Numer w rankingu — Number in ranking

SP — Średnie poprawione — Adjusted means

W trzecim roku badań (2010) wykonano dwa doświadczenia wstępne: jedno z odmianami pastewnymi WP, a drugie z browarnymi WB. Na podstawie wyników analizy wariancji doświadczenia WP można stwierdzić, że z badanych hipotez należy odrzucić hipotezę o równości średnich plonów badanych rodów ($p < 0,0001$), natomiast nie wykazano różnic pomiędzy plonami wzorców ($p < 0,2338$). Kontrast pomiędzy rodami i obiektami kontrolnymi był istotny ($p < 0,0286$). W doświadczeniu tym uzyskano następujące wartości średnich: największa średnia poprawiona plonów rodów wynosiła 7,87, najmniejsza średnia poprawiona — 5,39, średnia średnich poprawionych plonów wzorców — 6,91, średnia średnich poprawionych plonów rodów — 6,52. W przypadku doświadczenia z odmianami browarnymi (WB) istotne różnice wykazano tylko pomiędzy rodami ($p < 0,0294$), zarówno różnice pomiędzy wzorcami ($p < 0,0592$), jak i kontrast pomiędzy rodami i wzorcami ($p < 0,1163$) okazały się nieistotne. W omawianym doświadczeniu uzyskano następujące średnie poprawione: najmniejsza — 5,57, największa — 7,71, średnia dla wzorców — 6,91 i średnia dla rodów — 6,48. W tabeli 4 umieszczono ranking odmian badanych w obu omawianych doświadczeniach wyhodowanych w Polanowicach.

Tabela 4

Kolejność wybranych rodów w doświadczeniu wstępnym z 2010 roku. Oddzielna analiza każdego z doświadczeń

The order of selected lines in the preliminary trial from year 2010. Separate analysis of each trial

Doświadczenie WP — WP Trial			Doświadczenie WB — WB Trial		
nazwa rodu name of line	numer w rankingu number in ranking	średnie poprawione adjusted means	nazwa rodu name of line	numer w rankingu number in ranking	średnie poprawione adjusted means
POB_4212/06	21	6,466	POB_13672/06	11	6,473
POB_13943/06	22	6,452	POB_4246/06	19	5,882
POB_8266/06	30	6,155	POB_1284/06	21	5,657

Podobnie jak w doświadczeniu przedwstępnym wykonano tutaj analizę połączonych doświadczeń WP i WB w układzie hierarchicznym. Okazało się, że nie było podstaw do odrzucenia hipotezy o równości średnich dla doświadczeń ($p = 0,7386$), natomiast średnie dla bloków ($p < 0,0126$), rodów ($p < 0,0001$), wzorców ($p < 0,0089$) oraz kontrast pomiędzy

rodami a wzorcami ($p < 0,0120$) różniły się istotnie. W analizie tej uzyskano następujące wartości średnich: największa średnia poprawiona plonu — 7,88, najmniejsza średnia poprawiona — 5,39, średnia dla średnich poprawionych badanych rodów — 6,50 oraz średnia dla średnich poprawionych wzorców — 6,91. W tabeli 5 przedstawiono ranking wybranych rodów. Na podstawie porównań wielokrotnych metodą Tukeya wykazano, że wszystkie wybrane rody tworzą jedną grupę jednorodną, stąd można wywnioskować, iż plony analizowanych rodów nie różnią się istotnie.

Tabela 5

Ranking wybranych rodów w doświadczeniu wstępnym (2010). Łączna analiza doświadczeń WP i WB w układzie hierarchicznym
The ranks of selected lines in the preliminary trial (2010). Joint analysis of trials WP and WB in a hierarchical design

Nazwa rodu Name of line	Porównania wielokrotne Multiple comparisons	Numer w rankingu Number in ranking	Średnie poprawione Adjusted means
POB 13672/06	A	28	6,470
POB 4212/06	A	29	6,469
POB 13943/06	A	30	6,456
POB 8266/06	A	43	6,156
POB 9/05	A	44	6,136
POB 4246/06	A	52	5,844
POB 1284/06	A	54	5,649

Synteza trzyletnich doświadczeń przeprowadzona została na podstawie rankingu odmian wykonanego oddzielnie w poszczególnych latach badań. Wszystkie rangi sprowadzono do bezwzględnej miary procentowej. W przypadku oddzielnie analizowanych serii doświadczeń rangi nadawano łącznie dla wszystkich serii, co ułatwiło porównanie z rangami nadanymi po zastosowaniu analizy hierarchicznej. Wyniki dla rodów badanych poprzez cały trzyletni cykl przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6

Bezwzględne rangi wybranych rodów w doświadczeniach: jednopowtórzeniowym, przedwstępnym i wstępnym
Absolute rank of selected lines in the not replicated, pre-preliminary and preliminary trials

Rok — Year	2008		2009		2010	
metoda analizy doświadczeń method of experiment analysis	analiza wariancji analysis of variance	metoda średnich ruchomych moving averages method	oddzielna analiza wariancji separate analysis of variance	łączna analiza wariancji joint analysis of variance	oddzielna analiza wariancji separate analysis of variance	łączna analiza wariancji joint analysis of variance
POB 4246/06	92	56	78,0	47,6	49,0	93
POB 13672/06	5	1	57,7	85,7	26,0	50
POB 8266/06	27	73	7,3	22,2	39,0	77
POB 4212/06	28	89	13,0	36,5	27,0	52
POB 13943/06	56	21	4,1	15,9	28,0	54
POB 1284/06	60	65	9,8	30,2	51,0	96

Niektóre z wybranych rodów uzyskały dość duże rangi (większe od 50), co oznacza, że plony tych rodów były niższe niż średni plon rodów badanych w danym doświadczeniu. W drugim roku badań dość wysoko (rangi mniejsze od 50) uplasowały się rody: POB 13759/06, POB 3818/06, POB 8388/06, POB 13640/06, POB 4212/06, POB 1376/06, POB 8369/06, POB 13943/06 oraz POB 1284/06, zarówno w oddzielnej analizie serii doświadczeń, jak i łącznej. W trzecim roku badań wszystkie rozważane rody uzyskały rangi większe od 50 w obu omówionych sposobach analizy doświadczeń (oddzielnej dla wszystkich serii i łącznej).

Warto tutaj dodać, że prawie we wszystkich rozważanych doświadczeniach średnie poprawionych średnich plonów nowych rodów były mniejsze od odpowiednich średnich poprawionych średnich plonów wzorców.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Istnieje wiele metod oceny nowych rodów w doświadczeniach hodowlanych jednopowtórzeniowych ze wzorcami. Metody te niejednakowo oceniają badane linie, zatem przy podejmowaniu decyzji o wyborze konkretnej metody powinno się kierować różnymi czynnikami, np. znajomością charakteru zmienności występującej na polu doświadczalnym. Porównanie kilku metod stosowanych w tego typu doświadczeniach można znaleźć m.in. w pracach Ambroży i in. (2008 a, b). W pracach tych wykazano, że w większości rozważanych przypadków najlepszą okazywała się metoda średnich ruchomych.

Dużo łatwiejsza jest interpretacja doświadczeń wstępnych i przedwstępnych, ze względu na stosowanie układów doświadczalnych z powtórzeniami, w których nie ma problemu z wyznaczaniem efektów obiektowych, a tym samym średnich poprawionych badanych rodów. Ponadto doświadczenia te wykonywane są równolegle w kilku miejscowościach, co daje dodatkowo możliwość wyodrębnienia interakcji genotypowo środowiskowej (Miller i in., 1959; Meredith i in., 2012). Często jednak skuteczność wyboru najplenniejszych rodów na podstawie doświadczeń przeprowadzonych w kilku miejscowościach nie jest dostatecznie zadowalająca. Problem ten może wynikać z występowania interakcji genotypów z latami (Węgrzyn, 2003), która nie ujawnia się w doświadczeniach przeprowadzonych w jednym roku lecz na przestrzeni lat (Mądry i in., 2006).

Analiza wyników uzyskanych w niniejszej pracy pozwala na sformułowanie następujących wniosków:

1. Jeśli w doświadczeniu jednopowtórzeniowym różnice w plonowaniu pomiędzy rodami nie są istotne, wówczas warto stosować metodę średnich poprawionych, która dostarcza bardziej zróżnicowanych ocen efektów genotypowych.
2. Zastosowanie hierarchicznej analizy wariancji danych z doświadczeń przedwstępnych i wstępnych umożliwiło wykazanie istotnego zróżnicowania genotypowych efektów dla plonu poszczególnych rodów, którego nie wykazała oddzielna analiza większości doświadczeń; ponadto analiza ta pozwoliła wykazać interakcję genotypowo-

- środowiskową, dlatego ta metoda może być bardziej przydatna w analizie danych z doświadczeń hodowlanych.
3. Wykazano, żerody plasujące się pod względem plonu wysoko w rankingu w jednym roku badań, w następnym roku często nie są zbyt wysoko w rankingu, co jest wynikiem interakcji genotypy $\times$ lata, dlatego rody powinny być badane co najmniej przez dwa lata w doświadczeniach wstępnych.

LITERATURA

- Ambroży K., Bakinowska E., Bocianowski J., Budka A., Pilarczyk W., Zawieja B. 2008 a. Statystyczne wspomaganie decyzji selekcyjnych na wczesnych etapach hodowli zbóż. Część I. Metody oceny efektów obiektowych. Biul. IHAR 250: 21 — 28.
- Ambroży K., Bakinowska E., Bocianowski J., Budka A., Pilarczyk W., Zawieja B. 2008 b. Statystyczne wspomaganie decyzji selekcyjnych na wczesnych etapach hodowli zbóż. Część II. Empiryczne porównanie metod oceny efektów obiektowych. Biul. IHAR 250: 29 — 39.
- Ceranka B., Chudzik H., 1977. Doświadczenia jednopowtórzeniowe z wzorcami. Siódme Colloquium Metodologiczne z Agro-Biometrii, PAN, Warszawa: 318 — 331.
- Federer W. T., Raghavarao D. 1975. On augmented designs. Biometrics 31: 39 — 35.
- Kiełczewska H., 1984. Analiza doświadczenia jednopowtórzeniowego z wzorcami. Listy Biometryczne 21: 21 — 28.
- Mądry W., Talbor M., Ukalski K., Drzazga T., Iwańska M. 2006. Podstawy teoretyczne znaczenia efektów genotypowych i interakcyjnych w hodowli roślin na przykładzie pszenicy ozimej. Biul. IHAR 240/241: 13 — 32.
- Meredith W. R. Jr., Boykin D. L., Bourland F. M., Caldwell W. D., Campbell B. T., Gannaway J. R., Glass K., Jones A. P., May L. M., Smith C. W., Zhang J. 2012. Genotype x Environment Interactions Over Seven Years for Yield, Yield Components, Fiber Quality, and Gossypol Traits in the Regional High Quality Tests. The Journal of Cotton Science 16: 160 — 169.
- Miller A., Williams J. C., Robinson H. F. 1959. Variety-environment interaction in cotton variety tests and their implications on testing methods. Agric. J. 51 (3): 132 — 134.
- Nawrocki Z. 1967. Teoria i praktyka doświadczenia rolniczego. Warszawa, PWRiL.
- Utz H. F. 1997. PLABSTAT. A computer program for statistical analysis of plant breeding experiments. Version 2N. Institute of Plant Breeding, Seed Science and Population Genetics, University of Hohenheim, Germany.
- Węgrzyn S. 2003. Ocena genetyczno-statystyczna wyników doświadczeń polowych z rodami hodowlanymi na przykładzie pszenicy ozimej. Biul. IHAR 230: 29 — 42.
- Węgrzyn S. 2001. Możliwości wykorzystania metod statystycznych do opracowania wyników doświadczeń w hodowli roślin. Biul. IHAR 218/219: 5 — 14.

WOJCIECH RYBIŃSKI¹**TADEUSZ ADAMSKI**¹**MARIA SURMA**¹**JAN BOCIANOWSKI**²¹ Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu² Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Uzyskiwanie haploidów i ocena zmienności cech ilościowych linii dihaploidalnych jęczmienia jarego z wykorzystaniem metody *Hordeum bulbosum* i mutagenезы

Obtaining of haploids with use of *Hordeum bulbosum* method and mutagenesis and analysis of quantitative traits variation in spring barley DH lines

W badaniach nad wykorzystaniem mutagenезы w systemie DH, ziarniaki browarnej odmiany jęczmienia jarego Rudzik naświetlano biostymulującą dawką światła lasera a następnie poddawano działaniu chemomutagenu — N-metylo-N-nitrosomocznika (MNU). Otrzymane rośliny krzyżowano z *Hordeum bulbosum* a efektywność uzyskiwania haploidów mierzono stosunkiem liczby uzyskanych ziarniaków do liczby zapylonych kwiatów oraz liczby haploidów do liczby zapylonych kwiatów i wykładanych na pożywkę niedojrzałych zarodków. Uzyskane wyniki w porównaniu z kombinacją kontrolną (bez traktowania mutagenem) wykazały, że mutagen wpływał na obniżenie wartości wyżej wymienionych parametrów. Linie dihaploidalne (DH) uzyskane w wyniku podwajania liczby chromosomów rozmnażano, a następnie w warunkach pola doświadczalnego analizowano zmienność ich cech ilościowych, głównie plonotwórczych w porównaniu z kombinacją kontrolną. Wykorzystując wielocechową analizę statystyczną wykazano poszerzenie zakresu zmienności ocenianych cech linii DH w porównaniu z ich odmianą wyjściową Rudzik.

Słowa kluczowe: cechy ilościowe, *Hordeum bulbosum*, jęczmień jary, linie dihaploidalne, mutagen

In performed studies on the use of mutagenesis in DH system, the seeds of malting barley cultivar Rudzik were treated with laser light and chemomutagen — N-methyl-N-nitroso urea (MNU). The plants grown from the treated plants were crossed with *Hordeum bulbosum*. The effectiveness of haploid production was measured by proportion of the obtained seeds to the number of pollinated florets and number of haploids to number of pollinated florets and immature embryos transferred to *in vitro* culture. The obtained results as compared to control (non-treated seeds) indicates that the applied dose of MNU decreased the effectiveness of haploid production. In result of diploidization, a numerous DH

plants were obtained which were propagated and used for estimation of quantitative traits variability in a field trial. The use of multivariate statistical method indicates that DH lines were characterized by a broader range of traits variability in comparison with their initial cultivar Rudzik.

Key words: dihaploid lines, *Hordeum bulbosum*, mutagen, spring barley, quantitative traits

WSTĘP

Uzyskiwanie podwojonych haploidów (DH) w oparciu o dobrze poznane techniki ich generowania znalazło swe odzwierciedlenie u licznych gatunków roślin uprawnych, a zwłaszcza tytoniu, rzepaku, ziemniaków, ryżu, pszenicy i jęczmienia (Szarejko i in., 1991). Jedną z podstawowych zalet wykorzystywania podwojonych haploidów jest istotne skrócenie cyklu hodowlanego, co w przypadku jęczmienia pozwala go skrócić o 2–3 lata poprzez uzyskanie roślin całkowicie homozygotycznych z dowolnej formy heterozygotycznej. Nie oferuje tego hodowla tradycyjna, gdyż nawet po wielopokoleniowym chowie wsobnym utrzymuje się tzw. resztkowa heterozygotyczność (Surma, 1997).

Haploidy mogą być uzyskiwane zarówno z męskich, jak i żeńskich komórek gametycznych poprzez kultury pylników, izolowane mikrospory, załężnie oraz załężki. Można je również uzyskiwać poprzez krzyżowanie oddalone na drodze eliminacji chromosomów jednego z rodziców. W wyniku krzyżowania niektórych gatunków w rozwijającym się zarodku następuje eliminacja chromosomów jednej z form rodzicielskich. Znaczenie mają zwłaszcza te kombinacje krzyżowań, w których eliminacja chromosomów jednej z form jest całkowita, ponieważ daje to możliwość uzyskania form tego gatunku, którego chromosomy nie są eliminowane (Surma, 1997).

Haploidalne lub dihaploidalne formy jęczmienia (*H. vulgare*) można uzyskiwać w wyniku krzyżowań międzyrodzajowych lub międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Hordeum*. W odniesieniu do jęczmienia uprawnego (*H. vulgare*) istotne są te kombinacje krzyżowań z innymi gatunkami, w których eliminowane są chromosomy gatunku dzikiego. Kasha i Kao (1970) opisali procedurę uzyskiwania wysokiej częstości haploidów jęczmienia powstających w wyniku skrzyżowania *H. vulgare* z *H. bulbosum*, którą wykorzystano w realizacji badań w prezentowanej pracy.

W badaniach, których celem jest otrzymanie haploidalnych roślin jęczmienia uprawnego metodą *H. bulbosum* z reguły obiektem są mieszańce lub odmiany. W praktyce hodowlanej linie DH najczęściej otrzymuje się z mieszańców. W celu uzyskania innej zmienności aniżeli zmienność rekombinacyjna, coraz częściej wykorzystuje się odmiany, których ziarniaki poddaje się działaniu związków mutagennych dla uzyskania i utrwalenia zmienności mutacyjnej (Umba Di-Umba i in., 1991; Laib i in., 1996). Szybki skринing zarówno dominujących, jak i recesywnych mutacji w pierwszym pokoleniu po traktowaniu mutagenem, przy braku chimeryzmu, jest podstawową korzyścią wynikającą ze stosowania mutagenyzy w systemie DH (Laib i in., 1996). Niewątpliwym problemem stosowania wyżej wspomnianej procedury może być występowanie uszkodzeń somatycznych (wywoływanych działaniem mutagenu u roślin pokolenia M₁) objawiających się między innymi obniżeniem płodności roślin, zwłaszcza przy silniejszych

dawkach mutagenu. Może to mieć negatywny wpływ na efektywność uzyskiwania haploidów metodą *H. bulbosum*. Według Rybińskiego (2003) chemomutagen — N-metylo-N-nitrozomocznik (MNU) w przeciwieństwie do azydku sodu wywołującego głównie zmiany o charakterze mikromutacji, należy do grupy „silnych” mutagenów indukujących głównie mutacje chromosomowe (makromutacje). To sprzyja, nawet w obrębie dawek optymalnych, wystąpieniu wysokiego poziomu uszkodzeń somatycznych u roślin w pokoleniu M_1 wyrażonego silnym obniżeniem wspomnianej powyżej przeżywalności i płodności roślin. Może to skutecznie uniemożliwić uzyskanie wymaganej liczby nasion dla dostatecznie liczego pokolenia M_2 , w którym w przypadku diploidalnego jęczmienia prowadzony jest wybór mutantów. Potwierdzenie, że światło lasera helowo-neonowego w krótkich czasach naświetlania nasion wpływa biostymulująco, aktywizując procesy życiowe komórki (Rybiński, 1998), jego stosowanie przed lub po traktowaniach mutagenami może ograniczać wystąpienie uszkodzeń somatycznych wywołanych działaniem mutagenu (Rybiński, 2001).

Celem badań było określenie efektywności poszczególnych etapów uzyskiwania haploidów jęczmienia oraz charakterystyka zmienności cech ilościowych u wyprowadzonych linii DH w porównaniu z ich odmianą wyjściową ocenianych na podstawie doświadczenia polowego.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach nad wykorzystaniem mutagenazy w systemie DH materiał wyjściowy stanowiła odmiana browarna jęczmienia jarego — Rudzik. Do indukowania mutacji wybrano chemomutagen — N-metylo-N-nitrozomocznik (MNU). Ziarniaki przed traktowaniem naświetlano stymulującą dawką (30 minut) światła lasera helowo-neonowego o długości fali 632 nm i mocy 24 mW. Następnie ziarniaki wstępnie moczo w wodzie destylowanej w temperaturze 24°C przez okres 8 godzin, po czym umieszczano je w wodnym roztworze MNU o stężeniu 1,1 mM przez okres 3 godzin. Po zakończeniu traktowania ziarniaki trzykrotnie płukano w bieżącej wodzie w celu usunięcia pozostałości mutagenu z ich powierzchni. Ziarniaki nie poddawane działaniu światła lasera i mutagenu stanowiły wariant kontrolny.

Wysiew prowadzono w szklarni umieszczając ziarniaki w doniczkach z parowaną ziemią. W czasie wegetacji roślin w szklarni kłosa roślin kontrolnych oraz pokolenia M_1 kastrowano, a następnie — po 1–2 dniach zapylano słupki świeżo zebrany pyłkiem *Hordeum bulbosum*. W ciągu pierwszych trzech dni po zapyleniu kłosa traktowano roztworem GA_3 (75 ppm) w celu uniknięcia przedwczesnego zasychania kłosów. Po upływie 14–17 dni od zapylenia niedojrzałe zarodki izolowano i hodowano na pożywce B5 Gamborga (Adamski i in., 1990) zgodnie ze standardową procedurą podaną m. in. przez Devaux i in. (1990). W odniesieniu do kombinacji kontrolnych, jak i z mutagenem policzono liczbę zapylnych kwiatów, liczbę zawiązanych ziarniaków, liczbę niedojrzałych zarodków wyłożonych na pożywkę oraz liczbę uzyskanych roślin haploidalnych, a następnie obliczono stosunek uzyskanych ziarniaków do liczby

zapylnych kwiatów oraz stosunek uzyskanych haploidów do liczby zapylnych kwiatów i liczby wyłożonych zarodków.

Podwajanie liczby chromosomów dokonywano na wszystkich młodych roślinach przed ich wysadzeniem w szklarni, stosując 0,5% roztwór kolchicyny z dodatkiem 20 ml/litr dwumetylosulfotlenku (DMSO) przez okres 10 godzin. Rośliny wysadzano do doniczek, w których rosły do pełnej dojrzałości. Uzyskane linie DH rozmnażano przez trzy kolejne lata, a uzyskane ziarniaki stanowiły materiał wyjściowy do założenia doświadczenia polowego metodą bloków losowanych w trzech powtórzeniach. Ziarniaki 37 linii DH i ich odmiany wyjściowej DH Rudzik wysiewano na poletka o powierzchni 1 m² w rozstawie 15 × 5 cm w warunkach Pola Doświadczalnego IGR PAN w Cerkwicy. Po zbiorze dla 10 roślin z każdego poletka wykonywano pomiary biometryczne dotyczące wysokości roślin, długości kłosa, liczby kłosów z rośliny, liczby i masy ziaren z kłosa, liczby i masy ziaren z rośliny oraz masy 1000 ziaren (MTZ).

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie określając wartości minimalne, średnie, maksymalne i współczynnik zmienności (Kozak i in., 2013). Przeprowadzono analizę wariancji dla poszczególnych cech. Współzależność poszczególnych cech określono na podstawie współczynników korelacji dla wartości średnich (Kozak i in., 2010). Ocenę i wyniki testowania porównań średnich dla cech między odmianą Rudzik a poszczególnymi liniami DH przedstawiono w formie kontrastu (Caliński i in., 1976; Ceranka i in., 1997). Podobieństwo między analizowanymi liniami DH pod względem wszystkich cech łącznie wyrażono odległościami Mahalanobisa. Istotność statystyczną poszczególnych odległości Mahalanobisa weryfikowano w odniesieniu do wartości krytycznej D_{α} , zwanej „najmniejszą istotną odległością”. Przestrzenny rozkład linii DH oraz odmiany Rudzik przedstawiono w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zmienność gametoklonalna powstająca w kulturach *in vitro* może być źródłem uzyskiwania pożądanej zmienności, lecz częstotliwość pojawiania się genetycznie stabilnych mutantów jest często niezadowalająca (Szarejko i in., 1991). Stąd coraz częściej stosuje się mutagenne substancje chemiczne i promienie jonizujące (Beverdorf i Kott, 1987; Swanson i in., 1989; Zapata i Aldemita, 1989) wykorzystując fakt, że recesywne allele indukowane przez mutagen przed lub podczas stadium haploidalnego będą homozygotami w fazie diploidalnej przy jednoczesnej ekspresji fenotypowej. Stwarza to możliwość szybkiej selekcji bez zaburzeń genotypowych i fenotypowych powodowanych przez stan heterozygotyczny. Niewątpliwie winno się tu uwzględniać wpływ mutagenu na efektywność uzyskiwania haploidów. Według Surmy (1997), o efektywności metody *H. bulbosum* mierzonej liczbą uzyskanych roślin haploidalnych w stosunku do zapylnych kwiatów decydują dwa pierwsze etapy, to jest procent zawiązanych ziarniaków oraz liczba zarodków rozwijających się w warunkach kultury *in vitro*.

W tabeli 1 przedstawiono efektywność uzyskiwania haploidów w kombinacji kontrolnej i z mutagenem wyrażoną procentowym udziałem uzyskanych ziarniaków do liczby zapylnych kwiatów oraz haploidów do liczby zapylnych kwiatów i wyłożonych

zarodków. Pierwszy z prezentowanych wskaźników dotyczy procentowego udziału zawiązanych ziarniaków w stosunku do liczby zapylonych kwiatów. Wykazano, że wartości uzyskane w wariancie z mutagenem są niższe w porównaniu z wariantem kontrolnym i wynosiły odpowiednio 74,1 i 89,2%. W odniesieniu do drugiego wskaźnika określającego liczbę uzyskanych haploidów w stosunku do liczby zapylonych kwiatów jego wartość w kombinacji kontrolnej była również wyższa w wariancie kontrolnym (17,7%) w porównaniu z kombinacją z mutagenem (14,6%). Efekt redukcji efektywności uzyskiwania haploidów w kombinacji z mutagenem obserwowano również gdy porównywano liczbę uzyskanych haploidów w stosunku do liczby wyłożonych zarodków. Wartości tego wskaźnika wynosiły 26,6% w kombinacji z mutagenem i 34,9% w kombinacji kontrolnej. Oprócz stosowania mutagenu istotny wpływ na efektywność uzyskiwania haploidów w metodzie *H. bulbosum* ma genotyp (Adamski i in., 1990), na co wskazują wyniki uzyskane przez Devaux i in. (1990). Badając liczne genotypy jęczmienia pod względem efektywności metody *H. bulbosum* wyrażonej procentowym udziałem roślin haploidalnych w stosunku do zapylonych kwiatów, zakres zmienności tego wskaźnika wynosił od 1,6 do 11,4% (Devaux i in., 1990), a przy innym zestawie genotypów od 11,5 do 26,8% (Pickering i Devaux, 1992).

Tabela 1

Ocena efektywności metody bulbosowej na poszczególnych etapach uzyskiwania roślin haploidalnych w kombinacjach kontrolnych i z mutagenem
Estimation of *Hordeum bulbosum* method efficiency of production of haploids in control combinations and with mutagen

Obiekty i kombinacje Objects and combinations	Liczba zapylonych kwiatów Number of pollinated florets	Liczba uzyskanych ziarniaków Number of obtained grains	Liczba wyłożonych zarodków Number of cultured embryos	Liczba uzyskanych haploidów Number of obtained haploids	Ziarniaki / 100 zapylonych kwiatów Grains / 100 pollinated florets	Haploidy / 100 zapylonych kwiatów Haploids/100 pollinated florets	Haploidy / 100 wyłożonych zarodków Haploids/100 cultured embryos
Rudzik							
Kontrola Control	288	257	146	51	89,2	17,7	34,9
Mutagen	1447	1072	793	211	74,1	14,6	26,6

Reasumując wyniki prezentowane w tabeli 1 można stwierdzić, że mutagen obniżał efektywność metody *H. bulbosum* wyrażonej stosunkiem liczby haploidów do pozostałych wskaźników. Uzyskanie niższego procentu ziarniaków w stosunku do liczby zapylonych kwiatów, może mieć związek z wywoływaniem przez mutagen w pokoleniu M_1 uszkodzeń somatycznych, powszechnie występujących przy stosowaniu mutagenów (Małuszyński i in., 1978). Jednym z efektów uszkodzeniowych jest obniżanie płodności roślin, która maleje wraz ze stosowaniem silniejszych dawek mutagenów (Rybiński i in., 1993), prowadząc w skrajnych wypadkach do całkowitej bezpłodności kłosa (Rybiński i in., 2003). Stąd, istotnym jest wybór takiej dawki mutagenu, która indukuje wysoką częstotliwość mutacji przy stosunkowo niskim poziomie uszkodzeń somatycznych, mogących obniżyć efektywność uzyskiwania mutacji w systemie DH. Okazuje się, że

nawet bardzo niskie dawki promieni gamma (5–10 Gy) mogą istotnie zakłócać rozwój napromieniowanych pylników jęczmienia w kulturze *in vitro* obniżając drastycznie liczbę uzyskiwanych zielonych roślin (Laib i in., 1996.). Równie interesujący jest niższy procentowy udział haploidów w stosunku do liczby wyłożonych zarodków. Wynik ten można interpretować z jednej strony wspomnianą wyżej szkodliwością somatyczną, prowadzącą do słabszego wykształcania zarodków, ale również gorszym wzrostem i rozwojem zarodków na pożywce w wyniku mutacji wywołanych przez mutagen. Mimo, że mutagen obniżał efektywność metody *H. bulbosum* wyrażonej wyżej wspomnianymi wskaźnikami, obniżenie to było mniejsze aniżeli wynikałoby to ze stosowania silnej dawki mutagenu (1,1 mM). Efekt ten może mieć związek z naświetlaniem ziarniaków stymulującą dawką światła lasera przed działaniem mutagenu, co wykazano we wcześniejszych badaniach (Rybiński i in., 2000).

Praktyczne wykorzystanie form haploidalnych jest możliwe po podwojeniu ich liczby chromosomów i otrzymaniu tą drogą linii podwojonych haploidów (DH). Uzyskane linie charakteryzowały się szerokim zakresem zmienności cech ilościowych związanych z parametrami plonowania (tab. 2).

Tabela 2

Średnie kwadraty z analizy wariancji oraz wartości minimalne, maksymalne, średnie i współczynniki zmienności badanych cech
Mean squares from analysis of variance, minimum and maximum values, means and coefficient of variation of the investigated traits

Źródło zmienności Source of variation	Powtórzenie Replication	Średnie kwadraty Mean squares		Min-Max	Średnia Mean	Współczynnik zmienności Coefficient of variation
		linie — lines	błąd — residual			
Liczba stopni swobody Number of degrees of freedom	2	37	74			
WR	0,72	30,921***	4,596	69,4-88,4	80,09	4,53
DK	0,5693	1,3409***	0,3236	6,3-10,7	8,91	9,12
LKR	0,167	2,65**	1,224	5,6-12,8	8,82	14,66
LZK	6,08	78,122***	3,209	16,4-50,6	26,16	20,15
MZK	0,02499	0,06128***	0,01238	0,87-2,01	1,22	13,86
LZR	4382	2738,5***	987,2	96,0-337,6	193,9	20,77
MZR	0,118	3,399ns	2,778	4,91-14,05	8,59	19,95
MTZ	110,22	27,17ns	22,98	30,2-59,5	44,08	11,54

** P<0,01; *** P<0,001; ns — nieistotne; not significant

WR — Wysokość roślin, Plant height (cm); DK — Długość kłosa, Spike length (cm); LKR — Liczba kłosów z rośliny, Spike number per plant; LZK — Liczba ziaren z kłosa, Grain number per spike; MZK — Masa ziaren z kłosa, Grain weight per spike (g); LZR — Liczba ziaren z rośliny, Grain number per plant; MZR — Masa ziaren z rośliny, Grain weight per plant (g); MTZ — Masa 1000 ziaren, Weight of 1000 grains (g)

Wartości średnich kwadratów z analizy wariancji wskazują na statystycznie istotne wartości ocenianych cech z wyjątkiem masy ziaren z rośliny i masy 1000 ziaren (MTZ). O znacznym zróżnicowaniu badanych linii DH świadczą szerokie zakresy zmienności analizowanych cech. Dotyczy to w szczególności wartości maksimum dla liczby ziaren z kłosa oraz liczby i masy ziaren z rośliny, dla których współczynniki zmienności są

najwyższe. Wynika to niewątpliwie z obecności dwóch linii DH o większej rzędowości kłosa. Zarówno odmiana uprawna Rudzik jak i pozostałe linie DH są formami dwurzędowymi. Najniższe wartości współczynnika zmienności uzyskano dla wysokości roślin i długości kłosa. Współzależność między analizowanymi cechami linii DH przedstawiono w tabeli 3. Nie wykazano korelacji między wysokością roślin, a pozostałymi cechami. Najwyższe, pozytywne wartości współczynnika korelacji uzyskano dla liczby i masy ziaren z kosa, a w następnej kolejności dla par cech: masy i liczby ziaren z rośliny, liczby ziaren z kłosa i rośliny oraz liczby kłosów i masy ziaren z rośliny. Z kolei MTZ była negatywnie skorelowana z liczbą i masą ziaren z kłosa oraz liczbą ziaren z rośliny, a pozytywnie z długością kłosa. Nie wykazano natomiast korelacji MTZ z masą ziaren z rośliny. Te wysokie współczynniki korelacji wynikają z fizjologicznych zależności cech.

Tabela 3

Wartości współczynnika korelacji między obserwowanymi cechami
Coefficient of correlations among the analyzed traits

	WR	DK	LKR	LZK	MZK	LZR	MZR	MTZ
WR	1							
DK	0,0572	1						
LKR	0,0463	0,1346	1					
LZK	0,0784	-0,4102*	-0,1184	1				
MZK	0,0637	-0,207	-0,249	0,9131***	1			
LZR	0,1221	-0,276	0,5149***	0,7453***	0,5953***	1		
MZR	0,1017	-0,0004	0,7178***	0,3849*	0,3446*	0,8372***	1	
MTZ	-0,088	0,440**	-0,0182	-0,634***	-0,423**	-0,5647***	-0,0841	1

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

WR — Wysokość roślin, Plant height ; DK — Długość kłosa, Spike length ; LKR — Liczba kłosów z rośliny, Spike number per plant; LZK — Liczba ziaren z kłosa, Grain number per spike; MZK — Masa ziaren z kłosa, Grain weight per spike; LZR — Liczba ziaren z rośliny, Grain number per plant; MZR — Masa ziaren z roślin, Grain weight per plant; MTZ — Masa 1000 ziaren, Weight of 1000 grains

Zmienność linii DH w porównaniu z ich odmianą wyjściową Rudzik przedstawiono w formie kontrastu (tab. 4). Uzyskanie zarówno dodatnich jak i ujemnych wartości kontrastu wskazuje na znaczne zróżnicowanie poszczególnych linii DH w stosunku do odmiany Rudzik. Część linii pod względem wartości danej cechy przewyższała odmianę wyjściową Rudzik (ujemne wartości kontrastu), a część jej ustępowała (wartości dodatnie), przy czym tylko dla niektórych linii i cech wartość kontrastu była statystycznie istotna. Generalnie dominują dodatnie wartości kontrastu wskazując na wyższe wartości ocenianych cech ilościowych u odmiany Rudzik aniżeli linii DH. Wyjątkiem jest wysokość roślin, dla której liczba ujemnych kontrastów była wyższa niż dodatnich. Dziesięć z ocenianych linii statystycznie istotnie przewyższało wysokością odmianę Rudzik (między innymi R 69; R 66 i R 73), a tylko jedna z linii (R 20) charakteryzowała się istotnym skróceniem długości źdźbła. Na znaczną efektywność mutagenów w indukowaniu zmienności długości źdźbła wskazują dane literaturowe (Ehrenberg i in., 1961; Kirishnaswami, 1967; Kumar i in., 1967; Rybiński, 1981; Kapała i Rybiński, 1996).

Tabela 4

Ocena wartości kontrastu dla cech ilościowych w porównaniach odmiany Rudzik z liniami DH
Contrast estimation for the quantitative traits in comparisons between cv. Rudzik and DH lines

Porównywane obiekty Compared objects	Ocena kontrastu dla cech Contrast estimation for traits							
	WR	DK	LKR	LZK	MZK	LZR	MZR	MTZ
Rudzik - R2	-1	0,34	0,07	2,4	0,117	1	0,5	2,9
Rudzik - R3	2	-0,39	0,8	-0,4	-0,033	30	2,2	5,5
Rudzik - R4	-0,8	0,61	0,33	2	0,053	14	1,1	3,3
Rudzik - R6	-3,7*	0,87	-0,6	1,9	0,1	8	1	3,8
Rudzik - R9	-3,6*	1,64***	1,33	4,6**	0,18	32	1,6	2,1
Rudzik - R10	-3,9*	0,87	-0,07	4,0**	0,143	17	0,7	4,2
Rudzik - R11	-1,9	0,71	0,13	3,1*	0,087	19	1,5	4,6
Rudzik - R12	-3,2	0,34	1,53	1,3	0,04	38	2,5	6,2
Rudzik - R13	-3,4	0,17	0,8	1,6	-0,057	29	1	0
Rudzik - R14	-3,3	0,07	1,33	0,3	-0,053	7	1	7,2
Rudzik - R16	1,4	0,77	1,53	2	0,013	45	2,3	2,6
Rudzik - R18	-2	0,97*	1,13	2,2	0,057	39	1,8	1,5
Rudzik - R19	1,1	0,84	0,93	2	0,08	37	2,4	4,6
Rudzik - R20	5,6**	1,14*	1,8*	2,8	0,123	56*	2,9*	3,7
Rudzik - R21	-0,1	-0,26	1,93*	1	-0,023	48	2,1	1,2
Rudzik - R23	-4,4*	0,31	1,73	2,8	0,023	44	1,6	-1,4
Rudzik - R26	-2,8	0,94*	0,23	2,3	0,09	9	1	4,3
Rudzik - R27	-4,1*	-0,03	1,93*	0,8	-0,01	58*	2,7*	1,2
Rudzik - R28	1,6	1,57**	2*	3,6*	0,167	68*	3,2*	2,6
Rudzik - R36	0,3	0,47	0,27	3,0*	0,07	35	0,9	-2,6
Rudzik - R37	-0,6	0,64	-0,47	3,2*	0,087	3	-0,4	-0,1
Rudzik - R38	-0,8	0,41	1,13	0,8	-0,03	21	0,7	2,9
Rudzik - R39	2,1	0,27	1,27	0,3	-0,037	25	0,7	-1,4
Rudzik - R40	2,5	0,14	0,87	1	-0,01	19	0,9	1,2
Rudzik - R41	2	0,57	2,4**	6,4***	0,167	66*	3,2*	1,3
Rudzik - R42	2,3	0,21	-0,4	1,6	0,11	7	0,6	2,5
Rudzik - R47	1,2	0,34	-1,27	1,4	0,02	-15	-0,8	4
Rudzik - R65	-2,4	1,97***	1,27	-22,9***	-0,66***	-90**	-1,3	9,3*
Rudzik - R66	-6,2***	0,44	1,67	1,7	0,03	44	2,3	1,9
Rudzik - R67	5,0**	0,41	1,67	0,8	-0,047	39	1,8	0,1
Rudzik - R68	-3,3	2,71***	1,87*	-15,4***	-0,25**	-33	1,5	12,7**
Rudzik - R69	-7,8***	0,37	0,93	2,8	0,04	37	0,9	-2,1
Rudzik - R70	2,8	1,07*	2,07*	-0,2	-0,053	34	1,6	0,9
Rudzik - R71	1,4	1,94***	2,33*	4,8**	0,007	77**	2,9*	0,2
Rudzik - R73	-6,2***	0,14	1,13	2,9	0,13	38	1,9	1,8
Rudzik - R74	3,4	1,84***	-0,73	1,6	0,19*	-9	0,2	3,3
Rudzik - R75	-4,6*	0,87	-0,13	3,9*	0,133	16	0,9	2,4

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

WR — Wysokość roślin, Plant height (cm); DK — Długość kłosa, Spike length (cm); LKR — Liczba kłosów z rośliny, Spike number per plant; LZK — Liczba ziaren z kłosa, Grain number per spike; MZK — Masa ziaren z kłosa, Grain weight per spike (g); LZR — Liczba ziaren z rośliny, Grain number per plant; MZR — Masa ziaren z roślin, Grain weight per plant (g); MTZ — Masa 1000 ziaren, Weight of 1000 grains (g)

Serię mutantów karłowych jęczmienia po traktowaniu ziarniaków MNU i azydkiem sodu uzyskał Umba Di-Umba i in. (1991). Laib i in. (1996) traktując ziarniaki jęczmienia chemomutagenem i wykładając pylniki na pożywkę, uzyskali liczne mutanty typu *viridis*, *eceriferum*, mutanty półkarłowe oraz karłowe o obniżonej liczbie źdźbeł. Zastosowana w prezentowanej pracy metody *H. bulbosum* okazała się mało efektywna dla selekcji form krótkosłomych. Istotnym elementem zmienności linii DH jest natomiast uzyskanie form o

zmienionej budowie kłosa, czego przykładem są dwie linie R 65 i R 68 o odmiennej rzędowości kłosa. Linie te istotnie różniły się od dwurzędowej odmiany Rudzik, co znalazło odzwierciedlenie w istotnie wyższych wartościach liczby i masy ziaren z kłosa oraz liczby ziaren z rośliny (ujemne wartości kontrastu). Obydwie linie charakteryzowały się natomiast istotnie krótszym kłosem i niższą masą 1000 ziaren (dodatnie wartości kontrastu). Z uwagi na niską MTZ, obydwie linie nie różniły się istotnie pod względem masy ziaren z rośliny od odmiany Rudzik. Podobną tendencję pod względem struktury plonowania wykazywały wielorzędowe linie DH w badaniach Rybińskiego i in. (2008).

Tabela 5

Ocena podobieństwa między liniami DH pod względem analizowanych cech określona na podstawie odległości Mahalanobisa
Estimation of similarity among DH lines for the analyzed traits calculated on the basis of Mahalanobis distance

	R2	R3	R4	R6	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R16	R18	R19	R20	R21	R23	R26	R27	R28
R2	0,00																		
R3	4,18	0,00																	
R4	1,84	3,69	0,00																
R6	3,52	5,15	2,63	0,00															
R9	4,05	7,30	3,79	4,09	0,00														
R10	3,08	5,66	2,77	2,42	3,04	0,00													
R11	2,65	4,12	1,62	1,75	3,99	2,01	0,00												
R12	3,24	4,03	2,50	3,01	4,24	2,71	2,24	0,00											
R13	2,73	4,32	1,82	2,91	3,65	2,84	2,02	2,06	0,00										
R14	3,70	4,55	3,06	4,44	4,56	3,62	3,58	2,30	2,96	0,00									
R16	3,18	3,62	1,85	4,11	4,49	4,16	2,99	3,29	2,59	3,38	0,00								
R18	2,84	4,90	1,63	2,74	2,65	2,67	2,22	2,51	1,69	3,17	2,21	0,00							
R19	2,77	3,11	1,29	3,08	4,58	3,55	2,05	2,78	2,53	3,53	1,44	2,18	0,00						
R20	4,08	4,12	3,46	5,75	5,85	5,69	4,67	5,10	4,67	4,94	2,26	4,07	2,86	0,00					
R21	2,81	3,13	2,91	5,01	5,37	4,66	3,78	3,13	2,84	3,40	2,78	3,52	3,06	3,76	0,00				
R23	3,17	5,88	3,36	4,22	3,05	3,44	3,59	3,20	2,25	3,97	4,03	2,75	4,19	5,68	3,38	0,00			
R26	2,58	4,98	1,56	1,89	2,78	1,83	1,67	2,41	2,05	3,11	2,97	1,33	2,43	4,66	4,04	3,20	0,00		
R27	3,50	4,43	3,19	3,66	4,54	3,67	3,09	1,84	2,06	3,52	3,82	2,97	3,53	5,61	2,84	2,40	3,29	0,00	
R28	3,37	5,06	2,41	4,03	3,30	3,77	3,27	3,66	3,17	4,04	1,93	1,85	2,27	2,83	3,77	3,83	2,74	4,15	0,00
R36	1,94	4,25	2,05	3,76	4,30	3,80	2,82	3,89	2,64	4,66	2,66	2,74	2,51	3,55	2,94	3,30	3,09	3,71	2,91
R37	1,59	4,82	1,75	3,53	3,59	3,03	2,69	3,86	2,83	4,02	2,83	2,51	2,70	3,71	3,59	3,55	2,38	4,29	2,84
R38	3,09	4,31	2,27	4,46	4,15	3,89	3,52	3,12	2,80	2,04	1,98	2,44	2,65	3,26	2,92	3,89	2,87	3,95	2,69
R39	3,62	4,65	3,48	5,92	5,46	5,82	5,04	5,10	4,18	4,52	2,73	3,91	3,63	2,58	3,13	4,76	4,59	5,13	3,48
R40	2,93	3,36	2,77	5,32	5,64	5,23	4,19	4,44	3,73	4,09	2,20	3,75	2,78	2,11	2,44	4,72	4,19	4,70	3,42
R41	3,52	5,40	4,17	5,99	5,19	4,96	4,57	4,86	4,20	5,35	4,15	4,52	4,45	4,52	3,24	3,71	4,98	4,57	4,21
R42	2,27	3,04	2,67	4,45	5,91	4,68	3,55	4,40	4,03	4,81	3,30	4,10	2,72	3,26	3,24	5,08	3,99	4,74	4,02
R47	3,33	3,57	2,61	4,15	5,82	4,27	3,30	4,35	4,07	4,13	3,12	3,95	2,63	3,51	4,31	5,75	3,59	5,39	4,06
R65	22,54	21,97	21,46	21,77	21,90	22,82	22,36	21,87	21,84	20,93	20,90	21,08	21,24	21,03	22,33	22,85	21,32	22,39	21,11
R66	3,95	5,94	3,60	3,32	3,36	3,01	3,25	2,34	2,39	3,76	4,52	2,79	4,25	6,45	4,24	2,09	2,87	1,87	4,30
R67	4,72	4,33	4,23	6,63	6,74	6,79	5,60	5,86	5,03	5,46	2,95	4,85	3,85	2,04	3,80	6,00	5,56	5,99	4,10
R68	17,45	17,24	16,35	16,35	16,48	17,38	17,09	16,56	16,75	15,86	15,97	15,82	16,14	16,29	17,48	17,67	15,99	17,16	15,90
R69	4,33	7,12	4,43	3,99	3,16	3,22	4,04	3,73	3,27	4,82	5,51	3,64	5,31	7,31	5,14	2,13	3,58	3,16	5,06
R70	5,48	6,07	4,62	6,64	5,80	6,74	6,05	5,99	5,26	5,13	3,41	4,45	4,48	3,32	5,06	6,06	5,25	6,35	3,76
R71	6,08	7,08	4,73	5,90	4,68	5,63	5,21	5,69	4,81	5,52	3,68	3,91	4,54	4,63	6,02	5,67	4,77	6,24	3,35
R73	3,79	6,25	4,36	4,05	4,32	3,34	3,85	3,35	3,56	4,85	5,61	4,16	5,11	7,14	4,53	2,61	3,92	2,68	5,35
R74	4,89	6,41	4,28	5,36	5,59	5,90	5,34	6,39	5,78	6,20	4,35	4,61	4,27	3,94	6,30	6,78	4,61	7,09	3,99
R75	3,19	5,92	2,94	1,94	3,00	1,44	2,04	3,07	2,68	4,41	4,43	2,70	3,76	6,09	4,85	3,05	1,99	3,41	4,02
R-K	1,97	3,63	2,24	4,31	5,08	4,59	3,63	4,00	3,18	4,07	2,80	3,28	2,75	3,40	2,62	4,05	3,44	4,02	3,58
	R2	R3	R4	R6	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R16	R18	R19	R20	R21	R23	R26	R27	R28

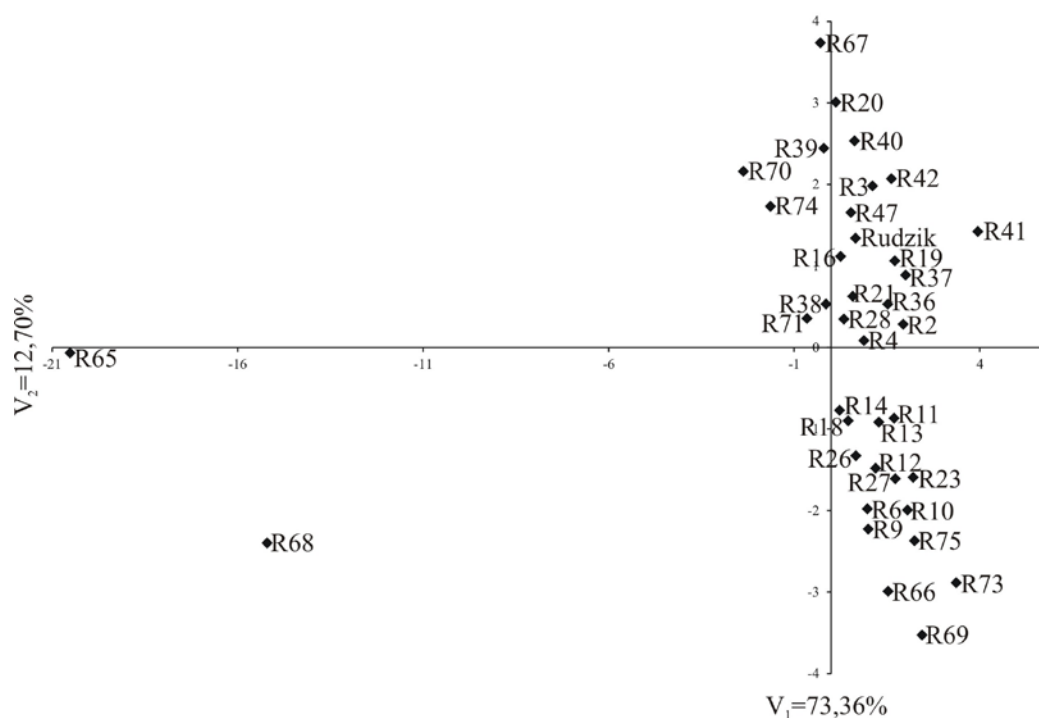
c. d. Tabela 5

	R36	R37	R38	R39	R40	R41	R42	R47	R65	R66	R67	R68	R69	R70	R71	R73	R74	R75	R-K
R36	0,00																		
R37	1,75	0,00																	
R38	3,52	2,89	0,00																
R39	3,33	3,43	2,76	0,00															
R40	2,75	2,95	2,58	1,55	0,00														
R41	3,17	3,82	4,67	4,54	3,98	0,00													
R42	2,45	2,70	3,83	3,53	2,34	4,29	0,00												
R47	3,61	2,89	3,26	4,16	3,07	5,53	2,55	0,00											
R65	22,62	22,17	20,48	20,54	21,33	24,63	22,37	21,35	0,00										
R66	4,34	4,43	4,34	5,90	5,69	5,27	5,71	5,97	22,28	0,00									
R67	4,01	4,45	3,79	1,91	1,95	5,02	3,85	4,33	20,63	7,00	0,00								
R68	17,64	17,15	15,54	15,98	16,69	19,68	17,51	16,51	6,35	16,87	16,28	0,00							
R69	4,68	4,63	5,22	6,56	6,45	5,42	6,34	6,69	23,27	1,73	7,84	17,87	0,00						
R70	5,13	4,92	3,41	2,66	3,65	6,43	5,48	5,16	18,44	6,74	3,01	13,89	7,59	0,00					
R71	5,27	5,05	4,36	5,23	5,42	6,14	6,62	5,72	20,47	6,05	5,30	15,57	6,65	4,21	0,00				
R73	4,50	4,70	5,43	6,62	6,18	4,88	5,62	6,46	24,11	2,27	7,77	18,68	2,08	8,10	7,63	0,00			
R74	4,74	4,02	4,63	4,37	4,52	7,00	4,53	4,03	19,44	7,15	4,78	14,52	7,69	4,12	5,45	7,97	0,00		
R75	3,55	3,21	4,53	6,01	5,51	5,03	4,85	4,86	22,99	2,57	6,98	17,55	2,57	7,01	5,87	2,84	6,09	0,00	
R-K	2,20	2,39	2,91	2,30	1,83	4,37	1,98	3,20	21,28	4,85	3,37	16,47	5,49	4,36	6,05	5,17	4,33	4,59	0,00
	R36	R37	R38	R39	R40	R41	R42	R47	R65	R66	R67	R68	R69	R70	R71	R73	R74	R75	R-K

$D_{\alpha} = 8,73$

W przeciwieństwie do analizy kontrastów obejmującej porównanie każdej z linii z odmianą Rudzik dla każdej z cech, obliczone wartości odległości Mahalanobisa z podaną wartością krytyczną pozwalają na ocenę podobieństwa między poszczególnymi liniami w odniesieniu do analizowanych cech łącznie (tab. 5). Najkrótsze odległości (największy stopień podobieństwa) w zakresie od 0 do 2 uzyskano w porównaniach odmiany Rudzik (R-K) z liniami R 2 i R 42, a najdłuższe (najmniejszy stopień podobieństwa) w porównaniach odmiany Rudzik z wielorzędkowymi liniami R 65 i R 68 (odpowiednio 21,3 i 16,5). Linie te różniły się też najbardziej od każdej z pozostałych. W dalszych porównaniach najmniejszym podobieństwem do odmiany Rudzik (R-K) pod względem analizowanych cech (odległości w zakresie 5–6) charakteryzowały się linie: R 9, R 69, R 71 i R 73. Do linii o największej odrębności (odległości powyżej 7) zaliczyć można między innymi linie R 67 w stosunku do linii R 69 i R 73, R 69 do R 70 i R 74 oraz R 73 w porównaniu z linią R 74.

W celu graficznego przedstawienia badanych obiektów zastosowano analizę zmiennych kanonicznych (Rencher, 1998). Umożliwia ona zobrazowanie odległości 8-cechowych z metryką odległości Mahalanobisa w formie graficznej i w ten sposób ułatwić grupowanie i charakterystykę wielocechową (rys. 1). Przestrzenne rozmieszczenie obiektów na płaszczyźnie w odniesieniu do położenia odmiany Rudzik potwierdza zróżnicowanie linii DH pod względem analizowanych cech. Skrajnym położeniem i największą odrębnością charakteryzują się linie R 65 i R 68, a w dalszej kolejności linia R 67 oraz R 66; R 73 i R 69.



Rys. 1. Rozmieszczenie linii DH i odmiany Rudzik w układzie dwu pierwszych zmiennych kanonicznych

Fig. 1. Distributions of DH lines and cv. Rudzik in the first two canonical variables

WNIOSKI

1. Zastosowany chemomutagen — MNU w porównaniu z wariantem kontrolnym wpływał na obniżenie efektywności uzyskiwania haploidów mierzonej stosunkiem liczby uzyskanych ziarniaków do liczby zapylonych kwiatów oraz liczby haploidów do zapylonych kwiatów i wykładanych na pożywkę zarodków.
2. Obniżenie efektywności otrzymywania haploidów w kombinacji z mutagenem może mieć związek z wywoływanymi przez mutagen uszkodzeniami somatycznymi jak również indukowanymi mutacjami.
3. Wartości średniego kwadratu z analizy wariancji cech ilościowych z doświadczenia polowego wskazują na istotne zróżnicowanie linii DH uzyskanych przy wykorzystaniu mutagenu w porównaniu z kontrolą (odmiana Rudzik), a zastosowanie wielo cechowej metody statystycznej umożliwiło identyfikację linii DH które w efekcie stosowania mutagenu i procedury *in vitro* charakteryzowały się największą odrębnością od ich odmiany wyjściowej
4. Zróżnicowanie cech ilościowych u uzyskanych roślin DH w kombinacji z mutagenem w porównaniu z kontrolą (odmiana Rudzik) może mieć charakter zmian natury

- genetycznej, będących efektem działania mutagenu. Wskazuje na to między innym uzyskanie linii DH o zmienionej w stosunku do kontroli rzędowości kłosa.
5. Zastosowanie mutagenezy w systemie DH według metodyki w prezentowanej pracy umożliwia uzyskanie linii DH o poszerzonej zmienności genetycznej cech, które mogą zostać wykorzystane zarówno w praktyce hodowlanej, jak i badaniach podstawowych.

LITERATURA

- Adamski T., Jeżowski S., Majewska T., Surma M. 1990. Efektywność metody bulbosowej w zależności od genotypu *Hordeum vulgare* i *Hordeum bulbosum*. *Hodowla Roślin* 4/ 5: 1 — 5.
- Berversdorf W.D., Kott L.S. 1987. An in vitro mutagenesis/selection system for *Brassica napus*. *Iowa State J. Res.* 61: 435 — 443.
- Caliński T., Dyczkowska A., Kaczmarek Z. 1976. Algorytmy Biometrii i Statystyki. Zeszyt 5: 77 — 113.
- Ceranka B., Chudzik H., Czajka S., Kaczmarek Z. 1997. Wieloimienna analiza wariancji dla doświadczeń wieloczynnikowych. Algorytmy Biometrii i Statystyki. Zeszyt 6: 51 — 60.
- Devaux P., Adamski T., Surma M. 1990. Studies on low cross abilities encountered with the *Hordeum bulbosum* method for haploid production of barley, *Hordeum vulgare* L. *Plant Breeding* 104: 305 — 311.
- Ehrenberg L., Gustafsson A., Lundqvist U. 1961. Viable mutants induced in barley by ionizing radiation and chemical mutagens. *Hereditas* 47: 243 — 282.
- Kapała A., Rybiński W. 1996. Zmienność i jakość białka oraz zdolność plonowania u krótkosłomych mutantów jęczmienia jarego. *Biul. IHAR* 200: 191 — 195.
- Kasha K.J., Kao K.N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225: 874 — 876.
- Kirishnaswami R. 1967. Radiation induced dwarf mutants in barley. *Curr. Sci.* 36(12): 327 — 328.
- Kozak M., Bocianowski J., Sawkojć S., Wnuk A. 2010. Call for more graphical elements in statistical teaching and consultancy. *Biometrical Letters* 47(1): 57 — 68.
- Kozak M., Bocianowski J., Rybiński W. 2013. Note on the use of variation for data from agricultural factorial experiments. *Bulgarian J. Agric. Sci.* 19 (4): 644 — 646.
- Kumar S., Bansal H. C., Singh D., Swaminathan M. S. 1967. Pathways of height reduction in induced dwarf mutation in barley. *Z. Pflanzenzüchtung* 57: 317 — 324.
- Laib Y., Szarejko I., Polok K., Małuszyński M. 1996. Barley anther culture for doubled haploid mutant production. *Mutation Breeding Newsletter* 42: 13 — 15.
- Małuszyński M., Małuszyńska J., Malepszy S. 1978. Wybrane zagadnienia mutagenezy roślin wyższych. *Mutagenza Roślin Wyższych. Materiały III ogólnopolskiej konferencji mutacyjnej*. Uniwersytet Śląski, Katowice 1978: 15 — 30.
- Pickering R.A., Devaux P. 1992. Haploid production: Approaches and use in plant breeding. In: *Barley Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology* (P.R. Shewry ed.). C.A.B. Int. Wallingford, UK: 519 — 547.
- Rencher A.C. 1998. Interpretation of canonical discriminant functions, canonical variates, and principal components. *Am. Stat.* 46: 217 — 225.
- Rybiński W. 1981. Short-straw forms of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) obtained as a result of MNUA-induced mutations. *Genetica Polonica* 22 (3): 271 — 287.
- Rybiński W. 1998. Wykorzystanie światła lasera w badaniach nad roślinami wyższymi. *Zastosowanie kultur in vitro w fizjologii roślin* (F. Dubert, M. Rapacz – edytorzy), Kraków 1998: 169 — 178.
- Rybiński W., Patyna H., Przewoźny T. 1993. Mutagenic effect of laser and chemical mutagens in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Genetica Polonica* 34 (3): 337 — 343.
- Rybiński W., Adamski T., Surma M. 2000. Wykorzystanie światła lasera i chemomutagenu w badaniach nad uzyskaniem linii podwojonych haploidów jęczmienia. *Zesz. ty Probl. Post. Nauk Roln.* 473: 291 — 298.
- Rybiński W. 2001. Influence of laser beams combined with chemomutagen (MNU) on the variability of traits and mutation frequency in spring barley. *Int. Agrophysics* 15: 115 — 119.
- Rybiński W. 2003. Mutagenesis as a tool for improvement of traits in grasspea (*Lathyrus sativus* L.). Edited by Colin Hanbury, CLIMA, Australia, *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 3: 27 — 31.

- Rybiński W., Pietruszewski S., Kornarzyński K. 2003. Influence of magnetic field with chemomutagen and gamma rays on the variability of yielding parameters in barley. *Int. Agrophysics* 17: 85 — 91.
- Rybiński W., Pankiewicz K., Bocianowski J., Rębarz M. 2008. Analiza wybranych cech na poziomie fenotypowym i molekularnym u dwu- i wielorzędowych linii podwojonych haploidów jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) *Biul. IHAR* 249: 141 — 155.
- Surma M. 1997. Wykorzystanie zjawiska eliminacji chromosomów w hodowli jęczmienia. Akademia Rolnicza w Poznaniu. *Seminaria Wydziału Rolniczego, Zeszyt 3*: 157 — 174.
- Swanson E. B., Herrgesell M. J., Arnold M., Sippel D. W., Wong R. S. C. 1989. Microspore mutagenesis and selection: Canola plant with field tolerance to the imidazolinones. *Theor. Appl. Genet.* 78: 525 — 530.
- Szarejko I., Małuszyński M., Polok K., Kilian A. 1991. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement. *Proceedings of a Symposium, Vienna, 18–22 June 1990*: 355 — 378.
- Umba Di-Umba, Małuszyński M., Szarejko I., Zbieszczyk J. 1991. High frequency of DH-mutants from M_1 after mutagenic treatment with MNH and sodium azide. *Mutation Breeding Newsletter* 38: 8 — 9.
- Zapata F. J., Aldemita R. R. 1989. „Induction of salt tolerance in high yielding rice varieties through mutagenesis and anther culture”, *Current Options for Cereal Improvement* (Małuszyński M., ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 193 — 202.

ELŻBIETA MIELNICZUK¹**IRENA KIECANA**¹**MAŁGORZATA CEGIELKO**¹**ALINA PASTUCHA**¹**JULIUSZ PERKOWSKI**²¹ Katedra Fitopatologii i Mykologii, Uniwersytet Przyrodniczy, Lublin² Katedra Chemii, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Wpływ sztucznego zakażenia owsa przez *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. na plon oraz zawartość mikotoksyn w ziarnie *

The effect of artificial inoculation of oat with *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. on the yield and mycotoxin content in the grain

Szkodliwość szczepu *F. equiseti* nr 20 wobec 15 genotypów owsa określono na podstawie ścisłego doświadczenia polowego ze sztucznym zakażeniem wiech. Badania przeprowadzono w 2014 roku, na polu doświadczalnym w południowo-wschodniej Polsce. Materiał infekcyjny stanowiła zawiesina konidiów *F. equiseti*. Średnia obniżka liczby ziarniaków w wieszce, w porównaniu do kontroli wynosiła 45,7% (od 15,8 do 66,7%), natomiast redukcja plonu ziarna wynosiła 47,7% (od 20,3 do 69,3%). Obniżka masy 1000 ziaren u badanych genotypów owsa wahała się od 0,5% do 22,8%, średnio 7,3%. W próbach ziarna wszystkich genotypów owsa stwierdzono obecność związków trichotecenowych z grupy A: T-2 toksyny od 0,001 do 0,044 mg·kg⁻¹, HT- 2 toksyny od 0,001 do 0,081 mg·kg⁻¹, scirpentriolu (STO) od 0,002 do 0,056 mg·kg⁻¹, T-2 tetraolu od 0,001 do 0,152 mg·kg⁻¹. Obecność diacetoksyscirpenolu (DAS) i T-2 triolu, stwierdzono u 14 analizowanych genotypów owsa. Stężenie tych metabolitów wynosiło odpowiednio od 0,001 do 0,005 mg·kg⁻¹ i od 0,001 do 0,008 mg·kg⁻¹. Ponadto w próbach ziarna wszystkich genotypów owsa, pochodzących z wiech inokulowanych *F. equiseti* oznaczono 3-Ac DON (0,023–0,026 mg·kg⁻¹), w przypadku 14 genotypów stwierdzono obecność DON (0,016–0,233 mg·kg⁻¹), zaś NIV był obecny w próbach 13 genotypów owsa, w stężeniu od 0,022 do 0,218 mg·kg⁻¹.

Słowa kluczowe: *Fusarium equiseti*, fuzarioza wiech, mikotoksyny, owies, redukcja plonu

The field experiment with artificial infection of panicles of 15 oat genotypes was performed in 2014, in southeastern Poland. Panicles were inoculated with conidial suspension of *Fusarium equiseti* no. 20. The mean reduction in the number of kernels per panicle was 45.7% (from 15.8 to 66.7%), in

* Praca przedstawiona na konferencji IHAR — PIB, Zakopane, 3 lutego 2015 roku

Redaktor prowadzący: Henryk J. Czembor

kernel yield — 47.7% (from 20.3 to 69.3%), and 1000 kernel weight — 7.3% (from 0.5 to 22.8%). Trichothecenes of group A and B were detected in oat kernels. The concentration of T-2 toxin ranged from 0.001 to 0.044 mg·kg⁻¹, HT-2 toxin from 0.001 to 0.081 mg·kg⁻¹, scirpentriol (STO) from 0.002 to 0.056 mg·kg⁻¹, T-2 tetraol from 0.001 to 0.152 mg·kg⁻¹. In kernels of 14 oat genotypes diacetoxyscirpenol (DAS) and T-2 triol were found and concentration of these metabolites ranged from 0.001 to 0.005 mg·kg⁻¹ and from 0.001 to 0.008 mg·kg⁻¹, respectively. Additionally in the infected kernels the following trichothecenes of group B were detected: DON (0.000-0.233 mg·kg⁻¹), 3-Ac - DON (0.023-0.026 mg·kg⁻¹), and NIV (0.000-0.218 mg·kg⁻¹).

Key words: *Fusarium equiseti*, mycotoxins, oat, scab, yield reduction

WSTĘP

W ostatnich latach fuzarioza kłosów i wiech nabiera coraz większego znaczenia. Występowanie tej choroby na zbożach uprawianych w różnych strefach klimatycznych jest przyczyną znacznych strat w plonie ziarna (Logrieco i in., 2003; Mesterhazy i in., 2003; Madden i Paul, 2009). Grzyby z rodzaju *Fusarium* mogą porażać kłosa zbóż w różnych fazach rozwojowych, przy czym najniebezpieczniejsza jest infekcja w fazie kwitnienia, bowiem prowadzi do zmniejszenia plonu w wyniku redukcji liczby ziarniaków w kłosie lub w wieszce oraz obniżenia masy tysiąca ziaren (Kiecana i in., 2002; 2012; Mielniczuk i in., 2004; Tekauz i in., 2004; Tekle i in., 2012).

Wśród gatunków porażających wiechy owsa, wymieniane są głównie: *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. graminearum* i *F. sporotrichioides* (Langseth i in., 1995; Mielniczuk, 2001; Tekauz i in., 2004; Kiecana i in. 2005; 2012, Tekle i in., 2012). Na kłosach zbóż, jako gatunek towarzyszący, notowany jest również *F. equiseti*. Grzyb ten został uznany między innymi za sprawcę fuzariozy kolb kukurydzy i kłosów pszenicy oraz innych zbóż uprawianych w Europie i Ameryce Północnej (Bottalico i Perrone, 2002; Logrieco i in., 2003; Kosiak i in., 2004; Fernandez i Chen, 2005). W Polsce izolowany był z kłosów jęczmienia jarego i wiech owsa oraz z ziarna pszenicy (Kiecana, 1994; Mielniczuk, 2001; Góral i in., 2010), zaś w Norwegii i Danii z ziarna pszenicy, jęczmienia i owsa (Kosiak i in., 2004; 2007; Nielsen i in., 2011).

W obrębie gatunku *F. equiseti* obserwowane jest zróżnicowanie morfologiczne szczepów, które powiązane jest z różnicami w wytwarzaniu metabolitów wtórnych, szczególnie mikotoksyn. Kosiak i współautorzy (2005) opisali dwa typy morfologiczne *F. equiseti* — dominujący typ I charakteryzujący się krótką komórką apikalną konidiów oraz typ II charakteryzujący się długą komórką apikalną konidiów i brakiem polifialid, ponadto w obrębie typu II wyróżniono 4 haplotypy.

Szkodliwość *Fusarium* spp. wynika nie tylko ze zmniejszenia plonu, ale także z ich zdolności do wytwarzania w porażonym ziarnie mikotoksyn szkodliwych dla organizmów stałocieplnych, zwłaszcza związków trichotecenowych z grupy A i B oraz zearalenonu (Logrieco i in., 2003; Goliński i in., 2010; Yli-Mattila, 2010; 2011; Góral i in., 2012). Czynnikiem wpływającym na zawartość mikotoksyn w porażonym ziarnie są warunki klimatyczno-glebowe, sposób zbioru i przechowywania ziarna, a także cechy genetyczne gatunków i odmian zbóż oraz toksynotwórcze uzdolnienia poszczególnych szczepów *Fusarium* spp. dokonujących infekcji kłosów (Bottalico i Perrone, 2002; Guatam i Dill-

Macky, 2007; Yli-Mattila, 2010; Góral i in., 2012). *Fusarium equiseti* wytwarza w różnych ilościach: niwalenol, fuzarenon X, deoksyniwalenol i jego acetylowe pochodne oraz diacetoksycirpenol, monoacetoksycirpenol, T-2 toksynę, HT-2 toksynę, T-2 triol, T-2 tetraol, scirpentriol, a także fuzarochromanon, zearalenon, butenolid i equisetin (Langseth i in., 1999, Bottalico i Perrone, 2002; Hestbjerg i in., 2002; Morrison i in., 2002; Moss i Thrane, 2004; Kosiak i in., 2005). Według Langseth i współautorów (1999) *F. equiseti* dorównuje cytotoksycznością najbardziej toksycznym izolatom *F. culmorum*.

W związku z występowaniem *F. equiseti* na kłosach różnych gatunków zbóż oraz brakiem informacji na temat szkodliwości tego grzyba dla owsa uprawianego w Polsce, celem pracy było określenie wpływu sztucznego zakażenia wiech 15 genotypów owsa przez *F. equiseti* na plon oraz zawartość mikotoksyn w ziarnie.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w 2014 roku, na polach doświadczalnych w południowo-wschodniej Polsce (okolice Zamościa). Objęto nimi 15 genotypów owsa: DC 06011-8, DC 06182/4, DC 07116-11/2, DC 14-6, DC 14-8, POB 525/10, POB 961-1344/13, POB 4109/10, POB 5733/10, POB 6020/10, STH 1.201, STH 1.230, STH 2.388, STH 3.695 i Denar. Rośliny badanych genotypów owsa zostały wysiane 1 kwietnia 2014 r. na poletkach doświadczalnych, o powierzchni 10 m² każde, przedplonem dla owsa były rośliny okopowe.

Szkodliwość *F. equiseti* dla owsa określono poprzez sztuczne zakażenie wiech w/w genotypów w fazie kwitnienia. Chorobotwórczość szczepów *F. equiseti* została przeprowadzona metodą Mishry i Behra (1976), na podstawie zdolności kiełkowania ziarniaków owsa odmiany Bingo, do dalszych badań wytypowano szczep nr 20, który obniżył kiełkowanie ziarna owsa do 11%.

Materiał infekcyjny stanowiła zawiesina konidiów *F. equiseti* nr 20, o zagęszczeniu 5×10^5 zarodników $\cdot \text{ml}^{-1}$, którą zakażano po 100 wiech każdego genotypu. Wzoruując się na wcześniejszych badaniach owsa (Kiecana i in., 2002; 2012; Mielniczuk i in., 2004), inokulację wiech przeprowadzono w fazie kwitnienia (1. 07. 2014 r.) przy pomocy rozpylacza ogrodniczego, używając 4 ml materiału infekcyjnego na 1 wiechę. Wiechy z kombinacji kontrolnej opryskano tylko wodą destylowaną. Po zakażeniu wiechy okrywano osłonami foliowymi i tym sposobem przez 24 godziny chroniono materiał zakaźny przed prądami powietrza i wysychaniem. W fazie dojrzałości pełnej ziarna, zebrano wiechy zainokulowane i wiechy kontrolne, a następnie wydzielono ziarniaki i określono: liczbę ziarniaków w wieszce (4×10 wiech), plon ziarna z 40 wiech (4×10 wiech) oraz masę 1000 ziaren. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie (Żuk, 1989).

Ziarniaki z kombinacji doświadczenia ze sztucznym zakażeniem wiech przez *F. equiseti* oraz z kombinacji kontrolnej poddano analizie mykologicznej, metodą szalkową z wykorzystaniem pożywki mineralnej oraz podłoży standardowych.

Analizę zawartości mikotoksyn w ziarnie pochodzącym z wiech inokulowanych *F. equiseti* przeprowadzono w Katedrze Chemii UP w Poznaniu. Oznaczanie trichotecenów z grupy A i B przeprowadzono po wcześniejszej ekstrakcji analizowanych

związków acetonitryl — woda 82 : 18 (v/v) oraz oczyszczaniu metodą ekstrakcji do fazy stałej. Trichoteceny grupy A analizowano jako pochodne trifluoroacetylowe, natomiast trichoteceny grupy B analizowano jako pochodne trimetylosililowe. Rozdział chromatograficzny oraz analiza prowadzona była oddzielnie za pomocą chromatografu gazowego (Hewlett Packard 6890) na kolumnie kapilarnej (HP-5MS, 0,25 mm × 30 m) sprzężonego z detektorem masowym (Hewlett Packard 5972 A). Analiza wykonywana była w trybie szukania wybranych jonów (SIM). Dla trichotecenów grupy A były to: STO 456 i 555; T-2 tetraol 455 i 568; T-2 triol 455 i 569; DAS 402 i 374; HT-2 toksyna 455 i 327; T-2 toksyna 327 i 401. Natomiast dla trichotecenów grupy B: DON 103 i 512; 3-AcDON 117 i 482; NIV 191 i 600. Szybkość przepływu helu wynosiła 0,7 cm³/min. Celem potwierdzenia obecności w próbce oznaczanych toksyn wykonana została analiza w pełnym zakresie mas (od 100–700 amu). Otrzymane wyniki poddano obróbce w programie Chem Station. Analiza zawartości zearalenonu: próby ziarna po uprzednim zmieleniu, poddano ekstrakcji mykotoksyn i po przesączeniu poddano procesowi oczyszczania na kolumnkach powinowactwa immunochemicznego firmy Vicam®. Odparowana do sucha pozostałość rozpuszczona została w 200 µl mieszaniny acetonitryl : metanol : woda (70:20:10, v/v/v), a następnie była homogenizowana w łaźni ultradźwiękowej i dozowana na kolumnę. Identyfikacja jakościowa i ilościowa zearalenonu została wykonana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem aparatu Waters 2695, z zestawem detektorów Multi Fluorescence Detector Waters 2475, Photodiode Array Detector Waters 2996 oraz kolumną C18 Nova Pak 3,9 × 150 mm. Fazę nośną stanowiła mieszanina rozpuszczalników: acetonitryl: woda: metanol (46:46:8, v/v/v), rozdział został dokonany przy przepływie 0,5 ml/min i limicie detekcji 0,3 ng/g.

WYNIKI BADAŃ

Sztuczne zakażanie wiech przez *F. equiseti* przy zastosowaniu opisanej metody okazało się skuteczne. Na wiechach wszystkich badanych genotypów owsa występowały charakterystyczne dla fuzariozy objawy i oznaki etiologiczne. Istotne różnice w liczbie ziarniaków w wiesze oraz w plonie ziarna, w porównaniu do kontroli zanotowano u 14 genotypów owsa, wyjątek stanowił ród hodowlany POB 525/10 (tab. 1). Stwierdzono również, że sztuczne zakażanie wiech przez *F. equiseti* wpłynęło istotnie na obniżkę masy 1000 ziaren w przypadku 5 genotypów owsa (tab. 1).

Ubytek liczby ziarniaków w wiesze, w porównaniu do kontroli wynosił od 15,8% (POB 525/10) do 66,7% (STH 1.201) (rys. 1), natomiast redukcja plonu ziarna wynosiła od 20,3% (POB 525/10) do 69,3% (STH 1.201). Średnia obniżka plonu ziarna w wyniku inokulacji wiech przez *F. equiseti* nr 20 wynosiła 47,7% (rys. 2). Redukcja masy 1000 ziaren u badanych genotypów owsa wahała się od 0,5% (STH 3.695) do 22,8% (DC 06182/4) (rys. 3).

Tabela 1

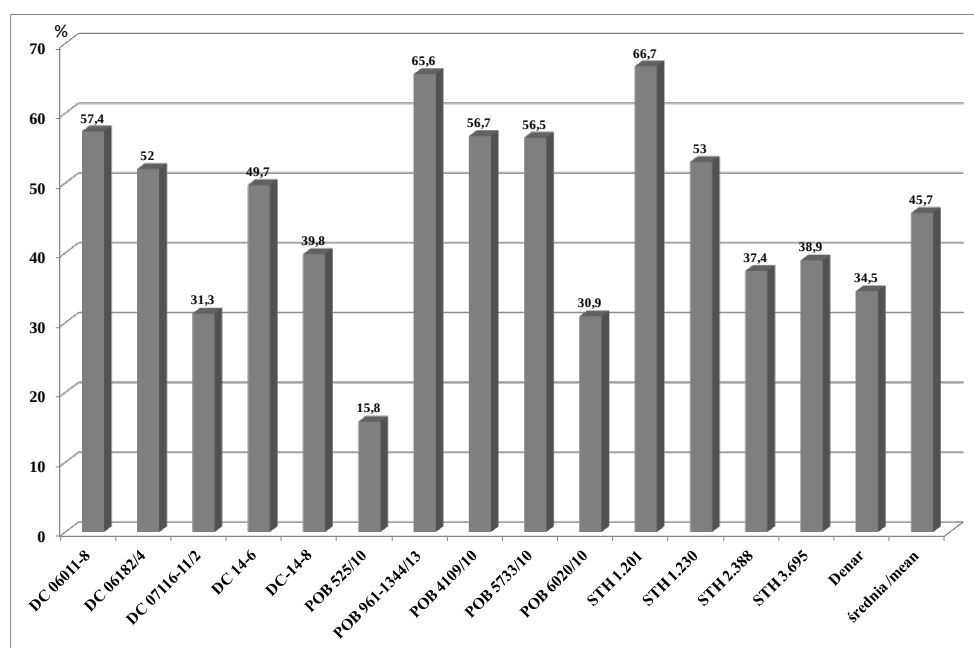
Wpływ sztucznego zakażenia wiech owsa przez *Fusarium equiseti* na liczbę ziarniaków w wieszce, plon
ziarna z 10 wiech (g), masę 1000 ziaren (MTZ) (g)

Effect of inoculation of oat panicles with *Fusarium equiseti* on the number of kernels per panicle,
kernel yield per 10 panicles (g) and 1000 kernel weight (TKW) (g)

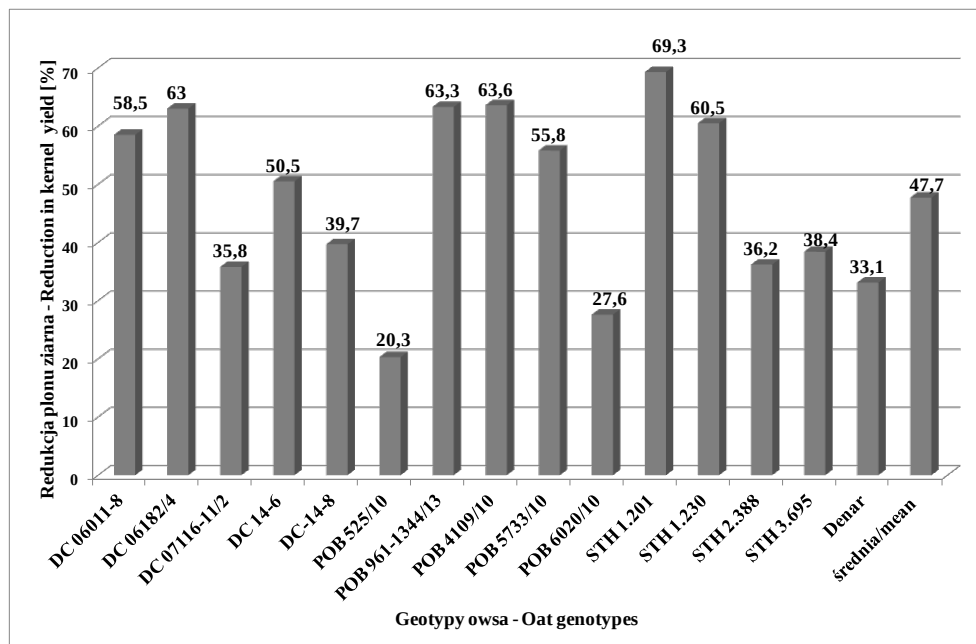
Nr No.	Genotypy owsa Oat genotypes	Średnia liczba ziarniaków w wieszce Average number of kernels per panicle		Średni plon ziarna z 10 wiech Average kernel yield per 10 panicles (g)		Średnia masa 1000 ziaren Average 1000 kernel weight (g)	
		<i>F. equiseti</i>	kontrola — control	<i>F. equiseti</i>	kontrola — control	<i>F. equiseti</i>	kontrola — control
1.	DC 06011-8	45,35*	106,57	12,80*	30,83	27,94	29,13
2.	DC 06182/4	43,38*	90,37	9,64*	25,99	22,25*	28,81
3.	DC07116-11/2	46,65*	67,92	14,43*	22,48	30,93	34,00
4.	DC 14-6	39,87*	79,27	13,04*	26,37	32,37	33,38
5.	DC 14-8	47,90*	79,60	15,08*	25,00	29,94	31,81
6.	POB 525/10	51,55	61,20	15,15	19,01	28,31*	31,69
7.	POB 961-1344/13	35,32*	102,62	10,73*	29,25	28,94	29,13
8.	POB 4109/10	28,30*	65,40	8,61*	23,67	30,06*	36,25
9.	POB 5733/10	38,90*	89,50	12,30*	27,84	30,94	31,38
10.	POB 6020/10	50,70*	73,40	15,58*	21,52	30,00	30,38
11.	STH 1.201	30,70*	92,23	9,16*	29,79	29,56*	33,25
12.	STH 1.230	34,90*	74,20	10,00*	25,30	28,88*	33,81
13.	STH 2.388	45,32*	72,45	14,65*	22,98	30,56	32,00
14.	STH 3.695	28,83*	47,15	6,43*	10,44	22,19	22,31
15.	DENAR	46,00*	70,25	14,83*	22,18	30,75	31,69
Średnia Mean		40,91	78,14	12,13	24,18	28,91	31,27

*Średnie różnią się istotnie w porównaniu do kontroli przy $P \leq 0,05$

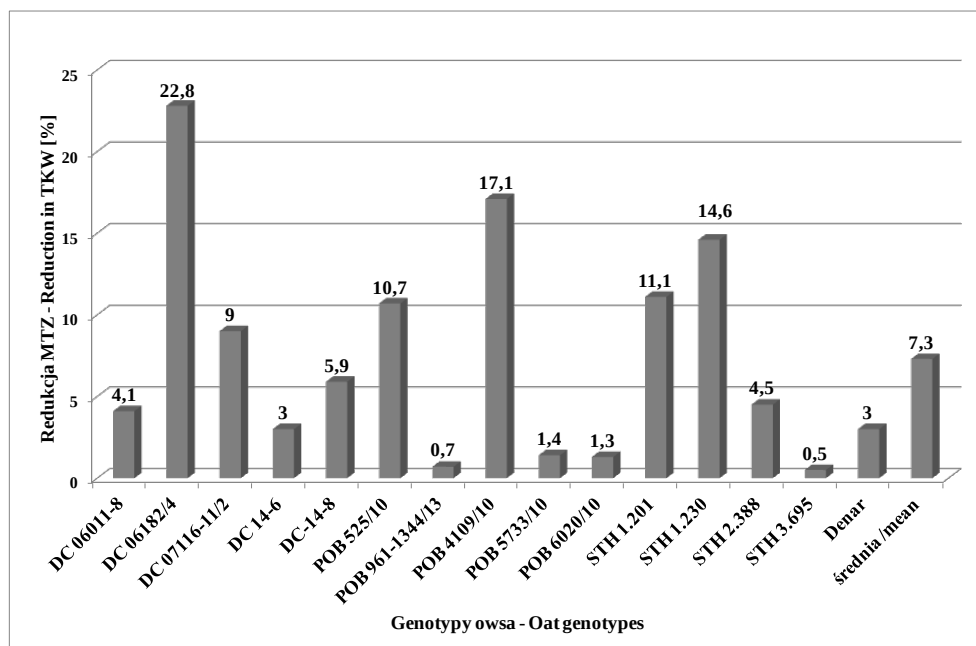
*Compared to the control, the means differ significantly at $P \leq 0.05$



Rys. 1. Redukcja liczby ziarniaków w wieszce w wyniku inokulacji przez *F. equiseti*
Fig. 1. Reduction in the number of kernels per panicle after inoculation with *F. equiseti*



Rys. 2. Redukcja plonu ziarna owsa w wyniku inokulacji wiech przez *F. equiseti*
Fig. 2. Reduction in kernel yield after oat panicles inoculation with *F. equiseti*



Rys. 3. Redukcja masy 1000 ziaren (MTZ) w wyniku inokulacji wiech przez *F. equiseti*
Fig. 3. Reduction in 1000 kernel weight (TKW) after oat panicles inoculation with *F. equiseti*

Analiza mykologiczna ziarniaków pochodzących z wiech sztucznie zakażanych przez *F. equiseti* dostarczyła licznych izolatów tego gatunku, na ogólną liczbę 759 wyosobnień wszystkich grzybów, 91,7% kolonii należało do *F. equiseti* (tab. 2). W wyniku analizy mykologicznej ziarniaków uzyskanych z wiech kontrolnych owsa najczęściej wyosabniano *Alternaria alternata*, kolonie innych grzybów należały do: *Bipolaris sorokiniana*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* i form niezarodnikujących (tab. 2).

Tabela 2

Grzyby wyosobnione z ziarniaków owsa uzyskanych z wiech sztucznie zakażanych przez *Fusarium equiseti* i wiech kontrolnych
Fungi isolated from oat kernels obtained from panicles inoculated with *F. equiseti* and from control panicles

Gatunki grzybów Fungi species	Liczba izolatów Number of isolates	
	<i>F. equiseti</i>	kontrola — control
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	22	126
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	2	0
<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Schoem.	0	2
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fries.) de Vries	0	25
<i>Drechslera avenae</i> (Eidam) Scharif.	2	0
<i>Epicoccum nigrum</i> Link ex Link	7	57
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	0	7
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G.Sm.) Sacc.	0	8
<i>Fusarium equiseti</i> (Fr.) Sacc.	696	0
<i>Fusarium poae</i> (Peck.) Wr.	0	6
<i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb.	3	0
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	0	2
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx var. <i>cyclopium</i> (West.) Samson et al.	4	2
<i>Trichoderma viride</i> Pers. Ex S. F. Gray	14	0
Formy nie zarodnikujące — Non-sporulating forms	9	10
Razem	759	245
Total		

Analiza chemiczna ziarniaków pochodzących z wiech inokulowanych *F. equiseti* wykazała obecność związków trichotecenowych z grupy A: T-2 toksyny w ilości od 0,001 (DC 06011-8, DC 06182/4, POB 961-1344/13) do 0,044 (POB 4109/10) mg·kg⁻¹, HT-2 toksyny od 0,001 (DC 06182/4) do 0,081 mg·kg⁻¹ (POB 525/10), scirpentriolu (STO) od 0,002 (DC 06182/4) do 0,056 mg·kg⁻¹ (POB 525/10), T-2 tetraolu od 0,001 (DC 06182/4) do 0,152 mg·kg⁻¹ (POB 525/10). Obecność diacetoksyscirpenolu, stwierdzono w przypadku 14 analizowanych genotypów owsa, wyjątek stanowił ród hodowlany POB 4109/10. Stężenie tego metabolitu w ziarnie pozostałych genotypów owsa wynosiło od 0,001 (DC 06011-8, DC 06182/4, POB 6020/10, STH 1.230, STH 3.695) do 0,005 mg·kg⁻¹ (DC 14-6). T-2 triol stwierdzono także w próbach ziarna 14 genotypów owsa, toksyny tej nie wykryto w ziarnie rodu hodowlanego DC 06011-8, zawartość T-2 triolu u pozostałych genotypów owsa wynosiła od 0,001 (DC 06182/4, DC 07116-11/2) do 0,008 mg·kg⁻¹ (POB 525/10) (tab. 3).

Tabela 3

Zawartość mikotoksyn ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) w ziarnie uzyskanym z wiech sztucznie zakażanych przez *Fusarium equiseti*

Content of mycotoxins ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in oat kernels after inoculation with *Fusarium equiseti*

Genotypy owsa Oat genotypes	ZEA	T-2 toksyna T-2 toxin	HT-2 toksyna HT-2 toxin	DAS	STO	T-2 triol	T-2 tetraol	DON	3-Ac DON	NIV
DC 06011-8	nd	0,001	0,002	0,001	0,003	nd	0,003	0,184	0,026	0,131
DC 06182/4	nd	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,103	0,025	0,050
DC07116-11/2	nd	0,006	0,016	0,002	0,005	0,001	0,006	0,088	0,025	0,101
DC 14-6	nd	0,003	0,012	0,005	0,023	0,002	0,020	0,074	0,025	0,076
DC 14-8	nd	0,002	0,022	0,003	0,006	0,004	0,023	0,085	0,024	nd
POB 525/10	nd	0,014	0,081	0,002	0,056	0,008	0,152	0,043	0,024	0,218
POB 961-1344/13	nd	0,001	0,014	0,004	0,037	0,003	0,046	0,085	0,024	0,170
POB 4109/10	nd	0,044	0,024	nd	0,035	0,002	0,048	nd	0,024	0,121
POB 5733/10	nd	0,012	0,031	0,003	0,052	0,005	0,066	0,085	0,024	0,121
POB 6020/10	nd	0,006	0,010	0,001	0,010	0,002	0,024	0,135	0,023	nd
STH 1.201	nd	0,005	0,007	0,003	0,014	0,002	0,019	0,233	0,024	0,022
STH 1. 230	nd	0,005	0,014	0,001	0,012	0,003	0,062	0,062	0,024	0,044
STH 2. 388	nd	0,017	0,004	0,002	0,026	0,003	0,013	0,075	0,023	0,042
STH 3.695	nd	0,012	0,014	0,001	0,018	0,002	0,032	0,016	0,024	0,022
DENAR	nd	0,015	0,017	0,002	0,014	0,003	0,014	0,016	0,024	0,087
Średnia Mean	nd	0,010	0,018	0,002	0,021	0,003	0,035	0,085	0,025	0,080

ZEA — zearalenon — zearalenone; DAS — diacetoksyscirpenol — diacetoxyscirpenol; STO — scirpentriol;

DON — deoksyniwalenol — deoxynivalenol; NIV — niwalenol — nivalenol

nd — nie wykryto — non detected

W próbach ziarna pochodzących z wiech inokulowanych *F. equiseti* oznaczono także trichoteceny z grupy B. Stężenie deoksyniwalenolu wynosiło od $0,016 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (STH 3. 695 i Denar) do $0,233 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (STH 1.201), przy czym w ziarnie rodu hodowlanego POB 4109/10 nie zanotowano obecności tego metabolitu. Zawartość 3-Ac DON wynosiła od $0,023 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (POB 6020/10, STH 2.388) do $0,026 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (DC 06011-8). Niwalenol (NIV) stwierdzono w przypadku ziarna 13 genotypów owsa, w stężeniu od 0,022 (STH 1.201, STH 3.695) do $0,218 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (POB 525/10) (tab. 3). W próbach ziarna analizowanych genotypów owsa nie wykryto obecności zearalenonu (tab. 3).

Tabela 4

Temperatura powietrza i opady w okresie wegetacji owsa w okolicach Zamościa w 2014 roku
Air temperature and rainfall in the Zamość region in the 2014 growing season of oat

Miesiąc Month	Średnie wieloletnie (1971–2000) Long-term mean (1971–2000)		Odchylenie temp. powietrza w 2014 Air temperatures deviation in 2014 (°C)	Procent normy opadów w 2014 Percentage of long- term mean in 2014 (%)
	temp. powietrza air temperatures (°C)	opady rainfall (mm)		
Kwiecień — April	9	40	+0,4	115
Maj — May	15	75	+1,2	280
Czerwiec — June	17	110	-1,0	77
Lipiec — July	18	90	+2,5	111
Sierpień — August	17	60	+0,3	163

Analizowany sezon wegetacji owsa charakteryzował się wyższą temperaturą powietrza od średnich wieloletnich w miesiącach: kwiecień, maj, lipiec i sierpień odpowiednio o: 0,4; 1,2; 2,5 i 0,3°C, jednocześnie opady w tych miesiącach przewyższały normę od 11 do 180 mm. W czerwcu temperatura była niższa od średniej wieloletniej o 1°C, a opady stanowiły 77% normy (tab. 4).

DYSKUSJA

Do określania podatności kłosów zbóż na porażenie przez grzyby z rodzaju *Fusarium* wykorzystuje się różne metody sztucznego zakażenia (Goswami i Kistler, 2005; Hamzehzarghani i in., 2008). W prezentowanych badaniach, wzorując się na metodach stosowanych przez Kiecanę (1994), Mielniczuk i in. (2004), a także Stein i in. (2009), wiechy opryskiwano zawiesiną konidiów *Fusarium equiseti* szczep nr 20, uznając ten sposób za najbardziej odpowiadający naturalnej infekcji. Biorąc pod uwagę zróżnicowaną chorobotwórczość szczepów w obrębie poszczególnych gatunków z rodzaju *Fusarium* (Kiecana, 1994), zawiesinę infekcyjną przygotowano z zarodnikującego szczepu *F. equiseti*, o chorobotwórczości sprawdzonej według metody stosowanej przez Mishrę i Behra (1976).

Rozwój fuzariozy kłosów w dużej mierze uzależniony jest od warunków pogodowych (Kiecana, 1994; Logrieco i in., 2003; Góral i in., 2012), w analizowanym roku badań wysoka temperatura oraz ilość opadów przewyższająca średnią wieloletnią w miesiącu lipcu, czyli bezpośrednio po inokulacji były sprzyjające dla rozwoju fuzariozy wiech powodowanej przez *F. equiseti*.

Przeprowadzone badania wykazały, że inokulacja wiech przez szczep nr 20 *F. equiseti* w fazie kwitnienia, w dużym stopniu wpływała na obniżenie liczby ziarniaków w wiesze, w mniejszym stopniu zaś hamowała ich rozwój. Od procentowego udziału porażonych wiech w łanie zależy redukcja wielkości plonu z powierzchni uprawy. Plon ziarna z wiech sztucznie zakażanych przez *F. equiseti* obniżył się przeciętnie o 47,7%. Z przeprowadzonych badań wynika, że w warunkach sztucznego zakażenia wiech *F. equiseti* w podobnym stopniu wpływa na redukcję plonu ziarna owsa, jak *F. culmorum* (Mielniczuk, 1999). Mniej szkodliwymi dla wiech owsa okazały się gatunki *F. crookwellense*, *F. sporotrichioides* oraz *F. avenaceum* w latach 1996–1998, a także *F. poae* w latach 2001 i 2008 (Mielniczuk, 1999; Kiecana i in., 2002; 2005; 2012; Mielniczuk i in., 2004). W warunkach kontrolowanych grzyb ten charakteryzował się mniejszą szkodliwością dla kłosów pszenicy jarej, aniżeli *F. avenaceum*, *F. culmorum* i *F. graminearum* (Fernandez i Chen, 2005). W niektórych rejonach Południowej Afryki gatunek ten uznano za ważniejszy w powodowaniu fuzariozy kłosów pszenicy, aniżeli *F. graminearum* uważany za głównego sprawcę choroby w tym kraju (van Coller i in., 2010). *Fusarium equiseti* uznano za jeden z czynników pogarszających jakość ziarna zbóż, w tym owsa uprawianego w Norwegii (Langseth i in., 1999; Kosiak i in., 2004; 2005).

W Polsce *F. equiseti* izolowany był również z korzeni i podstawy źdźbła owsa oraz z korzeni i pochew liściowych żyta (Kiecana i in., 2008; 2009). Ponadto grzyb ten okazał się głównym sprawcą nekrozy korzeni pszenicy oraz miał znaczny udział w uszkodzaniu

podstawy żdźbła tej rośliny uprawianej w warunkach północno-wschodnich rejonów Polski (Majchrzak i in., 2008).

Wyniki badań chemicznych dotyczących profilu i ilości wytwarzanych mikotoksyn potwierdziły dotychczasowe ustalenia, że *F. equiseti* jest zdolny do produkcji związków trichotecenowych z grup A i B (Bottalico i Perrone, 2002; Hestbjerg i in., 2002; Kosiak i in., 2005, Marin i in., 2012). Skład wytwarzanych mikotoksyn w ziarniakach uzyskanych z wiech owsa sztucznie zakażanych przez *F. equiseti* był zbliżony do profilu metabolitów tego grzyba produkowanych w warunkach laboratoryjnych (Langseth i in., 1999; Morrison i in., 2002; Kosiak i in., 2005). W próbach ziarna badanych genotypów stwierdzono obecność T-2 i HT-2 toksyny, diacetoksyscirpenolu, T-2 triolu, T-tetraolu, scirpentriolu, a także deoksyniwalenolu, 3Ac-DON i niwalenolu. W ziarniakach owsa porażonych przez analizowany szczep *F. equiseti* nie stwierdzono natomiast obecności neosolaniolu, monoacetoksyscirpenolu oraz fuzarenonu X i zearalenonu — metabolitów uznanych za charakterystyczne dla profilu mikotoksyn wytwarzanych przez różne izolaty *F. equiseti* (Hestbjerg i in., 2002; Kosiak i in., 2005; Desjardins, 2006). Stężenie mikotoksyn wytwarzanych w ziarnie analizowanych genotypów owsa było niższe, aniżeli w przypadku tych samych metabolitów produkowanych przez różne izolaty *F. equiseti* w warunkach laboratoryjnych (Kosiak i in., 2005). W prezentowanych badaniach szczep *F. equiseti* nr 20 w największych ilościach produkował deoksyniwalenol i niwalenol, średnie stężenie tych metabolitów wynosiło odpowiednio 0,085 i 0,080 mg·kg⁻¹ i było niższe, aniżeli w ziarnie owsa pochodzącym z wiech sztucznie zakażanych przez *F. culmorum* i *F. crookwellense* (Mielniczuk i in., 2004; Kiecana i in., 2010).

Poziom zanieczyszczenia ziarna owsa przez związki trichotecenowe z gr A: T-2 toksynę, DAS i T-2 — tetraol, w wyniku sztucznego zakażenia wiech przez *F. equiseti* był także wyższy, aniżeli w przypadku inokulacji wiech przez *F. poae* nr 35 w 2008 roku, jednak niższy w porównaniu do *F. poae* nr 37. Szczepy *F. poae* nr 35 i 37 w ziarnie owsa produkowały natomiast większe ilości scirpentriolu w porównaniu do analizowanego szczepu *F. equiseti* (Kiecana i in., 2005; 2012).

WNIOSKI

1. Wyniki badań wskazują na dużą patogeniczność *F. equiseti* dla wiech owsa.
2. Występowanie *F. equiseti* na wiechach owsa stwarza niebezpieczeństwo zanieczyszczenia ziarna toksycznymi metabolitami.

LITERATURA

- Bottalico A., Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. J. Plant Pathol. 108: 611 — 624.
- van Coller G. J., Sedeman Z., A., R., Boutigny A. L., Rose L., Lamprecht S. C., Viljoen A. 2010. *Fusarium* species associated with head blight of wheat in South Africa. Book of abstracts 11th European *Fusarium* Seminar, 20-23.09.2010, Radzików, Poland: 217.
- Desjardins A. E. 2006. *Fusarium*- mycotoxins chemistry genetics and biology. APS. PRESS. The American Phytopathological Society St. Paul. Minnesota USA.

- Fernandez M. R., Chen Y. 2005. Pathogenicity of *Fusarium* species on Different Plant Parts of Spring Wheat Under Controlled Conditions. *Plant Dis.* 89, 2: 164 — 169.
- Goliński P., Waśkiewicz A., Wiśniewska H., Kiecana I., Mielniczuk E., Gromadzka M., Kostecki M., Bocianowski J., Rymaniak E. 2010. Reaction of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to infection with *Fusarium* spp. mycotoxins contamination in grain and chaff. *Food Add. Contam. A*, 27, 7: 1015 — 1024.
- Goswami R. S., Kistler H.C. 2005. Pathogenicity and in plants mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology* 95: 1397 — 1404.
- Góral T., Ochodzki P., Nielsen L. K., Spliid N., H., Justesen A. F., Walentyn-Góral D., Jørgensen L. N. 2010. *Fusarium* species and mycotoxin conten in wheat samples collected in Poland in 2009. Book of abstracts 11th European *Fusarium* Seminar, 20-23.09.2010, Radzików, Poland: 167 — 168.
- Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Nielsen L. K., Justesen A. F., Jørgensen L. N. 2012. Wpływ przedplonu oraz warunków pogodowych na porażenie kłosów przez grzyby z rodzaju *Fusarium* oraz zawartość mikotoksyn w ziarnie. *Biul. IHAR* 265: 11 — 21.
- Guatam P., Dill-Macky R. 2007. *Fusarium* head blight infection and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in wheat. *Phytopathology* 97: 39.
- Hamzehzarghani H., Paranidharan V., Abu – Nada Y., Kushalappa A. C., Dion Y., Rioux S., Comeau A., Yaylayan V., Marshall W. D. 2008. Metabolite profiling coupled with statistical analyses for potential high-throughput screening of quantitative resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 30: 24 – 36.
- Hestbjerg H., Nielsen K. F., Thrane u., Elmoholt S. 2002. Production of trichothecenes and other secondary metabolites by *Fusarium culmorum* and *Fusarium equiseti* on common laboratory media and a soil organic matter agar: an ecological interpretation . *J. Agric. Food Chem.* 50: 7593 — 7599.
- Kiecana I. 1994. Badania nad fuzariozą kłosów jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) z uwzględnieniem podatności odmian i zawartości mikotoksyn w ziarnie. *Seria Wydaw. – Rozpr. Nauk. AR, Lublin*, 161: 1 – 49.
- Kiecana I., Mielniczuk E., Kaczmarek Z., Kostecki M., Goliński P. 2002. Scab response and moniliformin accumulation in kernels of oat genotypes inoculated with *Fusarium avenaceum* in Poland. *Europ. J. Plant Pathol.* 108: 245 – 251.
- Kiecana I., Mielniczuk E., Perkowski J., Goliński P. 2005. Porażenie wiech przez *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. oraz zawartość mikotoksyn w ziarnie owsa. *Acta Agrob.* 58 (2): 91 — 102.
- Kiecana I., Mielniczuk E., Cegiełko M., Szołkowska A. 2008. Grzyby porażające korzenie i podstawę źdźbła owsa (*Avena sativa* L.). *Biul. IHAR* 247: 73 — 79.
- Kiecana I., Cegiełko M., Mielniczuk E. 2009. Występowanie *Fusarium* spp. na życie ozimym (*Secale cereale* L.) i podatność różnych genotypów na porażenie przez *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. i *F. culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. *Biul. IHAR* 252: 151 — 161.
- Kiecana I., Mielniczuk E., Cegiełko M., Perkowski J. 2010. Panicles blight and biosynthesis of *Fusarium* toxins in oats kernels field inoculated with *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. 11th European *Fusarium* Seminar, 20–23 September 2010, Book of Abstracts: 281.
- Kiecana I., Cegiełko M., Mielniczuk E., Perkowski J. 2012. The occurrence of *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. on oat (*Avena sativa* L.) panicles and its harmfulness. *Acta Agrobot.* 65: 169 — 178.
- Kosiak B., Trop M., Skjerve E., Andersen B. 2004. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality-a matched pair sample study. *Int. J. Food Microbiol.*, 93/1: 51 — 62.
- Kosiak E. B., Holst-Jensen A., Runtberget T., Gonzales Jaen M. T., Torp M. 2005. Morphological, chemical and molecular differentiation of *Fusarium equiseti* isolated from Norwegian cereals. *Int. J. Food Microbiol.*, 99: 195 — 206.
- Kosiak B., Trop M., Skjerwe E., Thrane U. 2007. The prevalence and distribution of *Fusarium* species in Norwegian cereals: a survey. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* 53: 168 — 176.
- Langseth E., Hoie R., Gullord M., 1995. The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination in Norwegian oats 1985–1999. *Acta Agric. Scand., sect. B, Soil and Plant Sci.* 45: 63 — 67.

- Langseth W., Bernhoft A., Rundenberg T., Kosiak B., Gareis M. 1999. Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia* 144: 103 — 113.
- Logrieco A., Bottalico A., Mulé G., Moretti A., Perrone G., 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Europ. J. Plant Pathol.*, 109: 645 — 667.
- Madden L.V., Paul P.A. 2009. Assessing heterogeneity in the relationship between wheat yield and *Fusarium* head blight intensity using random-coefficient mixed models. *Phytopathology* 99, 7: 850 — 860.
- Majchrzak B., Kurowski T.P., Okorski A., 2008. Fungi isolated from the roots and stem bases of spring wheat grown after different cruciferous plants as forecrops. *Pol. J. Natur. Sci.* 23, 2: 299 — 309.
- Marin P., Moretti A., Ritieni A., Jurado M., Vazquez C., González-Jaén M.T. 2012. Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. *Food Microbiol.* 31: 229 — 237.
- Mesterházy A., Bartók T., Lamper C. 2003. Influence of Wheat Cultivar, Species of *Fusarium*, and Isolate Aggressiveness on the Efficacy of Fungicides for Control of *Fusarium* Head Blight. *Plant Dis.* 87, 9: 1107 — 1115.
- Mielniczuk E. 1999. Badania nad fuzariozą wiech owsa (*Avena sativa* L.) z uwzględnieniem podatności odmian i zawartości mikotoksyn w ziarnie. AR Lublin (rozprawa doktorska).
- Mielniczuk E. 2001. The occurrence of *Fusarium* spp. on panicles of oat (*Avena sativa* L.). *J. Plant Prot. Res.* 41, 2: 173 — 180.
- Mielniczuk E., Kiecana I., Perkowski J. 2004. Susceptibility of oat genotypes to *Fusarium crookwellense* Burgess, Nelson and Toussoun infection and mycotoxin accumulation in kernels. *Biologia, Bratislava* 59, 6: 809 — 816.
- Mishra C.B.P., Behr L. 1976. Der Einfluss von *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. und *Fusarium nivale* (Fr.) Ces., *Griphosphaeria nivalis* Müller et Arx auf die Keimung des Weizen. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* 12, 6: 373 — 377.
- Morrison E., Rundberget T., Kosiak B., Aastveit A. H., Bernhoft A. 2002. Cytotoxicity of trichothecenes and fusarochromanone produced by *Fusarium equiseti* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia* 153: 49 — 56.
- Moss M., Thrane H. 2004. *Fusarium* taxonomy with relations to trichothecene formation. *Toxicol. Lett.* 153: 23 — 28.
- Nielsen L. K., Jensen J. D., Nielsen G. C., Jensen J. E., Spliid N. H., Thomsen I.K., Justesen A. F., Collinge D. B., Jørgensen L. N. 2011. *Fusarium* Head Blight of Cereals in Denmark: Species Complex and Related Mycotoxins. *Phytopathology* 101, 8: 960 — 969.
- Stein J. M., Osborne L. E., Bondalapati K. D., Glover K. D., Nelson C. A. 2009. *Fusarium* head blight severity and deoxynivalenol concentration in wheat in response to *Gibberella zeae* inoculum concentration. *Phytopathology* 99, 6: 759 — 764.
- Tekauz A., McCallum B., Ames N., Mitchell Fetch J. 2004. *Fusarium* head blight of oat – current status in western Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 26, 4: 473 — 479.
- Tekle S., Dill-Macky R., Skinnes H., Tronsmo A. M., Bjørnstad A. 2012. Infection process of *Fusarium graminearum* in oats (*Avena sativa* L.). *Eur. J. Plant Pathol.* 132: 431 — 432.
- Yli-Mattila T. 2010. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in Northern Europe and Asia. *J. Plant Pathol.*, 92, 1: 7 — 18.
- Yli-Mattila T. 2011. Detection of Trichothecene-producing *Fusarium* Species in Cereals in Northern Europe and Asia. *Agronomy Res.* 9, II: 521 — 526.
- Żuk B., 1989. *Biometria stosowana*, PWN, Warszawa.

IRENA KIECANA
MAŁGORZATA CEGIELKO
ELŻBIETA MIELNICZUK
ALINA PASTUCHA

Katedra Fitopatologii i Mykologii
Uniwersytet Przyrodniczy, Lublin

Występowanie fuzariozy wiech owsa w 2013 roku oraz szkodliwość *Fusarium sporotrichioides* Sherb. dla wybranych odmian*

**Incidence of oat scab in 2013 and pathogenicity of *Fusarium sporotrichioides* Sherb.
to selected cultivars**

W 2013 roku na polach Hodowli Roślin Strzelce, Sp. z o.o., grupa IHAR określono udział wiech z objawami fuzariozy dla 12 odmian owsa. W laboratorium przeprowadzono analizę mykologiczną ziarniaków i plew pochodzących z wiech z objawami chorobowymi z wykorzystaniem pożywki mineralnej. Procent wiech z objawami fuzariozy wahał się od 0,25% do 2,0%. Za główną przyczynę fuzariozy wiech owsa uznano gatunki *Fusarium culmorum* i *F. poae*. Ponadto z porażonych ziarniaków uzyskiwano gatunki *F. sporotrichioides* i *F. oxysporum*. Badania szkodliwości *F. sporotrichioides* dla owsa przeprowadzono w 2013 roku na polach doświadczalnych w okolicach Zamościa, na podstawie ścisłego doświadczenia polowego ze sztucznym zakażaniem wiech w fazie kwitnienia. Materiał infekcyjny stanowiła zawiesina zarodników *F. sporotrichioides* nr 88 o zagęszczeniu $5 \times 10^5 \times 1 \text{ ml}^{-1}$. Szkodliwość *F. sporotrichioides* dla analizowanych odmian owsa określano na podstawie ubytku liczby ziarniaków w wieszce, plonu ziarna z 40 wiech (4×10 wiech) oraz masy 1000 ziaren. Ubytek liczby ziarniaków w wieszce, w wyniku sztucznego zakażenia przez *F. sporotrichioides* wynosił od 0,5% (Arden) do 75,1% (Contender). W przypadku odmiany Arden nie zanotowano ubytku plonu ziarna w wyniku inokulacji wiech przez *F. sporotrichioides*, zaś u pozostałych odmian redukcja plonu ziarna wynosiła od 24,0% (Komfort) do 79,5% (Contender). Natomiast obniżka MTZ wynosiła od 0,1% (Arden) do 22,6% (Flämingsgold).

Słowa kluczowe: *Avena sativa* L., *Fusarium sporotrichioides*, fuzarioza wiech, odmiany, owies

The incidence of panicles with scab symptoms was assessed in 12 oat cultivars in the fields of Strzelce Plant Breeding Company IHAR group in 2013. The mycological analysis of grain and chaff separated from panicles with disease symptoms was made in the laboratory using a mineral medium.

* Praca przedstawiona na konferencji IHAR — PIB, Zakopane, 3 lutego 2015 roku

Redaktor prowadzący: Henryk J. Czembor

The percentage of panicles with scab symptoms ranged from 0.25% to 2.0%. The species *Fusarium culmorum* and *F. poae* were the main causal agents of *Fusarium* oat scab. *Fusarium sporotrichioides* and *F. oxysporum* were also isolated from infected kernels. A study of pathogenicity of *F. sporotrichioides* to oat was carried out in the experimental plots in Zamość region (southeastern Poland). Oat panicles were inoculated during flowering. The infectious material was a suspension of conidia of *F. sporotrichioides* no. 88 with a density of 5×10^5 spores per 1 ml. The pathogenicity of *F. sporotrichioides* to analyzed oat genotypes was determined on the basis of the reduction in the number of kernels per panicle, kernels yield from 40 panicles (4×10 panicles) and 1000 kernels weight. The reduction in the number of kernels in panicle as a result of inoculation of panicles with *F. sporotrichioides* ranged from 0.5% (Arden) to 75.1% (Contender). In the case of cv. Arden the reduction in kernels yield was not detected and in the case of other cultivars it ranged from 24.0% (Komfort) to 79.5% (Contender). The reduction in 1000 kernels weight ranged from 0.1% (Arden) to 22.6% (Flämingsgold).

Key words: *Avena sativa* L., cultivars, *Fusarium sporotrichioides* oat, scab

WSTĘP

Fuzarioza wiech owsa uprawianego w Polsce występuje powszechnie i w zależności od warunków pogodowych procent porażonych wiech jest różny (Kiecana i Perkowski, 1998; Mielniczuk, 2001; Kiecana i in., 2012). W warunkach południowo-wschodniej Polski przyczyną fuzariozy wiech okazały się gatunki *Fusarium avenaceum* i *F. poae*, natomiast w rejonie centralnej i zachodniej Polski wiechy owsa porażane były przez *F. poae*, *F. culmorum* i *F. avenaceum*. Spośród innych gatunków z rodzaju *Fusarium* na porażonych wiechach stwierdzono *F. crookwellense*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides* i *F. oxysporum* (Kiecana i Perkowski, 1998; Mielniczuk, 2001; Mielniczuk i in., 2004; Kiecana i in., 2012).

W innych rejonach uprawy fuzariozę wiech owsa najczęściej powodują: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. tricinctum* i *F. graminearum* (Heave, 1985 wg Langseth i in., 1995; Tekauz i in., 2004; Desjardins, 2006; Tekle i in., 2012; Martinelli i in., 2014).

W porażaniu wiech owsa w Szwecji i Finlandii oraz Norwegii dużą rolę odgrywa *F. langsethiae* (Fredlund, 2009 wg Yli-Mattila, 2010; Nilsen i in., 2010).

Fusarium poae zasiedlając ziarniaki nie wpływa istotnie na zmianę wyglądu zewnętrznego ziarniaków oraz nie obniża ich zdolności kiełkowania, w warunkach epidemii może natomiast wpłynąć na zmniejszenie liczby ziarniaków i słabszy ich rozwój (Schipilova i Gagkaeva, 1997; Kiecana i in., 2005). Gatunek ten po raz pierwszy opisał w 1902 roku amerykański mykolog Charles H. Peck jako *Sporotrichum poae*, natomiast H. W. Wollenweber w 1913 roku włączył go do rodzaju *Fusarium*. W porażonych ziarniakach owsa *F. poae* produkuje związki trichotecenowe z grupy A: HT-2 toksynę, diacetoksyscirpenol (DAS), T-2 tetraol, scirpentriol (STO) oraz trichoteceny z grupy B: niwalenol (NIV), deoksyniwalenol (DON), 3-AcDON i 15-AcDON (Langseth i in., 1997; Kiecana i Perkowski, 1998; Kiecana i in., 2012).

Na uwagę zasługuje gatunek *F. culmorum*, który po raz pierwszy został opisany w 1884 roku przez brytyjskiego mykologa Worthingtona G. Smitha jako *Fusisporium culmorum*, natomiast w roku 1895 włoski mykolog Piers A. Saccardo przeniósł tego grzyba do rodzaju *Fusarium*. Gatunek ten notowany był na ziarnie owsa uprawianym w rejonie centralnej i

zachodniej Polski (Mielniczuk i in., 2010). *Fusarium culmorum* w porażonym ziarnie wytwarza DON i jego acetylowe pochodne, NIV oraz zearalenon (ZEA). Grzyb ten może produkować również aurofuzarynę, butenolid, chlamydosporol, culmoryn, cyklonerodiol, fuzarynę C, chryzoginę i moniliforminę (Desjardins, 2006).

Fusarium sporotrichioides Sherb. po raz pierwszy opisał Constantine D. Sherbakoff w 1915 roku, po wyizolowaniu tego grzyba z bulw ziemniaka. Na wiechach i ziarnie owsa gatunek ten był notowany na Lubelszczyźnie (Kiecana i Perkowski, 1998; Mielniczuk, 2001; Mielniczuk i in., 2010; Kiecana i in., 2005; 2012). Gatunek *F. sporotrichioides* w optymalnych dla siebie warunkach może tworzyć toksyny należące do trichotecenów z grupy A, takie jak: diacetoksycirpenol (DAS), 4-monoacetoksycirpenol (4-MAS), HT-2 toksyna, T-2 toksyna, Ac T-2, 8-Ac T-2, 3-hydroxy T-2, 4-Ac tetraol i 15-Ac tetraol, scirpentriol (STO), T-2 triol, neosolaniol (NEO) (Kiecana, 2012; Perkowski i in., 2003; Nielsen i in., 2011; Wiśniewska i in., 2011). Ponadto gatunek ten wytwarza: aurofuzarynę, beauwerycyne, butenolid, culmoryn, enniatyny, fuzaryny i moniliforminę (Thrane i in., 2004 wg Desjardins, 2006; Desjardins, 2006).

Pierwotnymi źródłami inokulum grzybów wywołujących fuzariozę wiech są ziarno (Kiecana i Perkowski, 1998; Mielniczuk i in., 2010) oraz resztki pozbiorowe (Sitton i Cook, 1981 wg Losa i in., 1994).

W związku z wprowadzaniem do uprawy nowych genotypów owsa, podjęto badania nad występowaniem fuzariozy wiech owsa uprawianego w centralnej Polsce oraz ustaleniem szkodliwości gatunku *Fusarium sporotrichioides* dla wybranych odmian.

MATERIAŁ I METODY

Udział wiech z objawami fuzariozy określono w 2013 roku na polach Hodowli Roślin Strzelce, Sp. z o.o., grupa IHAR. Wykaz odmian przedstawiono na rysunku 1. Występowanie fuzariozy badano w fazie dojrzałości pełnej ziarna (93 w skali Zadoksa wg Tottmana, 1987). Materiał do badań stanowiło 100 wiech zebranych z czterech miejsc na poletku, czyli razem analizowano po 400 wiech każdego genotypu. Określano liczbę wiech z objawami fuzariozy. Dla każdej odmiany pobierano do badań laboratoryjnych po 20 porażonych wiech. W laboratorium wydzielano z pobranych wiech ziarniaki i plewy, aby wyizolować grzyby sposobem opisanym wcześniej przez Kiecanę i współautorów (2012), używając pożywki mineralnej (Mielniczuk i in., 2010). Analizowano po 100 ziarniaków i 100 plew dla każdego genotypu.

Grzyby z rodzaju *Fusarium* identyfikowano według kluczy i monografii podanych w pracy Kiecana i Mielniczuk (2010).

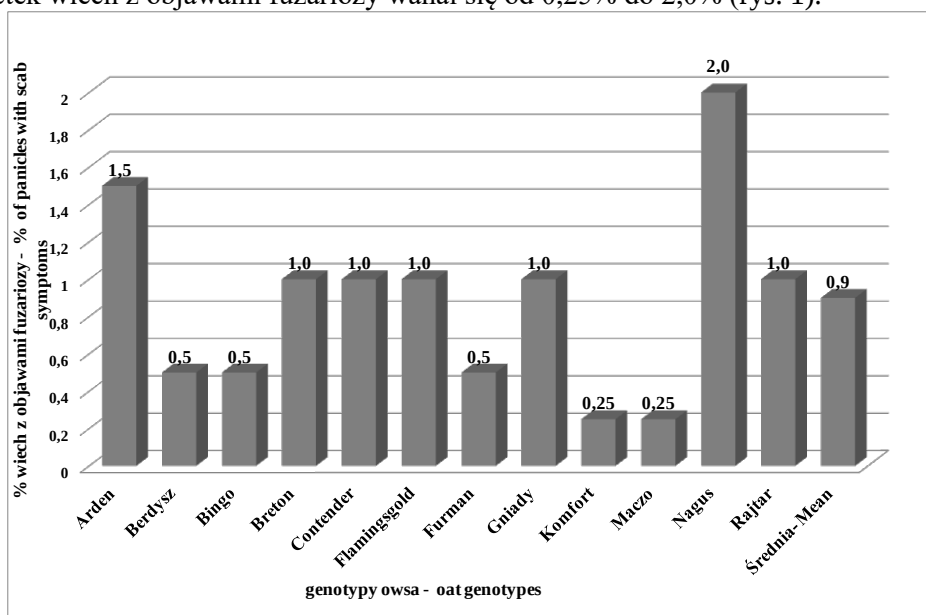
Ścisłe doświadczenie z inokulacją wiech przeprowadzono w 2013 roku na polach doświadczalnych k. Zamościa, na glebie brunatnej, wylugowanej, wytworzonej na utworach lessowych. Objęto nimi 12 odmian owsa (tab. 1) oraz szczep *F. sporotrichioides* nr 88 o chorobotwórczości sprawdzonej metodą Mishry i Behra (1976). Rośliny, których wiechy inokulowano oraz rośliny kontrolne wzrastały na poletkach o powierzchni 10 m². Pomiędzy poletkami znajdowały się pasy ochronne o szerokości 1 m oraz 50 cm ścieżki.

Materiał infekcyjny przygotowano wg Mesterházego (1978), przy czym modyfikacją była hodowla grzyba na pożywce SNA, przygotowanej na wywarze z liści owsa (Kiecana i in., 2002). Sposób zakażenia wiech w polu był taki sam jak w przypadku owsa (Kiecana i in., 2012). Materiał infekcyjny stanowiła zawiesina zarodników *F. sporotrichioides* nr 88 o zagęszczeniu $5 \times 10^5 \times 1 \text{ ml}^{-1}$. Inokulacji wiech dokonano w fazie kwitnienia, co przypadało na 3 lipca 2013 r. Materiałem infekcyjnym grzyba zakażano po 80 wiech każdej odmiany, uznając za jedno powtórzenie 20 wiech. Inokulację przeprowadzono przy pomocy rozpylacza ogrodniczego, używając 4 ml materiału infekcyjnego na 1 wiechę. Kontrolę stanowiły wiechy opryskiwane tylko sterylną wodą destylowaną. Po zakażeniu wiechy okrywano osłonami foliowymi i tym sposobem przez 48 godzin chroniono materiał zakaźny przed prądami powietrza i wysychaniem.

W fazie dojrzałości pełnej ziarna wiechy zainokulowane i kontrolne ścinano, a następnie wydzielano ziarniaki. Określano liczbę ziarniaków w 40 wiechach (4×10 wiech), plon uzyskanego z nich ziarna oraz masę 1000 ziaren. Wyniki opracowano statystycznie przy pomocy analiz wariancji oraz wielokrotnych półprzedziałów ufności T-Tukeya. Najmniejsze istotne różnice T-Tukeya obliczono dla poziomu istotności $\alpha \leq 0,05$ (Żuk, 1989).

WYNIKI

Obserwacje polowe przeprowadzone w fazie dojrzałości pełnej ziarna na polach Hodowli Roślin Strzelce wykazały występowanie roślin z objawami fuzariozy wiech. Odsetek wiech z objawami fuzariozy wahał się od 0,25% do 2,0% (rys. 1).



Rys. 1. Procentowy udział wiech owsa z objawami fuzariozy w 2013 roku
Fig. 1. Percentage of oat panicles with scab symptoms in 2013

W wyniku analizy mikologicznej ziarniaków i plew, pochodzących z wiech z objawami fuzariozy uzyskano 2376 izolatów grzybów (tab. 1). Grzyby z rodzaju *Fusarium* uzyskane z ziarniaków i plew stanowiły 35,53% ogółu wyosobnień z ziarniaków i plew i były reprezentowane przez: *F. culmorum* (44,3% wszystkich *Fusarium* spp.), *F. poae* (44,1%), *F. sporotrichioides* (9,0%) i *F. oxysporum* (2,6%) (tab. 1). Kolonie innych grzybów należały do: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Epicoccum nigrum* oraz form niezarodnikujących, których izolaty stanowiły odpowiednio: 48,82%, 0,67%, 14,39%, 0,59% wszystkich uzyskanych kolonii grzybów (tab. 1).

Tabela 1

Gatunki grzybów wyizolowane z ziarniaków i plew owsa w 2013 roku
Fungi species isolated from oat kernels and chaff in 2013

Gatunki grzybów Fungi species	Liczba izolatów Number of isolates		Ogółem (%) Total (%)
	ziarniaki — kernels	plewy — chaff	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	514	646	1160 (48,82)
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	16	-	16 (0,67)
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	142	200	342 (14,39)
<i>Fusarium culmorum</i> (W. G. Sm.) Sacc.	146	228	374 (15,74)
<i>Fusarium oxysporum</i> Schl.	14	8	22 (0,93)
<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wpplenw.	260	112	372 (15,66)
<i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb.	76	-	76 (3,20)
Formy niezarodnikujące	8	6	14 (0,59)
Razem	1176	1200	2376 (100)
Total			

Sztuczne zakażenie wiech szczepem *F. sporotrichioides* nr 88 było skuteczne i wiechy wykazywały objawy przedwczesnego zbielenia kłosek. Ziarniaki pochodzące z wiech inokulowanych były drobne, lekkie i miękkie. Pozyskane w tym czasie ziarniaki z wiech kontrolnych były normalnie zabarwione i wykształcone. Sztuczne zakażenie wiech przez *F. sporotrichioides* wpłynęło istotnie na obniżenie liczby ziarniaków w wiesze w porównaniu do kontroli u 10 odmian owsa, wyjątek stanowiły odmiany Arden i Flamingsgold (tab. 2). Istotne różnice w plonie ziarna zanotowano u 8 analizowanych genotypów owsa (tab. 2), natomiast istotną obniżkę masy 1000 ziaren w porównaniu do kontroli u 4 odmian owsa: Berdysz, Contender, Flamingsgold i Gniady (tab. 2).

Przeprowadzone badania wykazały, że procentowy ubytek liczby ziarniaków w wiesze w wyniku sztucznego zakażenia przez *F. sporotrichioides* wynosił od 0,5% (Arden) do 75,1% (Contender) (tab. 2). W przypadku odmiany Arden nie zanotowano ubytku plonu ziarna w wyniku inokulacji wiech przez badany gatunek grzyba, zaś u pozostałych odmian redukcja plonu ziarna wynosiła od 24,0% (Komfort) do 79,5% (Contender) (tab. 2). Natomiast obniżka masy 1000 ziaren w porównaniu do kontroli, kształtowała się na poziomie od 0,1% (Arden) do 22,6% (Flamingsgold) (tab. 2).

W okolicach Strzelec okres wegetacji 2013 charakteryzował się temperaturą wyższą w porównaniu ze średnią wieloletnią w kwietniu, czerwcu, lipcu i sierpniu od +0,1°C do +2,4°C. W maju 2013 roku temperatura powietrza była równa średniej wieloletniej, zaś w marcu tego roku była mniejsza od średniej wieloletniej o 6,5°C (tab. 3).

Tabela 2

Wpływ sztucznego zakażenia wiech owsa przez *Fusarium sporotrichioides* na liczbę ziarniaków w wiesze, plon ziarna z 10 wiech, masę 1000 ziaren
Effect of inoculation of oat panicles with *Fusarium sporotrichioides* on the number of kernels per panicle, grain yield per 10 panicles and 1000 grain weight

Genotypy owsa Oat genotypes	Średnia liczba ziarniaków w wiesze Average number of kernels per panicle		% kontroli % of the control	Średni plon ziarna z 10 wiech Average kernels yield per 10 panicles (g)		% kontroli % of the control	Średnia masa 1000 ziaren Average 1000 kernels weight (g)		% kontroli % of the control
	F.	kontrola		F.	kontrola		F.	kontrola	
	<i>sporotrichioides</i>	control		<i>sporotrichioides</i>	control		<i>sporotrichioides</i>	control	
Arden	42,28	42,48	0,5	13,92	13,92	0,0	30,00	30,03	0,1
Berdysz	31,18*	69,25	55,0	8,47*	23,32	63,7	27,00*	33,68	19,8
Bingo	38,90*	59,10	34,2	12,42*	20,38	39,1	31,93	34,48	2,9
Breton	42,23*	66,10	36,1	13,01*	22,50	42,3	30,81	34,13	9,7
Contender	18,40*	73,83	75,1	5,64*	27,49	79,5	30,65*	37,24	17,7
Flamingsgold	48,58	54,83	11,4	16,35	23,83	31,4	33,66*	43,47	22,6
Furman	36,85*	67,43	45,4	10,32*	19,77	47,8	28,00	29,32	4,5
Gniady	15,00*	53,30	71,9	3,88*	16,40	76,3	25,87*	30,77	15,9
Komfort	38,75*	50,70	23,6	13,83	18,18	24,0	35,69	35,86	0,5
Maczo	30,48*	50,63	39,8	8,90	11,79	24,5	26,20	27,29	4,0
Nagus	32,03*	52,80	39,4	7,74*	13,16	41,2	24,17	24,92	3,0
Rajtar	32,08*	95,70	66,5	11,61*	33,72	65,6	36,20	36,75	1,5
Średnia Mean	33,89	61,34	41,6	10,51	20,24	44,6	30,02	33,16	8,5

*średnie różnią się istotnie w porównaniu do kontroli przy $P \leq 0,05$

*compared to the control, the means differ significantly at $P \leq 0.05$

Procent normy opadów w 2013 roku był większy w porównaniu ze średnią wieloletnią w marcu, maju i czerwcu odpowiednio o: 20%, 90,9% i 85,7%. Natomiast w kwietniu, lipcu i sierpniu opady były mniejsze od średniej wieloletniej i wynosiły odpowiednio: 90%, 56,12% i 71,43% normy (tab. 3).

Tabela 3

Warunki pogodowe w Strzelcach w roku 2013
Weather conditions in Strzelce in the year 2013

Miesiąc Month	Średnie wieloletnie dla lat 1971–2000 Long term mean for 1971–2000		Odchylenia temperatury powietrza Air temperature deviation	Procent normy opadów Percentage of long term mean precipitation
	temperatura powietrza air temperature (°C)	opady precipitation (mm)		
III	3,5	35,0	-6,5	120,0
IV	7,2	40,0	+0,1	90,0
V	14,0	55,0	0,0	190,9
VI	16,0	70,0	+1,0	185,7
VII	17,6	98,0	+2,4	56,12
VIII	17,0	70,0	+1,5	71,43

DYSKUSJA

Wyniki badań przeprowadzonych w 2013 roku wykazują, że fuzarioza wiech owsa w centralnej Polsce na polach Hodowli Roślin Strzelce wystąpiła na każdej analizowanej

odmianie, przy czym udział porażonych wiech nie przekroczył 2,0%. W tych samych warunkach uprawy wykazano podobną częstotliwość w porażaniu przez grzyby z rodzaju *Fusarium* wiech owsa w 2006 roku, natomiast większy odsetek do 9% porażonych wiech owsa notowano w 2007 roku (Kiecana i in., 2012) oraz w latach 1996-1999 w uprawach owsa na Lubelszczyźnie (Mielniczuk, 2001).

Wyniki potwierdziły dotychczasowe krajowe doniesienia, że fuzariozę wiech owsa, podobnie jak i innych zbóż powodują *Fusarium culmorum* i *F. poae* (Kiecana, 1994; Mielniczuk, 2001; Wiśniewska i in., 2004; Wiśniewska, 2005; Kiecana i in., 2012). Te ustalenia są również zgodne z wynikami badaczy europejskich (Langseth i in., 1995; Parry i in., 1995; Bottalico i Perrone, 2002; Tekle i in., 2012), z Ameryki Północnej (Tekauz i in., 2004; Desjardins, 2006), Ameryki Południowej (Martinelli i in., 2014).

Udział poszczególnych gatunków z rodzaju *Fusarium* determinują warunki pogody. Według Kiecany (1994) ciepła pogoda z przelotnymi opadami deszczu jest szczególnie korzystna dla porażenia kłosów przez *Fusarium culmorum*. W przypadku prowadzonych badań takie warunki pogodowe wystąpiły w maju i czerwcu i nimi należy wyjaśnić największy udział wymienionego gatunku w porażaniu wiech owsa w tym sezonie wegetacji. W różnych warunkach uprawy *Fusarium culmorum* jest uznany za częstą przyczynę fuzariozy kłosów zbóż uprawianych w Europie (Parry i in., 1995; Goliński i in., 2002; Korbas i Ławecki, 2003; Vanco i in., 2007; Klix i in., 2008; Chełkowski i in., 2010; Kiecana i Mielniczuk, 2010; Yli-Mattila, 2010; Góral i in., 2012). W Polsce ustalono, że *Fusarium culmorum* ma ponadto znaczny udział w porażaniu korzeni i podstawy źdźbła owsa (Truszkowska i in., 1988; Kiecana i Mielniczuk, 2001; Kiecana i in., 2003; 2008).

Gatunkiem często izolowanym z wiech analizowanych odmian owsa okazał się *Fusarium poae*. Procentowy udział gatunku *Fusarium poae* w wywoływaniu fuzariozy kłosów i wiech oraz kolb kukurydzy ulega zmianie w zależności od warunków pogodowych (Mielniczuk, 2001; Arseniuk i Góral, 2005; Logrieco i in., 2003; Kiecana i Mielniczuk, 2010; Kiecana i in., 2012). *Fusarium poae* zwykle występuje w rejonach chłodniejszych (Doohan i in., 2003). Według doniesień z literatury wiadomo, że gatunek ten może także porażać kłosa zbóż uprawianych w rejonach o gorącym i suchym klimacie (Xu i in., 2008). Według Parrego i współautorów (1995) optymalną temperaturą dla infekcji kłosów przez *F. poae* jest 25°C, chociaż do zakażenia może dochodzić już w temperaturze 15°C i podwyższonej wilgotności. W przypadku prowadzonych badań temperatura ok. 20°C w fazie kwitnienia i podwyższona wilgotność sprzyjały rozwojowi tego grzyba na wiechach.

Podobnie jak w przypadku innych zbóż, na ziarnie i plewach owsa spotykano często gatunek *Alternaria alternata* (Kiecana, 1994; Muthomi i in., 2008; Mielniczuk i in., 2010). Grzyb ten produkuje różne wtórne metabolity o działaniu zootoksycznym i fitotoksycznym, między innymi kwas tenauzonowy i tentoksynę (Thomma, 2003).

Epicoccum nigrum jest często izolowany z ziarniaków różnych zbóż, w tym owsa (Kiecana, 1994; Kurowski i Wysocka, 2009; Mielniczuk i in., 2010). Gatunek ten wykazuje działanie antagonistyczne w stosunku do grzybów rozprzestrzeniających się z materiałem siewnym, takich jak np. *Botrytis cinerea* i *Colletotrichum gloeosporioides* (Pascual i in., 2002). *Epicoccum nigrum* jest antagonistą wielu patogenów, między innymi *B. cinerea*,

Rhizoctonia solani, czy *Bipolaris sorokiniana* (Zhou i Reeleder, 1989). Obecność na ziarnie owsa gatunku polifagicznego, jakim jest *Botrytis cinerea*, była prawdopodobnie spowodowana stymulującym działaniem pyłku na kiełkowanie zarodników, co umożliwiło zakażenie wiech w fazie kwitnienia. Do takiej interpretacji upoważniają badania Pokackiej (1987) dotyczące żyta. W zainfekowanych tkankach roślin *B. cinerea* wytwarza fitotoksynę o nazwie botrydial (Deighton i in., 2001 wg Elad i in., 2007).

Do badań różnych aspektów fuzariozy kłosów i wiech dobiera się najbardziej skuteczne sposoby zakażenia (Takeda i Heta, 1989; Mielniczuk i in., 2004; Kiecana i in., 2006). W prezentowanych badaniach wiechy owsa opryskiwano zawiesiną mikrokonidiów *Fusarium sporotrichioides*, uznając ten sposób za najbardziej odpowiadający naturalnej infekcji. Uwzględniając zróżnicowaną wirulencję szczepów w obrębie populacji testowanego gatunku (Kiecana, 1994), materiał infekcyjny przygotowano ze szczepu *F. sporotrichioides* o sprawdzonej chorobotwórczości metodą Mishry i Behra (1976).

Z przeprowadzonych testów w warunkach doświadczenia polowego wynika, że zakażenie wiech przez *F. sporotrichioides* w fazie kwitnienia wpływa na zmniejszenie liczby i słabsze wykształcanie ziarniaków. Zmniejszenie plonu z obsianej powierzchni zależy od procentowego udziału drobnych ziarniaków w wiesze oraz udziału porażonych wiech w łanie. W przypadku porażenia wiech przez *F. sporotrichioides* plon ziarna z wiech z objawami fuzariozy obniżył się przeciętnie o 44,6%. Okazało się, że fuzarioza wiech owsa, powodowana przez *F. sporotrichioides* w większym stopniu wpłynęła na zmniejszenie plonu ziarna aniżeli w przypadku tej choroby powodowanej przez *F. culmorum* (Perkowski i Kiecana, 1997) oraz fuzariozy kłosów jęczmienia jarego powodowanej przez *F. sporotrichioides* (Kiecana, 1994).

WNIOSKI

1. Duże zagrożenie dla wiech owsa uprawianego w warunkach centralnej Polski stanowią gatunki *F. culmorum* i *F. poae*.
2. Ze względu na uznaną dużą szkodliwość *F. culmorum* i *F. poae* dla zbóż, należy uwzględnić te patogeny w hodowli odmian owsa przygotowywanych do uprawy w Polsce.
3. Toksynotwórczy gatunek *F. sporotrichioides* zasługuje na uwagę ze względu na występowanie na materiale siewnym owsa i zdolność do obniżania plonu ziarna.

LITERATURA

- Arseniuk E., Góral T. 2005. Mikotoksyny fuzaryjne w ziarnie zbóż i kukurydzy. / *Fusarium* mycotoxins in cereal and maize grain. Hodowla Roślin i Nasiennictwo 3: 27 — 33.
- Bottalico A., Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. Eur. J. Plant Pathol. 108: 611 — 624.
- Chełkowski J., Stępień Ł., Gromadzka K., Kostecki M., Sadowski C. 2010. *Fusarium* head blight of wheat in 2009 - species frequencies and metabolites in grain. Book of abstracts. 11th European *Fusarium* seminar- *Fusarium* – Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance: 153 — 154.
- Doohan F. M., Brennan J., Cook B. M. 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereal. Eur. J. Plant Pathol. 109: 755 — 768.

- Desjardins A. E. 2006. *Fusarium* mycotoxins, chemistry, genetics, and biology. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, U.S.A.
- Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delan N. 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Netherlands, Springer.
- Goliński P., Kaczmarek Z., Kiecana I., Wiśniewska H., Kaptur P., Kostecki M., Chełkowski J. 2002. *Fusarium* head blight of common Polish winter wheat cultivars comparison of effects of *Fusarium avenaceum* and *Fusarium culmorum* on yield components. J. Phytopathology 150: 135 — 141.
- Góral T., Ochodzki P., Bulińska-Radomska Z. 2012. Odporność na fuzariozę kłosów powodowaną przez *Fusarium culmorum* i zawartość mikotoksyn fuzaryjnych w ziarnie gatunków zbóż jarych przeznaczonych do upraw ekologicznych. Biul. IHAR 263: 43 — 54.
- Kiecana I. 1994. Badania nad fuzariozą jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) z uwzględnieniem podatności odmian i zawartości mikotoksyn w ziarnie. Seria Wydaw. – Rozpr. Nauk. AR Lublin 161: 1 — 49.
- Kiecana I. 2012. Szkodliwość wybranych gatunków grzybów dla zbóż z uwzględnieniem ich właściwości toksynotwórczych. Warsztaty Naukowe – Patogeny roślinne problemem rolnictwa i przetwórstwa. IUNG PIB Puławy. 21.06. 2012: 29 — 31.
- Kiecana I., Perkowski J. 1998. Zasiadlenie ziarna owsa (*Avena sativa* L.) przez toksynotwórcze grzyby *Fusarium poae* (Peck) Wr. i *Fusarium sporotrichioides* Sherb. Zesz. Nauk. AR im. H. Kołłątaja. Kraków 333: 881 — 884.
- Kiecana I., Mielniczuk E. 2001. Występowanie *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. oraz *Fusarium crookwellense* Burges, Nelson & Toussoun na rodach hodowlanych owsa (*Avena sativa* L.). Acta Agrobot. 54, 1: 83 — 93.
- Kiecana I., Mielniczuk E. 2010. *Fusarium* head blight of winter rye (*Secale cereale* L.). Acta Agrobot. 63, 1: 129 — 135.
- Kiecana I., Mielniczuk E., Kaczmarek Z., Kostecki M., Goliński P. 2002. Scab response and moniliformin accumulation in kernels of oat genotypes inoculated with *Fusarium avenaceum* in Poland. Eur. J. Plant Pathol. 108: 245 — 251.
- Kiecana I., Mielniczuk E., Cegiełko M., Pszczółkowski P. 2003. Badania nad chorobami podsuszkowymi owsa (*Avena sativa* L.) z uwzględnieniem temperatury i opadów. Acta Agrobot. 56, 1-2: 95 — 107.
- Kiecana I., Mielniczuk E., Perkowski J., Goliński P. 2005. Porażenie wiech przez *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. oraz zawartość mikotoksyn w ziarnie owsa. Acta Agrobot. 58, 2: 91 — 102.
- Kiecana I., Mielniczuk E., Cegiełko M. 2006. Badania podatności kłosów pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) na porażenie przez *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. Acta Agrophysica 8, 3: 629 — 636.
- Kiecana I., Mielniczuk E., Cegiełko M., Szolkowska A. 2008. Grzyby porażające korzenie i podstawę źdźbła owsa (*Avena sativa* L.). Biul. IHAR 247: 73 — 79.
- Kiecana I., Cegiełko M., Mielniczuk E., Perkowski J. 2012. The occurrence of *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. on oat (*Avena sativa* L.) panicles and its harmfulness. Acta Agrobot. 65, 4: 169 — 178.
- Klix M. B., Beyer M., Verreet J. A. 2008. Effects of cultivar, agronomic practices, geographic location, and meteorological conditions on the composition of selected *Fusarium* species on wheat heads. Can. J. Plant Pathol. 30: 46 — 57.
- Korbas M., Ławecki T. 2003. Możliwości ograniczania fuzariozy kłosów w Polsce i Unii Europejskiej. Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 43: 200 — 207.
- Kurowski T. P., Wysocka U. 2009. Fungi colonizing grain of winter spelt grown under two production systems. Phytopathologia 54: 45 — 52.
- Langseth W., Hoike R., Gullord M. 1995. The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination in Norwegian oats 1985–1990. Acta Agric. Scand., Sect B., Soil and Plant Sci. 45: 63 — 67.
- Langseth W., Sundheim L., Liu W. 1997. Vegetative compatibility groups and trichothecene production in *Fusarium poae*. Cer. Res. Comm. 25, 3/2: 561 — 563.
- Logrieco A., Bottalico A., Mule G., Moretti A., Perrone G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. Eur. J. Plant Pathol. 109: 645 — 667.
- Los O., Bard S. W., Marasas W. F. O., Burgess S. A. 1994. The effect of crop rotation with wheat and oats the incidence of *Fusarium* crown rot of wheat. S. Afr. J. Plant Soil 11, 4: 170 — 177.

- Martinelli J. A., Chaves M. S., Graichen F. A. S., Federizzi L. C., Dresch L.F. 2014. Impact of *Fusarium* head blight in reducing the weight of oat grains. *J. Agric. Science* 6, 5: 188 — 198.
- Mesterházy Á. 1978. Comparative analysis of artificial inoculation methods with *Fusarium* spp. on winter wheat varieties. *Phytopathol. Z.* 93, 1: 12 — 25.
- Mielniczuk E. 2001. The occurrence of *Fusarium* spp. on panicles of oat (*Avena sativa* L.). *J. Plant Prot. Res.* 41, 2: 173 — 180.
- Mielniczuk E., Kiecana I., Perkowski J. 2004. Susceptibility of oat genotypes to *Fusarium crookwellense* Burges, Nelson, Toussoun infection and mycotoxin accumulation in kernels. *Biologia Bratislava* 59, 6: 809 — 816.
- Mielniczuk E., Kiecana I., Cegiëlko M., Werwińska K. 2010. Grzyby zasiedlające materiał siewny owsa (*Avena sativa* L.). *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 556, 879 — 890.
- Mishra C. B. P., Behr L. 1976. Der Einfluss von Kulturfiltraten von *Fusarium culmorum* W. G. Sm.) Sacc., *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. und *Fusarium nivale* (Fr.) Ces., *Griphosphaeria nivalis* Müller et v. Arx auf die Keimung des Weizen. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* 12, 6: 373 — 377.
- Muthomi J. W., Ndung U. J., Gathumbi J. K., Mutitu F. W., Wagacha J. M. 2008. The occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Kenyan wheat. *Crop Protection* 27, 98: 1215 — 1219.
- Nielsen L. K., Jensen J. D., Justesen A. F., Jørgensen L. N. 2010. Cereal species preferences of the FHB complex in Denmark. 11th European *Fusarium* Seminar “*Fusarium* – Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance”. 20-23 September, Radzików, Poland: 189.
- Nielsen L. K., Jensen J. D., Nielsen G. C., Jensen J. E., Spliid N. H., Thomsen I.K., Justesen A. F., Collinge D. B., Jørgensen L. N. 2011. *Fusarium* Head Blight of Cereals in Denmark: Species Complex and Related Mycotoxins. *Phytopathology* 101, 8: 960 — 969.
- Parry D. W., Jenkinson P., McLeod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathol.* 44: 207 — 238.
- Pascual S., Melgajero P., Magan N. 2002. Water availability affects the growth, accumulation of compatible solutes and the viability of the biocontrol agent *Epicoccum nigrum*. *Mycopathologia* 156: 93 — 100.
- Perkowski J., Kiecana I. 1997. Reduction of yield and mycotoxins accumulation in oats cultivars after *Fusarium culmorum* inoculation. *Cer. Res. Comm.* 25, 3/2: 801 — 803.
- Perkowski J., Kiecana I., Kaczmarek Z. 2003. Natural occurrence and distribution of *Fusarium* toxins in contaminated barley cultivars. *European J. Plant Pathol.* 109: 331 — 339.
- Pokacka Z. 1987. Badania nad mikoflorą ziarna żyta roślin opryskiwanych i nie opryskiwanych fungicydami. *Pr. Nauk. Inst. Ochr. Rośl.* 29, 1: 93 — 108.
- Schipilova N.P., Gagkaeva T. Y. 1997. The forms of manifestation of *Fusarium* head blight on the seeds and heads of cereal crops. *Cer. Res. Comm.* 25, 2/3: 815 — 816.
- Takeda K., Heta H. 1989. Establishing the testing method and a search for the resistant varieties to *Fusarium* head blight in barley. *Jap. J. Bread.* 39: 209 — 216.
- Tekauz A., McCallum B., Ames N., Mitchell Fetch J. 2004. *Fusarium* head blight of oat – current status in western Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 26, 4: 473 — 479.
- Tekle S., Dill-Macky R., Skinnies H., Tronsmo A. M., Bjørnstad Á. 2012. Infection process of *Fusarium graminearum* in oats (*Avena sativa* L.). *J. Plant Pathol.* 132: 431 — 442.
- Thomma P. H. J. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.* 4, 4: 225 — 236.
- Truszkowska W., Dąbkowska I., Dorenda M., Kita W., Płaskowska E. 1988. Choroby powodowane przez grzyby, występujące w mieszance pastewnej owsa (*Avena sativa* L.) z peluszką (*Pisum arvense* L.). *Rocz. Nauk Rol. Ser. E, T.* 18, 2: 95 — 106.
- Tottman D. R. 1987. The Decimal code for the growth stages of cereals with illustrations. BCPC Publications Reprinted from *Annals of Applied Biology*. 110. Occasional Publication 4: 441 — 454.
- Vanco B., Slikova S., Sudyova V. 2007. Influence of localities and winter wheat cultivars on deoxynivalenol accumulation and disease damage by *Fusarium culmorum*. *Biologia Bratislava* 62/1: 62 — 66.
- Wiśniewska H., Perkowski J., Kaczmarek Z. 2004. Scab response and deoxynivalenol accumulation in spring wheat kernels of different geographical origins following inoculation with *Fusarium culmorum*. *J. Phytopathol.* 152: 613 — 621.

- Wiśniewska H. 2005. Fuzarioza kłosów pszenicy. Post. Nauk Rol. 4: 15 — 30.
- Wiśniewska H., Basiński T., Chełkowski J., Perkowski J. 2011. *Fusarium sporotrichioides* Sherb. toxins evaluated in cereal grain with *Trichoderma harzianum*. J. Plant Prot. Research. 51, 2: 134 — 139.
- Yli-Mattila T. 2010. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. J. Plant Pathol. 92, 1: 7 — 18.
- Xu X., Nicholson P., Thomsett M. A., Simpson D., Cooke B. M., Doohan F. M., Brennan J., Monaghan S., Moretti A., Mule G., Hornok L., Beki E., Tatnell J., Ritieni A., Edwards S. G. 2008. Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. Phytopathology 98: 69 — 78.
- Zhou T., Reeleder R. D. 1989. Application of *Epicoccum purpurascens* spores to control white mold of snap bean. Plant Dis. 73: 639 — 642.
- Żuk B. 1989. Biometria stosowana. PWN, Warszawa.

CEZARY TRAWCZYŃSKI

Zakład Agronomii Ziemiaka

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Oddział Jadwisin

Właściwości chemiczne gleby lekkiej w ekologicznym systemie produkcji

The chemical properties of light soil in organic system of agricultural production

Celem badań przeprowadzonych w latach 2007–2014 była ocena zmian właściwości chemicznych gleby lekkiej (odczynu, zawartości węgla organicznego, azotu ogólnego, przyswajalnych form fosforu, potasu, magnezu oraz manganu, cynku, miedzi, boru i żelaza) w płodozmianie ekologicznym. Zmianowanie obejmowało następujące gatunki roślin rolniczych: ziemniak, owies, gryka, mieszanka strączkowo-zbożowa (lubin żółty z owsem), żyto. Źródłem składników pokarmowych był obornik stosowany pod ziemniaki ($25 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$) i pod owies ($12,5 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$), przyorywana słoma i biomasa roślin międzyplonowych (peluszką, gorczyca biała, seradela), wapno węglanowe. Próbkę glebową z warstwy 0–20 cm pobierano jesienią każdego roku. Analizy chemiczne gleby wykonywano w laboratorium Stacji Chemiczno-Rolniczej. Stwierdzono poprawę odczynu gleby, stabilizację poziomu azotu ogólnego oraz węgla organicznego w glebie. Zawartość magnezu oraz fosforu w ciągu ośmiu lat wzrosła i jest wysoka, a potasu zmalała i jest na poziomie niskim. Zawartości przyswajalnych form mikroelementów: manganu, miedzi, boru i żelaza w kolejnych ośmiu latach badań wzrosły, a cynku zmalała. Poziom manganu i miedzi jest średni, a boru i żelaza niski.

Słowa kluczowe: makroelementy, mikroelementy, odczyn, węgiel organiczny

The aim of investigation conducted in the years 2007–2014 was to estimate the chemical properties of a light soil (soil pH, content of organic carbon, total nitrogen, available forms of phosphorus, potassium, magnesium and manganese, zinc, copper, boron and iron) in organic crop rotation. The crop rotation included following agricultural plant species: potato, oat, buckwheat, legume-cereal mixture (yellow lupine with oat), rye. The source of nutrient components were: manure in dose of $25 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ applied before the potato cultivation and manure in dose of $12.5 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ applied before the oat cultivation, straw, biomass of intercrop plants (field pea, white mustard, serradella) and carbonate lime. The samples were taken from soil layer 0–20 cm in autumn every year. The analysis of soil chemical properties in laboratory of Agricultural Chemical Station was used. The improvement of soil reaction, stable levels of total nitrogen and organic carbon in the soil were stated. The content of magnesium and phosphorus increased in the course of eight years and is high, but potassium decreased and is low. The content of available forms of microelements: manganese, copper, boron and iron in the course of eight tested years increased while zinc decreased. The level of manganese and copper is medium but boron and iron is low.

Key words: carbon organic, macroelements, microelements, reaction

WSTĘP

Utrzymanie odpowiednio wysokiej produktywności uprawianych w płodozmianie roślin zależy w znacznej mierze od zasobu składników pokarmowych w glebie. Żyzność i produktywność gleby kształtowana poziomem składników pokarmowych ma szczególne znaczenie w warunkach rolnictwa ekologicznego, w którym nie dopuszcza się stosowania syntetycznych nawozów mineralnych, będących podstawowym źródłem składników w rolnictwie konwencjonalnym (Duer, 2001). Dlatego w systemie produkcji ekologicznej właściwie skonstruowany płodozmiar, a także stosowanie nawozów naturalnych i organicznych stanowić powinny podstawę zapobiegania spadkowi zawartości próchnicy oraz składników pokarmowych (makro- i mikroelementów) w glebie (Krysztoforowski, Stachowicz, 2008; Tyburski i in., 2008). Ujemną cechą rolnictwa ekologicznego z punktu widzenia rolnika są uzyskiwane niższe plony w stosunku do plonów z innych systemów uprawy roślin (Nowacki i in., 2010, 2011, 2014). Do czynników limitujących poziom plonowania roślin w systemie ekologicznym, poza deficytem składników pokarmowych w glebie wywołanym ograniczeniem w stosowaniu nawozów mineralnych, należą choroby i szkodniki ze względu na zakaz stosowania chemicznych środków (Gruczek i in., 2005). Nieprawidłowy sposób nawożenia, szczególnie w systemie produkcji ekologicznej, w krótkim czasie prowadzić może do obniżenia zawartości próchnicy, zakwaszania i wyczerpywania gleby z przyswajalnych form składników pokarmowych, czyli generalnie zubożenia gleby (Blecharczyk i in., 2005; Tyburski i in., 2008). W warunkach produkcyjnych, czyli pobierania i wynoszenia składników makro- i mikroelementowych wraz z plonami, może dochodzić do ich deficytu w glebie, stąd wynika konieczność okresowej kontroli zasobności gleby.

Celem badań była ocena właściwości chemicznych gleby lekkiej na przestrzeni 8 lat uprawy roślin w systemie ekologicznym.

MATERIAŁ I METODY

Ocena zmian właściwości chemicznych gleby na polu doświadczalnym prowadzonym w systemie ekologicznym, należącym do Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Oddział Jadwisin obejmowała lata 2007–2014. Była to gleba lekka, wytworzona z piasków gliniastych (pg) o składzie granulometrycznym: 75% piasku, 14% pyłu i 11% iłu (PTG, 2009). W klasyfikacji gleb użytkowanych rolniczo glebę tę zaliczono do kompleksu żyniego dobrego. W zmianowaniu 5-polowym uprawiano następujące gatunki roślin rolniczych: ziemniak, owies, grykę, mieszankę strączkowo-zbożową (łubin żółty z owsem), żyto. Powierzchnia eksperymentalnego pola doświadczalnego wynosiła ogółem 2 ha, a jeden gatunek zajmował powierzchnię 0,4 ha. Technologia uprawy wszystkich gatunków prowadzona była według zasad obowiązujących w rolnictwie ekologicznym. Nawożenie w zmianowaniu stanowił obornik stosowany pod ziemniaki w dawce 25 t·ha⁻¹ świeżej masy (6,07 t·ha⁻¹ suchej masy) i pod owies w dawce 12,5 t·ha⁻¹ świeżej masy (3,03 t·ha⁻¹ suchej masy), przyorywana słoma:

żytnia w dawce 5,40 t·ha⁻¹, łubinu żółtego z owsem 3,78 t·ha⁻¹, gryczana 3,64 t·ha⁻¹, owsiana 2,49 t·ha⁻¹, łąty ziemniaka 0,52 t·ha⁻¹ suchej masy, biomasa roślin międzyplonowych (seradela wsiewana w żyto 2,00 t·ha⁻¹, gorczyca biała uprawiana po gryce 2,40 t·ha⁻¹, peluszka uprawiana po owsie 3,30 t·ha⁻¹ suchej masy) oraz stosowane jesienią po uprawie ziemniaków wapno węglanowe (45% CaO) w dawce 3,00 t·ha⁻¹. Warunki meteorologiczne w poszczególnych latach oceniono na podstawie sumy opadów i średnich temperatur powietrza okresów wegetacji (od kwietnia do września włącznie) w porównaniu do średniej z wielolecia (tab. 1). Wynika z nich, że poszczególne okresy wegetacji w latach badań różniły się zarówno pod względem sumy opadów, jak i średnich temperatur powietrza. W latach 2007, 2010, 2011, 2012 i 2013 zanotowano opady powyżej średniej z wielolecia, natomiast w latach 2008, 2009 i 2014 poniżej średniej z wielolecia. Z kolei tylko w okresie wegetacji lat 2009 i 2014 zanotowano temperatury powietrza powyżej średniej z wielolecia, natomiast w pozostałych okresach wegetacji temperatury były niższe lub zbliżone do średniej z wielolecia. Uogólniając można stwierdzić, że przeważały lata wilgotne i chłodne.

Tabela 1

Sumy miesięcznych opadów (mm) oraz średnie miesięczne temperatury powietrza (°C) w latach badań w porównaniu do średnich wieloletnich z lat 1967–2014
Sums of monthly precipitation (mm) and mean monthly air temperature (°C) in the years of research in comparison to long-term averages for 1967–2014

Rok Year	Miesiące Months						
	IV	V	VI	VII	VIII	IX	IV-IX
Opady Precipitation							
1967–2014	36,0	55,0	76,0	79,0	60,0	48,0	354,0
2007	16,3	78,4	109,6	54,1	74,3	103,7	436,4
2008	29,3	62,9	43,5	68,8	80,9	48,8	334,2
2009	0,0	80,8	72,4	85,6	83,1	18,8	340,7
2010	9,7	166,8	64,0	96,7	105,3	71,3	513,8
2011	26,8	33,1	44,8	278,1	57,1	18,5	458,4
2012	54,3	52,4	96,6	92,2	87,2	26,9	409,6
2013	51,1	130,0	105,4	17,1	97,7	94,0	495,3
2014	61,1	41,3	69,8	23,5	79,2	11,9	286,8
Temperatura powietrza Air temperature							
1967–2014	7,8	13,6	16,5	18,4	17,7	13,1	14,5
2007	7,8	13,1	15,7	17,6	17,8	10,8	13,8
2008	7,4	13,6	17,1	18,1	17,6	11,6	14,2
2009	9,7	12,3	17,3	21,3	17,3	14,2	15,4
2010	8,1	12,4	16,5	20,0	18,2	11,1	14,4
2011	9,7	13,2	17,5	17,0	15,3	13,7	14,4
2012	7,9	13,9	15,6	15,2	17,4	12,8	13,8
2013	6,3	15,7	17,2	18,7	18,2	10,3	14,4
2014	10,3	14,1	15,8	21,5	18,2	14,8	15,8

Jesienią każdego roku z warstwy 0–20 cm przy pomocy laski Egnera z każdego pola zmianowania pobierano próbki glebowe, w których określono: odczyn gleby w 1n KCl, zawartość węgla organicznego, azotu ogólnego, przyswajalnych form fosforu, potasu,

magnezu oraz manganu, cynku, miedzi, boru i żelaza. Próbkę zbiorczą o masie około 0,5 kg z każdego pola stanowiła mieszanina gleby składająca się z 25–30 pobrań. Analizy chemiczne gleby wykonano w laboratorium Okręgowej Stacji Chemiczno-Rolniczej w Warszawie. W wysuszonych próbach oznaczono zawartość węgla organicznego metodą Tiurina, azotu ogólnego metodą destylacyjno-miareczkową Kjeldahla, fosfor i potas przyswajalny metodą Egnera-Riehma, magnez metodą Schachtschabella oraz mangan, miedź, cynk, boru i żelazo metodą Rinkisa. Uzyskane w poszczególnych latach zawartości przyswajalnych form makro- i mikroelementów odniesiono do ustalonych klas zasobności, przedziałów wartości granicznych w glebie (Zalecenia nawozowe, 1985). Wyniki doświadczeń opracowano posługując się analizą wariancji. Porównanie średnich przeprowadzono z wykorzystaniem testu Tukeya.

WYNIKI I DYSKUSJA

Analiza gleby w kolejnych latach prowadzenia badań wykazała zróżnicowanie właściwości chemicznych gleby (tab. 2). Dość korzystnie na przestrzeni analizowanych lat kształtowały się zmiany odczynu (pH w KCl) gleby. Pomiedzy pierwszym (2007) i ostatnim (2014) rokiem badań zanotowano obniżenie kwasowości gleby o jedną jednostkę, a odczyn zmienił się z kwaśnego na lekko kwaśny, co prawdopodobnie związane było z systematycznym wapnowaniem gleby i stosowaniem obornika (Strączyńska, 1998; Rabikowska, Piszcz, 2000; Mazur, 2011). Spośród analizowanych makroelementów największe zmiany dotyczyły zawartości fosforu w glebie. Na przestrzeni ośmiu lat udowodniono istotne zmniejszenie poziomu fosforu przyswajalnego w glebie, co przejawiało się zmianą z bardzo wysokiej do wysokiej klasy zasobności tego składnika w glebie. Niekorzystnie kształtowała się zawartość potasu w glebie. W prawdzie spadek pomiędzy pierwszym i ostatnim rokiem badań był nieistotny, to jednak poziom początkowy (2007 rok) tego składnika w glebie był niski i prawdopodobnie w najbliższym czasie konieczne będzie zastosowanie uzupełniającego nawożenia tym składnikiem w formie jednego z nawozów dopuszczonych do stosowania w rolnictwie ekologicznym. Spadek zawartości potasu oraz fosforu w glebie wynikał prawdopodobnie, poza zaprzestaniem wnoszenia tych składników w nawozach mineralnych, z tego, że jedynym źródłem zewnętrznym wnoszenia ich do gleby był obornik zawierający znacznie mniej fosforu ($3,89 \text{ g P} \cdot \text{kg}^{-1}$) niż potasu ($29,37 \text{ g K} \cdot \text{kg}^{-1}$). Ponadto uprawa w zmianowaniu ziemniaka, charakteryzującego się znacznym pobieraniem i wynoszeniem z plonem bulw fosforu, a szczególnie potasu, przyczyniać się mogła do obniżania przyswajalnych form tych składników w glebie. Zdecydowanie korzystniej w porównaniu do fosforu i potasu kształtowały się zmiany magnezu w glebie. W 2014 roku stwierdzono wzrost zawartości magnezu w glebie o około 8% w stosunku do pierwszego (2007) roku badań, a na przestrzeni analizowanych lat zasobność tego składnika w glebie utrzymywała się na poziomie wysokim i bardzo wysokim. Korzystny wpływ stosowania obornika, szczególnie w połączeniu z wapnowaniem, na odczyn i zasobność gleby między innymi w magnez znalazło potwierdzenie we wcześniejszych badaniach własnych i innych badaczy (Rutkowska i in., 2002; Kalembasa i in., 2005; Trawczyński, 2006; 2013 a).

Tabela 2

Zmiany właściwości chemicznych gleby w latach badań
Changes of soil chemical properties in the years

Składnik Element	Lata Years							
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
pH (1n KCl)	5,1	5,3	5,6	5,5	5,6	5,7	5,9	6,1
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				0,4				
P (mg·kg ⁻¹)	98,1	95,4	89,8	76,2	79,1	75,3	77,8	81,4
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				16,4				
K (mg·kg ⁻¹)	67,6	78,4	78,4	58,5	52,7	64,3	62,0	50,2
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				19,9				
Mg (mg·kg ⁻¹)	62,9	75,5	79,1	76,0	72,7	75,1	76,3	68,5
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				10,5				
Cu (mg·kg ⁻¹)	2,1	2,3	2,8	2,5	3,2	3,6	4,7	4,4
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				0,7				
Zn (mg·kg ⁻¹)	5,4	5,8	5,8	5,8	5,0	5,1	5,1	5,0
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				r.n. — n.s.				
Mn (mg·kg ⁻¹)	100,7	104,1	124,9	108,4	109,9	129,3	112,1	138,5
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				23,6				
Fe (mg·kg ⁻¹)	546,0	629,0	579,0	541,0	568,0	637,0	608,0	695,0
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				120,0				
B (mg·kg ⁻¹)	0,28	0,29	0,28	0,26	0,38	0,33	0,38	0,56
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				0,15				
N ogólny — N total (%)	0,03	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				0,01				
C organiczny — C organic (%)	0,44	0,53	0,59	0,56	0,54	0,51	0,55	0,59
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				r.n. — n.s.				
C — N	15:1	11:1	12:1	11:1	9:1	10:1	11:1	12:1
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}				3:1				

Na przestrzeni ośmiu lat prowadzenia doświadczenia w różnym stopniu zmieniała się również zasobność gleby w przyswajalne formy mikroelementów (tab. 2). Zawartość miedzi, manganu, boru i żelaza wzrosła, a cynku nie zmieniała się istotnie, pomiędzy pierwszym i ostatnim rokiem badań, jednak nie spowodowało to zmiany klas zasobności gleby w te składniki. Zawartość miedzi, manganu i cynku kształtowała się na poziomie średnim, natomiast zawartość boru i żelaza była niska. Rutkowska i in. (2002) na przestrzeni 20 lat prowadzenia oceny zasobności gleby w mikroelementy stwierdzili, że zrównoważone nawożenie organiczne uzupełnione wapnowaniem nie spowodowało istotnych zmian zawartości tych składników w glebie. W przeprowadzonych badaniach pod wpływem wnoszonego obornika i wapnowania najkorzystniej kształtowały się zmiany boru i żelaza, co prawdopodobnie było spowodowane ich ogólnie niskim poziomem w glebie, manganu ze względu na znaczny udział tego mikroelementu w oborniku oraz miedzi, co wynikać mogło z poprawy odczynu gleby.

Jednym z głównych mierników żyzności gleby jest zawartość węgla organicznego, który jednocześnie stanowi podstawowy wyznacznik zdolności produkcyjnej gleby (Maćkowiak, Żebrowski, 1999; Mercik i in., 1999; Janowiak, Spychaj-Fabisiak, 2006). Zawartość węgla organicznego w glebie w 2014 roku, w porównaniu do pierwszego (wyjściowego) roku badań wzrosła o 25%. Pomiedzy analizowanymi latami zawartość węgla organicznego utrzymywała się na względnie stałym poziomie, nieznacznie

istotnie. Taki kierunek zmian może wynikać z faktu, że w analizowanym systemie produkcji dość znaczna masa organiczna wnoszona w formie obornika, słomy i resztek pożywnych czy biomasy roślin międzyplonowych początkowo w różnym stopniu jest unieruchamiana, a następnie poddawana wydłużonemu procesowi humifikacji z uwagi na brak azotu mineralnego w glebie (Janowiak, Murawska, 1999; Sosulski i in., 2005). W literaturze szeroko udokumentowany jest fakt, że zmiany właściwości chemicznych gleby, szczególnie próchnicy pod wpływem stosowania różnego rodzaju nawozów organicznych, zwłaszcza nie uzupełnionych nawożeniem mineralnym są procesem długofalowym, ale i bardzo trwałym (Urbanowski i in., 1999; Łabętowicz i in., 2000; Mercik i in., 2000; Rutkowska i in., 2002; Koper, Lemanowicz, 2006). Jak wykazały badania ustabilizowany poziom węgla organicznego w dłuższym przedziale czasowym zapewnił odpowiednio wysoki poziom plonowania uprawianych gatunków roślin (Mazur 1995; Łabętowicz, 1999; Trawczyński, 2010, 2013 b). Po 5-letnim okresie badań przy różnych sposobach nawożenia płodozmianu: mineralnym, organiczno-mineralnym i organicznym Stępień (2000) wykazał wzrost odczynu gleby, zawartości próchnicy, azotu, fosforu, potasu oraz magnezu, ale najkorzystniejsze zmiany dotyczące odczynu, poziomu azotu, fosforu i magnezu stwierdził w glebie nawożonej według zasad rolnictwa ekologicznego.

Zawartość węgla organicznego w znacznym stopniu zbieżna jest z zawartością azotu ogólnego w glebie, co znalazło potwierdzenie w literaturze (Janowiak, Murawska, 1999; Blombäck i in., 2003; Kołodziejczyk, 2005) i uzyskanych wynikach badań. W odniesieniu do analizowanych lat badań (2007–2014) nie stwierdzono istotnego zróżnicowania poziomu azotu ogólnego w glebie. Z uwagi na dość niski poziom węgla organicznego w glebie stosunek C : N był nieco rozszerzony, ale w przedziale od 15 : 1 do 9 : 1 należy za prawidłowy (Siebielec i in., 2012). Występujące zróżnicowanie zawartości węgla organicznego i innych składników w glebie zależy nie tylko od uprawianych gatunków roślin i rodzaju stosowanego nawożenia, ale również układu warunków pogodowych (Mercik i in., 1999; Kulig i in., 2005; Murphy i in., 2007; Takata i in., 2008). W przeprowadzonych badaniach wykazano, w odniesieniu do niektórych składników, zbieżność ich zmian w glebie w zależności od układu warunków pogodowych w okresie wegetacji. W latach z niedoborem opadów w okresie wegetacji (2008–2009, 2014) oraz temperaturą powietrza powyżej średniej z wielolecia (2009–2014), z reguły stwierdzano większy poziom składników w glebie, niż w lata z opadami powyżej średniej z wielolecia i chłodniejsze, co wynikać mogło z mniejszego pobierania i wynoszenia składników pokarmowych z plonami uprawianych gatunków roślin w warunkach niedoboru wody.

WNIOSKI

1. W warunkach ekologicznego systemu produkcji odczyn gleby na przestrzeni ośmiu lat badań uległ poprawie i stwierdzony w 2014 roku (pH w 1 n KCl 6,1 — lekko kwaśny) należy uznać za właściwy dla gleby lekkiej.

2. Zawartości przyswajalnych form fosforu i magnezu, zgodnie z kryteriami ich wyceny w glebie lekkiej, utrzymywały się na poziomie wysokim, natomiast zawartość potasu była niska.
3. W odniesieniu do kryteriów wyceny zawartości mikroelementów w glebie, analiza wykazała, że poziom manganu, miedzi i cynku był średni, natomiast boru i żelaza niski.
4. Ze względu na niski poziom potasu, żelaza i boru, pomimo obecnie stosowanego nawożenia w tym płodozmianie należy rozważyć możliwość wprowadzenia systematycznego nawożenia w formie odpowiednich nawozów wieloskładnikowych spośród zakwalifikowanych do stosowania w rolnictwie ekologicznym.
5. Stwierdzono, że zawartość azotu ogólnego w glebie była stabilna, zawartość węgla organicznego generalnie niska, ale średni dla wielolecia stosunek C : N utrzymujący się w zakresie 11 : 1 określić można jako poprawny.

LITERATURA

- Blecharczyk A., Piechota T., Małecka I. 2005. Zmiany chemicznych właściwości gleby w wyniku wieloletniego oddziaływania systemów następstwa roślin i nawożenia. *Fragm. Agron.* 22 (2): 30 — 38.
- Blombäck K., Eckersten H., Lewan E., Aronsson H. 2003. Simulations of soil carbon and nitrogen dynamics during seven years in a catch crop experiment. *Agric. Syst.* 76: 95 — 114.
- Duer I. 2001. Kształtowanie żyzności gleby w rolnictwie zrównoważonym. *Mat. szkoleniowe* 80/01. IUNG Puławy, ss. 52.
- Gruczek T., Nowacki W., Zarzyńska K. 2005. Ekologiczny system produkcji ziemniaków. *IHAR Oddział Jadwisin*, ss. 34.
- Janowiak J., Murawska B. 1999. Kształtowanie się ogólnej zawartości C i N w glebie pod wpływem nawożenia organicznego i mineralnego w wieloletnim doświadczeniu statycznym. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 465: 331 — 339.
- Janowiak J., Spychaj-Fabisiak E. 2006. Próchnicotwórcza rola słomy przyorywanej bez obornika i razem z obornikiem na tle zróżnicowanego nawożenia azotem na glebie lekkiej. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 512: 201 — 207.
- Kalembasa S., Tkaczuk Cz., Felczyński K. 2005. Wpływ wieloletniego stosowania obornika i nawożenia mineralnego na zawartość wybranych makroelementów w glebie. *Fragm. Agro.* XXII, 1 (85): 111 — 116.
- Kołodziejczyk M., Szmigiel A., Sobol Z., Baran D. 2005. Wpływ zróżnicowanego nawożenia na właściwości gleby lekkiej i ciężkiej. *Fragm. Agronom.* (XXII) Nr 1 (85): 446 — 455.
- Koper J., Lemanowicz J. 2006. Kształtowanie się wybranych właściwości biochemiczno-chemicznych gleby płowej pod wpływem wieloletniego nawożenia obornikiem i azotem. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 512: 357 — 362.
- Krysztoforski M., Stachowicz T. 2008. *Płodozmian w gospodarstwie ekologicznym*. Wyd. CDR Radom: 44 ss.
- Kulig B., Szafranski W., Zajac T. 2005. Plonowanie międzyplonu w stanowisku po bobiku oraz zawartość węgla organicznego w glebie w zależności od przebiegu pogody. *Acta Agrophys.* 3 (2): 307 — 315.
- Łabętowicz J., Kuszelewski L., Korc M., Szulc W. 1999. Znaczenie nawożenia organicznego dla trwałości plonów i równowagi jonowej gleby lekkiej. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 465: 123 — 134.
- Łabętowicz J., Korc M., Szulc W., Rutkowska B. 2000. Zmiany zasobności gleby lekkiej w przyswajalne formy mikroelementów w warunkach wieloletniego stosowania obornika. *Folia Univ. Agric. Stetin.* 211 *Agricultura* (84): 241 — 244.
- Maćkowiak Cz., Żebrowski J. 1999. Wpływ nawożenia obornikiem i doboru roślin w zmianowaniu na zawartość w glebie węgla organicznego i azotu ogólnego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 465: 341 — 351.
- Mazur T. 1995. Stan i perspektywa bilansu substancji organicznej w glebach uprawnych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 421 a: 267 — 276.

- Mazur Z. 2011. Wpływ długotrwałego stosowania obornika i słomy łącznie z nawozami mineralnymi na niektóre właściwości gleby pólnej. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 565: 201 — 206.
- Mercik S., Stępień W., Gębski M. 1999. Yield of plants and some chemical properties of soil in 75-years field experiments in Skierniewice. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 465: 39 — 49.
- Mercik S., Stępień W., Łabętowicz J. 2000. Żyzność gleby w trzech systemach nawożenia: mineralnym, organicznym i organiczno-mineralnym w doświadczeniach wieloletnich. Cz. II. Właściwości chemiczne gleb. *Folia Univ. Agric. Stetin. 211 Agricultura (84)*: 317 — 322.
- Murphy D. V., Stockdale E. A., Poulton P. R., Willson T. W., Goulding K. W. T. 2007. Seasonal dynamic of carbon and nitrogen pools and fluxes under continuous arable and ley-arable rotations in a temperate environment. *Europ. J. Soil Sci.* 58: 1410 — 1424.
- Nowacki W., Goliszewski W., Zarzyńska K., Trawczyński C., Szutkowska M., Wierzbicka A., Barbaś P. 2010. Streszczenia wyników badań z zakresu rolnictwa ekologicznego realizowanych w 2009 roku. [W]: Poprawa efektywności produkcji roślinnej w systemie ekologicznym poprzez stosowanie nawadniania ze szczególnym uwzględnieniem uprawy ziemniaka. MR i RW, Wyd. Rolnictwa Ekologicznego: 65 — 76.
- Nowacki W., Goliszewski W., Zarzyńska K., Trawczyński C., Barbaś P., Szutkowska M., Wierzbicka A. 2011. Wyniki badań z zakresu rolnictwa ekologicznego w 2010 roku. W: Nawadnianie oraz ochrona roślin w systemie ekologicznym czynnikami utrzymującymi wysoką żyzność gleby oraz stabilizującymi i poprawiającymi jakość plonów (ze szczególnym uwzględnieniem ziemniaka). MR i RW, Wyd. Rolnictwa Ekologicznego: 63 — 74.
- Nowacki W., Goliszewski W., Czerko Z., Zarzyńska K., Lutomińska B., Trawczyński C., Wierzbicka A., Barbaś P., Jankowska J., Pietraszko M. 2014. Wyniki badań z zakresu rolnictwa ekologicznego realizowanych w 2013 roku. W: Uprawa ziemniaka metodami ekologicznymi. Wyd. MRiRW, Wyd. Rolnictwa Ekologicznego: 244 — 259.
- PTG 2009. Klasyfikacja uziarnienia gleb i utworów mineralnych — PTG 2008. *Roczn. Glebozn. — Soil Sci. Ann.* 60 (2): 5 — 16.
- Rabikowska B., Piszcz U. 2000. Zakres i zasięg zmian odczynu i właściwości sorpcyjnych w glebie pólnej pod wpływem długoletniego nawożenia obornikiem i azotem. *Folia Univ. Agric. Stetin. 211 Agricultura (84)*: 423 — 428.
- Rutkowska B., Szulc W., Łabętowicz J., Korc M., Sałajczyk M. 2002. System nawożenia jako czynnik determinujący zasobność gleby w przyswajalne formy składników pokarmowych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 484: 537 — 547.
- Siebielec G., Smreczak B., Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B., Terelak H., Koza P., Hryńczuk B., Łysiak M., Miturski T., Gałązka R., Suszek B. 2012. Monitoring chemizmu gleb ornych Polski w latach 2010–2012. Raport końcowy. Puławy 2012: 202 ss.
- Sosulski T., Stępień M., Szara E., Mercik S. 2005. Akumulacja azotu w glebie oraz bilans tego składnika w doświadczeniach wieloletnich. *Fragm. Agron.* XXII 1 (85): 265 — 273.
- Stępień A. 2000. Zmiany chemicznych właściwości gleby pod wpływem różnych sposobów nawożenia w zmianowaniu. *Folia Univ. Agric. Stetin. 211 Agricultura (84)*: 459 — 464.
- Strączyńska S. 1998. Zmiany odczynu i właściwości sorpcyjnych gleb piaszczystych pod wpływem wieloletniego nawożenia mineralnego, organicznego i organiczno-mineralnego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 456: 165 — 168.
- Takata Y., Funakowa S., Yanai J., Mishima A., Ashalov K., Ishida N., Kosaki T. 2008. Influence of crop rotation system on the spatial and temporal variation of the soil organic carbon budget in northern Kazakhstan. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54: 159 — 171.
- Trawczyński C. 2006. Wpływ alternatywnych form nawożenia organicznego na właściwości gleby i plonowanie ziemniaka. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 512: 593 — 601.
- Trawczyński C. 2010. Bilans składników w ekologicznym systemie produkcji roślinnej na glebie lekkiej. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*. Vol. 55 (4): 166 — 168.
- Trawczyński C. 2013a. Wpływ 6-letniej uprawy roślin w systemie ekologicznym z nawadnianiem na właściwości chemiczne gleby. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*. Vol. 58 (4): 199 — 203.

- Trawczyński C. 2013b. Bilans azotu, fosforu i potasu w systemie produkcji ekologicznej na glebie lekkiej. Biul. IHAR 269: 115 — 122.
- Tyburski J., Jończyk K., Kibler M., Krysztoforowski M. 2008. Zawartość składników pokarmowych w glebach gospodarstw ekologicznych. Wyd. CDR Radom: 24 ss.
- Urbanowski S., Jaskulska I., Urbanowska T. 1999. Zmiany zawartości węgla organicznego oraz makroelementów w glebie pod wpływem wieloletniego nawożenia. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 465: 353 — 361.
- Zalecenia nawozowe. 1985. Cz. I. Liczby graniczne do wyceny zawartości w glebach makro- i mikroelementów. Wyd. IUNG Puławy, Ser. P (20): 34 ss.

KRYSTYNA RYKACZEWSKAInstytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Jadwisinie, Zakład Agronomii Ziemiaka

Morphology and anatomy of the root system of new potato cultivars

Part I. Morphology of the root system*

Morfologia i anatomia systemu korzeniowego nowych odmian ziemniaka **Część I. Morfologia systemu korzeniowego**

The purpose of this work was to assess the variability of morphology of the root systems of 17 potato cultivars and to consider a possible connection with their tolerance to high temperature and drought during growing season. The study was carried out in a greenhouse in 2014. Among the cultivars selected for the study 'Tetyda' was tolerant and 'Aruba' susceptible to these abiotic stresses. A device for the production of potato minitubers in aeroponics was used in the study. Measurements of root system properties were conducted at flowering period and at the beginning of tuberization. Significant differences were found among cultivars in terms of the maximum rooting depth, their fresh and dry matter and dry matter content in roots. Maximum rooting depth reached 109 cm. It was significantly positively correlated with the fresh matter of roots. A measure of the size of the potato plant root system used by most researchers is the dry matter of roots. In our study, it was from 0.93 to 4.78 g per plant depending on the cultivar and was highly correlated with the length of the stems and the fresh matter of above-ground part of plants. The dry matter content in roots ranged from 4.4% in the cultivar Miłek to 7.6% in the cultivar Tetyda with high tolerance to heat and drought stresses during the growing season. However, the demonstration of the relationship between tolerance of cultivars to these abiotic stresses during the growing season and the dry matter content in the roots will require further research.

Key words: aeroponics, depth range of root system, dry matter of root system, dry matter content in roots, *Solanum tuberosum* L.

Celem pracy była ocena zmienności morfologii systemu korzeniowego 17 odmian ziemniaka i rozważenie ewentualnego związku z tolerancją na wysoką temperaturę i suszę w okresie wegetacji. Badania przeprowadzono w szklarni w roku 2014. Wśród wyselekcjonowanych do badań odmian 'Tetyda' była tolerancyjna i 'Aruba' wrażliwa na stres abiotyczny. Do badań systemu korzeniowego zostało wykorzystane urządzenie do aeroponicznej produkcji minibułw ziemniaka umieszczone w hali wegetacyjnej. Pomiary przeprowadzono w czasie kwitnienia roślin, czyli na początku ich tuberyzacji. Stwierdzono istotne różnice między odmianami pod względem głębokości zasięgu korzeni, ich świeżej

* Praca przedstawiona na konferencji IHAR PIB, Zakopane, 3 lutego 2015 roku

Redaktor prowadzący: Renata Lebecka

i suchej masy oraz zawartości suchej masy w korzeniach. Maksymalny zasięg korzeni osiągał wartość 109 cm. Był on pozytywnie skorelowany ze świeżą masą korzeni. Miara wielkości systemu korzeniowego roślin ziemniaka stosowaną przez większość badaczy jest sucha masa korzeni. W naszych badaniach wahała się od 0,93 do 4,78 g na roślinę zależnie od odmiany i była wysoce istotnie skorelowana z długością łodyg i masą części nadziemnej roślin. Zawartość suchej masy w korzeniach wynosiła od 4,4% u odmiany Miłek do 7,6% u odmiany Tetyda, o wysokiej tolerancji na stres abiotyczny w okresie wegetacji. Jednak wykazanie zależności między tolerancją odmian na stres wysokiej temperatury i suszy w okresie wegetacji a suchą masą korzeni będzie wymagało dalszych badań.

Słowa kluczowe: aeroponika, głębokość zasięgu korzeni, sucha masa korzeni, zawartość suchej masy w korzeniach

INTRODUCTION

Root studies, which were far behind the other plant sciences, changed during the second half of the 20th century, but have accelerated since that time (Tracy et al., 2011; De Smet et al., 2012). It was not only the technological innovations that enabled this trend but mainly the notion that there is a missing gap in plant studies, that is incomplete without this link (Silberbush, 2013).

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is a plant typical mainly for temperate climate. The crop grows best in a temperate climate and does not perform well in heat (Koman and Haverkort, 1995; Hijmans, 2003). It is characterized by specific temperature requirements and develops best at temperatures of about 20°C (Struik et al., 1989 a, 1989 b; Rykaczewska, 1993; Van Dam et al., 1996). Under high-temperature conditions tuberization is significantly inhibited and photoassimilate partitioning to tubers is greatly reduced (Ewing, 1981; Krauss and Marschner, 1984; Haynes et al., 1989; Lafta and Lorenzen, 1995; Van Dam et al., 1996; Rykaczewska, 2015a; 2015b).

Heat stress is an agricultural problem in many areas in the world (Birch et al., 2012). Transitory or constant high temperatures cause an array of morpho-anatomical, physiological and biochemical changes in plants, which affect plant development and may lead to a drastic reduction in economic yield (Wahid et al., 2007). For this task, however, a thorough understanding of physiological responses of plants to abiotic stresses, mainly heat and drought stresses, is currently imperative. Due to the increasing occurrence of periods of high temperatures and drought in Poland and potato production losses resulting from the action of these abiotic stresses, studies of potato tolerance to them were undertaken. The purpose of this work was to assess the variability of morphology and anatomy of the root systems of potato cultivars and to consider a possible connection with their tolerance to heat and drought stresses.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in 2014 in the Potato Agronomy Department in Jadwisin. The root systems of 17 cultivars: Denar, Justa, Lord, Miłek (very early), Aruba, Bila, Etola, Gwiazda, Hubal, Michalina (early), Etiuda, Finezja, Gandawa, Kuba, Oberon, Stasia and Tetyda (medium early) were tested. Among the cultivars selected for the study Tetyda was

tolerant and Aruba susceptible to abiotic stresses (high temperature and drought) (Rykaczewska, 2015 a).

A device for the production of potato minitubers in aeroponics of our own design (2.51 m length $\times$ 1.26 m width $\times$ 0.60 m depth) was used in the study, which was located in the greenhouse. Pre-sprouted minitubers of transversal diameter of about 1 cm were planted on 22nd May into baskets with dimensions of 5 $\times$ 7 cm filled with mineral wool. They were placed in holes on top of the device. In this way the foliage of the plants grew in the light while roots, stolons and tubers developed under total darkness inside the aeroponics chamber. The plant density was 40 plants/m². A modified nutritive solution (pH=5.5, EC=2.5 mS cm⁻¹, NO₃⁻, SO₄²⁻, H₂PO₄⁻, Cl⁻, K⁺, Ca₂⁺, Mg₂⁺, NH₄⁺, Na⁺ and micronutrients) from Rolot et al. (2002) was prepared and supplied by fog nozzles located at the bottom of the device. Fog nozzles sprayed a small quantity of nutrient solution every 3 min for 10 s. during the day and every 5 min for 10 s. during the night. Residual nutrition solution was recirculated.

Plants were collected on 11th July (49 days after planting) during the flowering period and at the beginning of tuberization. The length of stems and the mass of the above-ground parts of the plant, the number and mass of tubers of transverse diameter greater than 1 cm and also the maximum depth range of roots, their fresh and dry weight and dry matter content were determined. Dry matter of roots and dry matter content were determined after drying at 50°C for 24 hours and next at 105°C until no further weight reduction was noted. The results of the experiment were analyzed with ANOVA. Number of repetitions was 3. Means were separated with Tukey's test at 5% p-value.

RESULTS

Significant differences among cultivars in terms of length of the stems, mass of above-ground part of plants, number and mass of tubers, the maximum rooting depth, fresh and dry matter of roots and dry matter content in roots were found (Table 1).

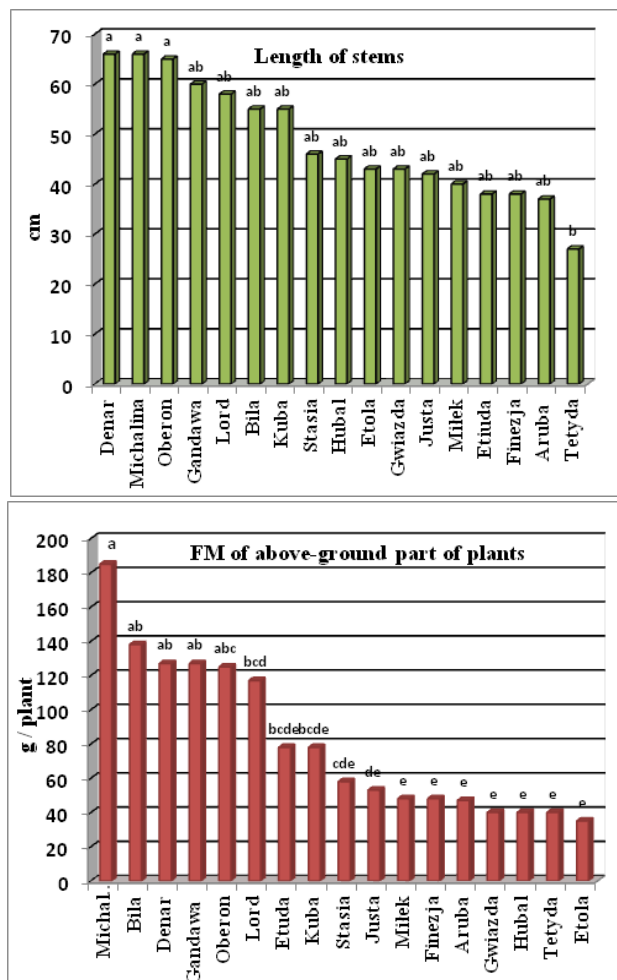
Table 1

Significance level of tested factors from the analysis of variance and mean values of features
Poziom istotności badanych czynników z analizy wariancji i wartości średnie cech

Characteristic Cecha	Source of variation — cultivar Źródło zmienności — odmiana Significance level of the ANOVA Poziom istotności ANOVA	Mean value Średnia
Length of stems in cm — długość pędu w cm	0.0007	48.6
Mass of above-ground part of plants in g/ plant — masa części rośliny powyżej gruntu	<0.0001	81.4
Number of tubers/ plant — liczba bulw z rośliny	<0.0001	3.0
Mass of tubers in g/ plant — masa bulw w g/ na roślinę	<0.0001	21.5
Depth range of roots in cm — zakres głębokości korzeni w cm	0.0011	82.6
Mass of roots in g/ plant — masa korzenie w g/ na roślinę	<0.0001	38.8
Dry matter of roots in g/ plant — sucha masa korzeni w g/ na roślinę	<0.0001	2.24
Root dry matter content in % — zawartość suchej masy korzeni w %	<0.0001	5.74

State growth of the above-ground parts of plants and tubers at the start of the root system studies

It was found that the cultivars with the highest stems belong to all groups of maturity: Denar (very early), Michalina (early) and Oberon (medium early) (Fig. 1). Between the length of stems and the above-ground part of plants of tested cultivars a significant positive correlation was found (Table 2). Michalina cultivar produced the highest fresh matter of the above-ground part and the cultivars Stasia, Justa, Miłek, Finezja, Aruba, Gwiazda, Hubal, Tetyda and Etola — the smallest (Fig. 1). These cultivars also belonged to all groups of maturity class.

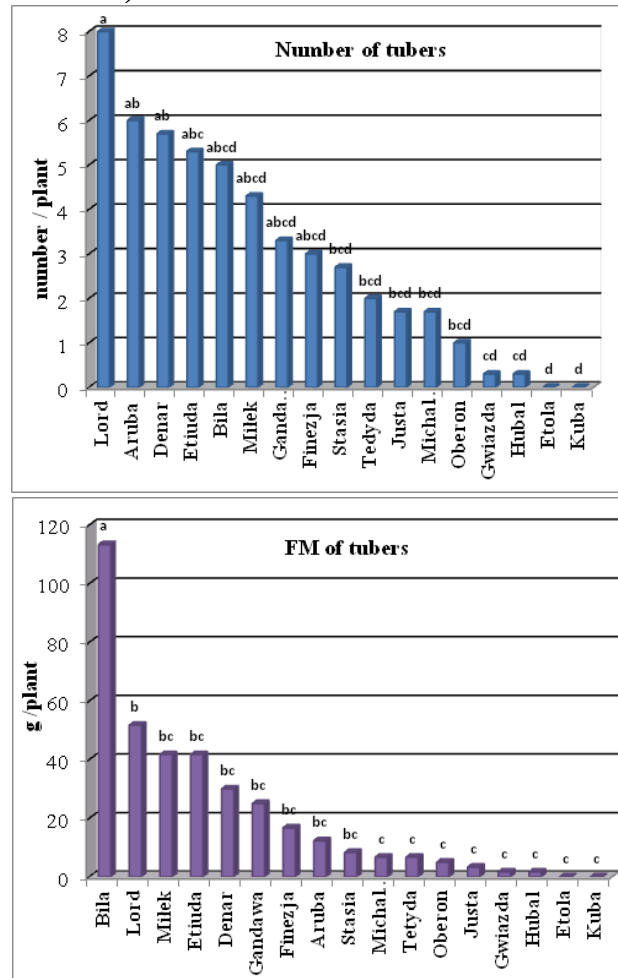


Explanation — Objaśnienie:

FM – fresh matter; a, b, c, d, e - mean values followed by the same letters are not significantly different at the 0.05 level according Tukey's test; FM – świeża masa; a, b, c, d, e – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie 0,05 według testu Tukeya

Fig. 1. Length of stems and fresh matter of above-ground part of plants
Rys. 1. Długość łodyg i świeża masa części nadziemnej roślin

Between the growth of the above-ground part of plants and the number and matter of tubers there was a significant positive correlation, but after 49 days from planting most of the tested cultivars were at the initial phase of tuberization (Table 2, Fig. 2). The highest number of tubers were produced by the very early cultivar Lord and the largest matter by the early cultivar Bila. Cultivars Etola and Kuba were still in a very early stage of tuberization (tuber initiation).



Explanation — Objaśnienie:

FM – fresh matter; a, b, c – mean values followed by the same letters are not significantly different at the 0.05 level according Tukey's test

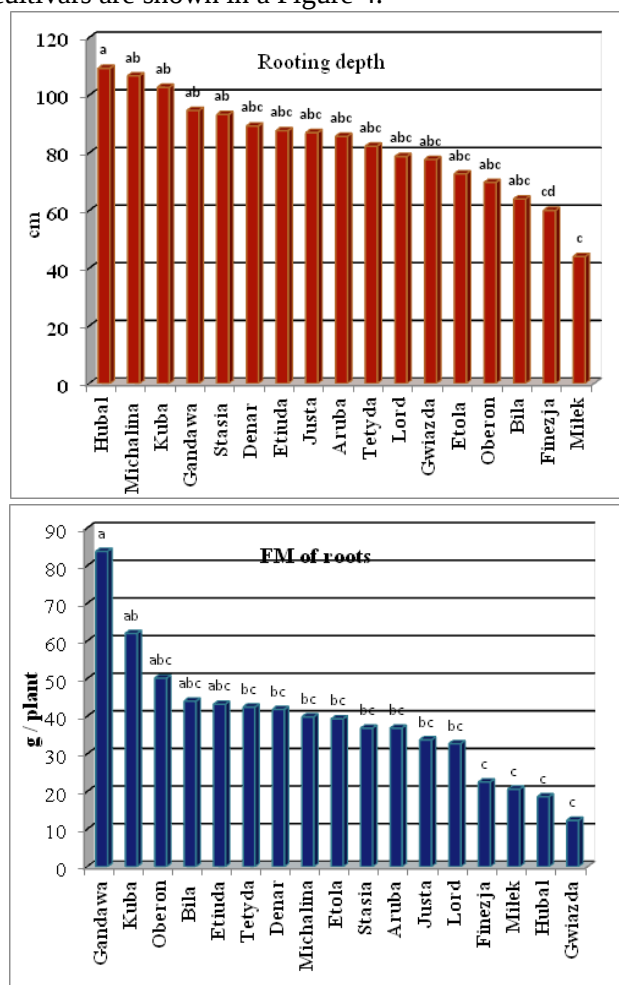
FM – świeża masa; a, b, c – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie 0,05 według testu Tukeya

Fig. 2. Number and fresh matter of tubers

Fig. 2. Liczba i świeża masa bulw

Characteristics of the root system

Rooting depth of the tested cultivars reached maximum value 109 cm, however it was characterized by high variation (Fig. 3). The cultivars Hubal, Michalina and Kuba were characterized by the longest roots while the very early cultivar Miłek the shortest. The fresh matter of the roots was significantly positively correlated with the rooting depth and the length of stems, and the fresh matter of above-ground part of plants, however the ranking of cultivars in this regard was slightly different (Table 2, Fig. 3). The roots of the very early and medium early cultivars are shown in a Figure 4.



Explanation — Objaśnienie:

FM – fresh matter; a, b, c - mean values followed by the same letters are not significantly different at the 0.05 level according Tukey's test

FM – świeża masa; a, b, c – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie 0,05 według testu Tukeya

Fig. 3. Rooting depth and FM of roots
Rys. 3. Głębokość zasięgu i świeża masa korzeni

Table 2

Correlation coefficients among the tested plant features
Współczynniki korelacji między badanymi cechami roślin

Feature Cecha	Length of stems Długość pędu	FM of a-g part Św.mas.cz. rośl. pow. gruntu	Number of tubers Liczba bulw	FM of tubers świeża masa bulw	Rooting depth Głębokość ukorzenia	FM of roots Świeża masa korzeni	DM of roots Sucha masa korzeni	Root DM (%) Sucha masa korzeni
Length of stems	+ 1.00	+ 0.87**	+ 0.08	+ 0.17	+ 0.27*	+ 0.45**	+ 0.40**	+ 0.07
FM of a-g part	+ 0.87**	+ 1.00	+ 0.29*	+ 0.40**	+ 0.21	+ 0.42**	+ 0.49**	+ 0.21
Number of tubers	+ 0.08	+ 0.29*	+ 1.00	+ 0.66**	- 0.24	+ 0.03	+ 0.02	+ 0.00
FM of tubers	+ 0.17	+ 0.40**	+ 0.66**	+ 1.00	- 0.42**	+ 0.07	+ 0.02	+ 0.14
Rooting depth	+ 0.27*	+ 0.21	- 0.24	- 0.42**	+ 1.00	+ 0.31*	+ 0.40**	+ 0.48**
FM of roots	+ 0.45**	+ 0.42**	+ 0.03	+ 0.07	+ 0.31*	+ 1.00	+ 0.95**	+ 0.00
DM of roots	+ 0.40**	+ 0.49**	+ 0.02	+ 0.02	+ 0.40**	+ 0.95**	+ 1.00	+ 0.30*
Root DM (%)	+ 0.07	+ 0.21	+ 0.00	+ 0.14	+ 0.48**	+ 0.00	+ 0.30*	+ 1.00

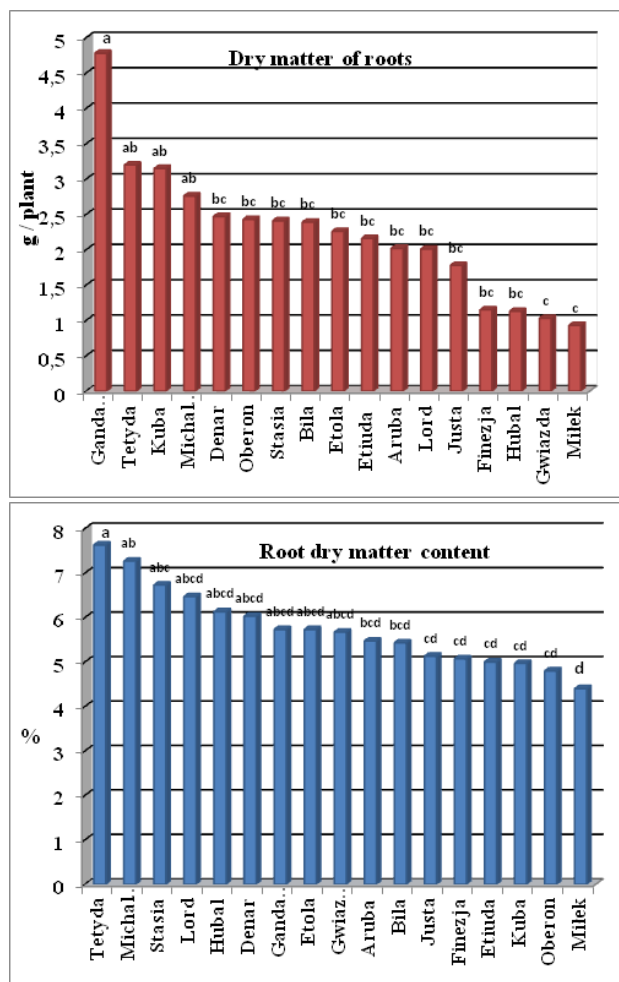
Explanations: a-g - above-ground; FM – fresh matter; DM - dry matter; * - significant at the level $P < 0.05$; ** - significant at the level $P < 0.01$



Fig.4. Root systems of very early cultivar Lord and medium early cultivar Tetyda 49 days after planting

Rys. 4. System korzeniowy bardzo wczesnej odmiany Lord i średnio wczesnej odmiany Tetyda 49 dni po posadzeniu

Dry matter of the roots was the highest in medium early cultivar Gandawa and the lowest in cultivars Gwiazda and Miłek (Fig. 5). There were positive correlations between the dry matter of roots and their fresh matter and the depth range and also the length of stems and the mass of the above-ground parts of plants (Table 2). The dry matter content in roots ranged from 4.4 % in the cultivar Miłek to 7.6 % in the cultivar Tetyda (Fig. 5). This feature was positively correlated with the depth range of roots and their dry matter content (Table 2).



Explanation — Objaśnienie:

a, b, c, d - mean values followed by the same letters are not significantly different at the 0.05 level according Tukey's test
a, b, c, d – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie 0,05 według testu Tukeya

Fig. 5. Dry matter of roots and root dry matter content

Rys. 5. Sucha masa korzeni i zawartość suchej masy w korzeniach

DISCUSSION

Observation of root systems under field conditions requires a lot of time and labour (Iwama, 2008). In our laboratory we applied the device for the production of potato minitubers in aeroponics of our own design, which allows the study of the root system in its entirety without damaging fragments thereof, that can happen for both field trials and the pot experiments.

In carrying out studies on the potato root system, the time for analysis is important. In our experience, we decided on the period of tuberization. At that time the roots are well developed and do not show signs of ageing (Rykaczewska, 2009). Period analysis of the roots in other studies varied and was performed on several dates (Vos and Groenwold 1986; Głuska, 2004; Lahlou and Ledent, 2005; Iwama, 2008) or fell at the beginning of plant maturity (Głuska, 2004; Iwama, 2008; Wishart et al., 2013). In our study, the fresh matter of the above-ground part of plants of particular cultivars during flowering stage was not dependent on the group of maturity class. Lack of close relationship between these features is emphasized in the literature (eg Rykaczewska, 2013). However the most important observation was a significant correlation between the mass of the aboveground parts of the plant and the mass of roots. Similar results were obtained by Iwama (2008) on Japanese cultivars. However, in previous studies on Polish cultivars, there is no reference of the size of the root system to the size of above-ground parts of plants (Głuska, 2004).

The maximum rooting depth of studied cultivars in our experiment reached 109 cm. In studies conducted at the beginning of potato plant maturation the roots reached a similar depth range, 105–126 cm (Głuska, 2004). Some authors express the size of the root system in relation to the unit area, or as the total length of all roots of a single plant. Iwama (2008) showed that the variation in root length per unit area varied from 0.38 to 4.86 km m⁻² in wild potato relatives, while it varied from 1.12 to 1.69 km m⁻² in cultivars and from 0.63 to 1.40 km m⁻² in breeding lines. Wishart et al. (2013) calculated that total root length of twenty-eight genotypes varied from 40 to 112 m per plant. The often used measure of potato root system is the dry matter of roots. In our study, it was highly correlated with the length of the stems and the above-ground part of plants. In studies by Lahlou and Ledent (2005) in pot experiments in a greenhouse the dry matter of roots was similar and ranged from 0.84 to 3.80 g per plant, but in the field it was higher, ranging from 1.1 to 11.8 g per plant. Similar results were obtained by Głuska (2004), where in a pot experiment the root dry matter range was even greater, from 0.5 to 11.4 g per plant. Cited authors have not studied the correlation of dry matter of roots with the fresh matter of the above-ground part of plants. Dry matter concentration in roots in our study averaged 5.74%, and ranged from 7.63% to 4.40%. These results are similar to those obtained by Iwama (2008), where the roots of examined potato cultivars growing under field conditions had an average of 7.1–7.4 % dry matter content.

Conducting our research with the aforementioned cultivar Tetyda with high tolerance to heat and drought stresses during the growing season (Rykaczewska, 2015 a) as one of the 17 potato cultivars, made it possible to show that the roots of Tetyda were characterized by the highest content of dry matter, although the advancement of its vegetation was less

than many other cultivars studied. However, the demonstration of a relationship between tolerance of cultivars to heat and drought stresses during the growing season and the dry matter content in the roots will require further research.

CONCLUSION

Under global climate change, potato tolerance to abiotic stresses, high temperature and drought, will become more important for gaining stable yields in the future. Breeding of new cultivars with excellent root characteristics will contribute to more efficient utilization of water for potato production and will improve tolerance to high temperature during growing season. That is why morphological research in root characteristics should be continued in the future. The results of the studies presented in this paper made it possible to demonstrate the high variability of tested cultivars in terms of the many features of roots and their correlations. The demonstration of a relationship between tolerance of cultivars to heat and drought stresses during the growing season and the dry matter content in the roots will require further research.

REFERENCES

- Birch P. R. J., Bryan G., Fenton B., Gilroy E., Hein I., Jones J.T., Prashar A., Taylor M. A., Torrance L., Toth I. K. 2012. Crops that feed the world 8: Potato: are the trends of increased global production sustainable? *Food Security* 4: 477 — 508.
- De Smet I., White P.J., Bengough A. G., Dupuy L., Parizot B., Casimiro I., Heidstra R., Laskowski M., Lepetit M., Hochholdinger F., Draye X., Zhang H. M., Broadley M. R., Peret B., Hammond J.P., Fukaki H., Mooney S., Lynch J. P., Nacry P., Schurr U., Laplaze L., Benfey P., Beeckman T., Bennett M. 2012. Analyzing lateral root development: how to move forward? *Plant Cell* 24, 1: 15 — 20.
- Ewing E. E. 1981. Heat stress and tuberization stimulus. *Am. Potato J.* 58: 31 — 49.
- Głuska A. 2004. Zróżnicowanie wielkości systemu korzeniowego u odmian ziemniaka. *Biul. IHAR* 232: 37 — 46.
- Haynes K.G., Haynes F. L., Henderson W. R. 1989. Heritability of specific gravity of diploid potato under high-temperature growing conditions. *Crop Sci.* 29: 622 — 625.
- Hijmans R. J. 2003. The effect of climate change on global potato production. *Am J Potato Res.* 80: 271 — 280.
- Iwama K. 2008. Physiology of the Potato: New Insights into Root System and Repercussions for Crop Management. *Potato Res.* 51: 333 — 353.
- Kooman P. L., Haverkort A. J. 1995. Modeling development and growth of the potato crop influenced by temperature and daylength. In: Haverkort. A. J. and D. K. L. MacKerron, Eds., *Potato Ecology and Modeling of Crop under Conditions Limiting Growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 41 — 59.
- Krauss A., Marschner H. 1984. Growth rate and carbohydrate metabolism of potato tubers exposed to high temperatures. *Potato Res.* 27: 297 — 303.
- Lafta A. H., Lorenzen J. H. 1995. Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. *Plant Physiology* 109: 637 — 643.
- Lahlou O., Ledent J. F. 2005. Root mass and depth, stolons and roots formed on stolons in four cultivars of potato under water stress. *Europ. J. Agronomy* 22: 159 — 173.
- Rolot J.-L., Seutin H., Michelante D. 2002. Production de minitubercules de pomme de terre par hydroponie: évaluation d'un système combinant les techniques "NFT" et "Gravel Culture" pour deux types de solutions nutritives. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 6, 3: 155 — 161.
- Rykaczewska K. 1993. Effect of temperature during growing season and physiological age of minitubers on potato plant development and yield. *Bull Potato Inst.* 42: 39 — 46.

- Rykaczewska K. 2009. Rapid multiplication of potato minitubers using hydroponic. *Biul. IHAR* 253: 277 — 284.
- Rykaczewska K. 2013 a. Assessment of potato mother tubers vigour using the method of accelerated ageing. *Plant Prod. Sci.* 16: 171 — 182.
- Rykaczewska K. 2013 b. The impact of high temperature during growing season on potato cultivars with different response to environmental stresses. *Am. J. Plant Sci.* 4: 2386 — 2393.
- Rykaczewska K. 2015 a. The effect of high temperature occurring in subsequent stages of plant development on potato yield and tuber physiological defects. *Am. J. Pot. Res.* DOI: 10.1007/s12230-015-9436-x.
- Rykaczewska K. 2015 b. The effect of meteorological conditions during the growing season and physiological age of potato plants on chlorophyll fluorescence parameters. *Acta Physiol Plant* ACPD-D-15-00293.
- Silberbush M. 2013. Root study: why is it behind other plant studies? *Am. J. Plant Sci.* 4, 198 — 203.
- Struik P. C., Geertsema J., Custers C.H.M.G. 1989 a. Effect of shoot, root and stolon temperature on the development of the potato (*Solanum tuberosum* L) plant. I. Development of the haulm. *Potato Res.* 32: 133 — 141.
- Struik P. C., Geertsema J., Custers C.H.M.G. 1989 b. Effect of shoot, root and stolon temperature on the development of the potato (*Solanum tuberosum* L) plant. III. Development of tubers. *Potato Res.* 32: 151 — 158.
- Tracy S. R., Black C. R., Roberts J. A., Mooney S. J. 2011. Soil Compaction: a review of past and present techniques for investigating effects on root growth. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 9: 1528 — 1537.
- Van Dam J., Kooman P. L., Struik P.C. 1996. Effects of temperature and photoperiod on early growth and final number of tubers in potato (*Solanum tuberosum* L). *Potato Res.* 39: 51 — 62.
- Villordon A. Q., Ginzberg I., Firon N. 2014. Root architecture and root and tuber crop productivity. *Trends in Plant Science* 19: 419 — 425.
- Vos J., Groenwold J. 1986. Root growth of potato crops on marine-clay soil. *Plant and Soil* 94: 17 — 33.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M. R. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environ Exp Bot.* 61: 199 — 223.
- Wishart J., George T. S., Brown L. K., Ramsay G., Bradshaw J. E., White P. J., Gregory P. J. 2013. Measuring variation in potato roots in both field and glasshouse: the search for useful yield predictors and a simple screen for root traits. *Plant Soil* 368: 231 — 249.

ACKNOWLEDGEMENT

The author offers special thanks for the valuable technical assistance of A. Gajos during the growing season. The research was partly funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development.

KRZYSZTOF KLIMONT¹ZOFIA BULIŃSKA-RADOMSKA¹JÓZEF GÓRKA²¹ Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB w Radzikowie

² Kopalnia Siarki „Jeziórko” S.A. w Jeziorku

Sukcesja zbiorowisk roślinnych na złożu wapna poflotacyjnego pokrywającego teren po otworowej eksploatacji siarki*

Succession of flora communities on soilless deposit of post flotation lime on the post-mining area of sulfur mine

W latach 2010–2013 badano gatunki, które mogą spełniać rolę pionierską w sukcesji naturalnej na złożu wapna poflotacyjnego, którym zapelniono zawodnione niecki osiadania w Kopalni Siarki „Jeziórko”. Oceniano również dynamikę zmian gatunkowych zachodzących w kolejnych latach badań. Badania prowadzono na dwóch doświadczeniach. Na pierwszym doświadczeniu założonym w łanie kostrzewy trzcinowej określano skład botaniczny roślin oraz ich skalę pokrycia i towarzyskości wg Braun-Blanqueta, a także przypisanie im wartości fitosocjologicznych celem określenia ich trwałości w runi oraz dynamiki zmian gatunkowych. Na drugim doświadczeniu porośniętym roślinnością zielną i drzewiastą obserwowano zmiany w składzie gatunkowym i liczebności osobników, a szczególnie te, jakie nastąpiły w następstwie pożaru badanych terenów jesienią 2006 roku. Wyniki prowadzonych badań wykazały, że w łanie kostrzewy trzcinowej porastającej wapno poflotacyjne rośnie udział traw: perzu właściwego (*Agropyron repens* (L.) P.B.), trzcinika piaskowego (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth.) i stokłosy miękkiej (*Bromus mollis* L.), a udział kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata* L.) maleje. Wzrasta również udział mlecza polnego (*Sonchus arvensis* L.), fiołka polnego (*Viola arvensis* Murr.), mniszka pospolitego (*Taraxacum officinale* Web.) i babki lancetowatej (*Plantago lanceolata* L.) oraz motylkowatych wieloletnich: koniczyny białej (*Trifolium repens* L.), koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense* L.) i komonicy różkowej (*Lotus corniculatus* L.). Na terenach podlegających sukcesji spontanicznej maleje udział trzcinika piaskowego, kostrzewy trzcinowej i perzu właściwego na korzyść wielu gatunków roślin dwuliściennych takich jak m.in.: nawłóć kanadyjska (*Solidago canadensis* L.), nawłóć pospolita (*Solidago virga-aurea* L.) i nawłóć późna (*Solidago serotina* Ait.), komonica różkowa (*Lotus corniculatus* L.) i ostrożeń polny (*Cirsium arvense* (L.) Scop.). Wśród drzew dominują gatunki wierzb (*Salix* sp.) i topól (*Populus* sp.), maleje natomiast udział światłolubnych brzoź (*Betula* sp.), a osobniki kilku innych gatunków występują pojedynczo. Co roku wzrasta liczba taksonów

* Praca przedstawiona na konferencji IHAR — PIB, Zakopane, 3 lutego 2015 roku

Redaktor prowadzący: Henryk J. Czembor

roślinności zielnej i liczba osobników wśród gatunków roślinności drzewiastej. Osady ściekowe wprowadzone do bezglebowego złoża zainicjowały życie biologiczne i aktywizowały procesy glebotwórcze, które wraz z porastającą spontanicznie roślinnością wpływają na tworzenie poziomu organiczno-próchniczego gromadzącego przyswajalne składniki pokarmowe i wodę. Odnotowano zwiększenie zawartości przyswajalnych składników pokarmowych P, K i Mg oraz materii organicznej w złożu pobranym spod roślinności porastającej obydwie doświadczenia oraz niewielkie, ale wyraźne obniżenie pH podłoża zarówno w poziomie organiczno-próchnicznym jak też głębiej, co mogło skutkować zmianami składu gatunkowego roślinności w kolejnych latach badań.

Słowa kluczowe: osady ściekowe, rekultywacja, sukcesja roślinna, tereny poeksploatacyjne kopalni siarki, wapno poflotacyjne

In the years 2010–2013 some species which can play a pioneering role in natural succession were investigated on soilless ground of post-flotation lime cowering the post-mining area of Jeziórko sulfur mine. Dynamics of species changes occurring in successive years was also evaluated. Research was carried out in two experiments. In the first one, established on the field of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), we defined botanical composition of plants and the scale of covering and sociability according to Braun-Blanquet procedure and also their phytosociological value in order to determine their durability in green growth and dynamics of the species changes. In the second experiment, overgrown with herbaceous and ligneous plants, further changes were observed in species composition and the number of specimen resulting from a fire in the area under investigation in autumn 2006. The results of our research showed that in the field overgrown by tall fescue, post-flotation lime increases the share of grasses: couch grass (*Agropyron repens* (L.) P.B.), bush grass (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth.) and soft brome (*Bromus mollis* L.), but the share of orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) decreases. Increase of the share of the following species can be also noticed: field sowthistle (*Sonchus arvensis* L.), field pansy (*Viola arvensis* Murr.), common dandelion (*Taraxacum officinale* Web.), narrowleaf plantain (*Plantago lanceolata* L.) and perennial legume i.e. white clover (*Trifolium repens* L.), red clover (*Trifolium pratense* L.) and bird's-foot-trefoil (*Lotus corniculatus* L.). In the area which undergoes a spontaneous succession the share of bush grass, tall fescue and couch grass undergoes reduction in favor of many species of dicot plants such as: canadian goldenrod (*Solidago canadensis* L.), European goldenrod (*Solidago virga-aurea* L.) and tall goldenrod (*Solidago serotina* Ait.), bird's-foot-trefoil (*Lotus corniculatus* L.), creeping thistle (*Cirsium arvense* (L.) Scop.). Among trees willow (*Salix* sp.) and poplar (*Populus* sp.) species dominate and decreases the share of photophilic birch trees (*Betula* sp.). Some other species appear sporadically. Every year the number of taxa of herbal flora grows and the number of specimen among the species of ligneous plants. Waste sediments introduced to soilless ground initiated a biological life and activated soil-forming processes, which together with spontaneous germination of flora affected the creation of organic and humus level gathering water and available nutrients. We noted an increase of available P, K, Mg nutrients and organic matter in the ground taken from below the flora overgrowing both experimental fields and a small but distinct pH decrease both on organic and humus level and bedrock, that could have lead to specific changes of flora in successive years of the research.

Key words: land reclamation, post exploitation area of sulfur mine, post flotation lime, vegetal succession, waste sediments

WSTĘP

Sukcesja naturalna roślinności zielnej i drzewiastej na terenach poeksploatacyjnych kopalni siarki wydobywanej metodą podziemnego wytopu (otworową) i pokrytych wapnem poflotacyjnym następuje dosyć wolno. Wkroczenie na takie bezglebowe złoża pojedynczych gatunków a następnie wykształcenie się nawet najmniej złożonych zbiorowisk roślinnych wymaga odpowiednio długiego czasu. Gruntowna analiza składu

florystycznego i kolejności wkraczania roślinności wskazuje na warunki ekologiczne występujące na rekultywowanych gruntach i może być przydatna przy doborze roślin do ich zagospodarowywania metodami biologicznymi.

Wapno poflotacyjne ze względu na brak gruzełkowatej struktury i skłonność do zaskorupiania, wysokie pH i brak życia biologicznego nie stanowi dobrego podłoża dla rozwoju roślin. Dopiero wprowadzenie do niego osadów ścieków komunalnych inicjuje i dynamizuje w nim procesy glebotwórcze (Siuta, Jońca, 1997; Jońca, 2000; Klimont i in., 2002; Martyn i in., 2001; Klimont i in., 2013). Na tereny poprzemysłowe najwcześniej samorzutnie wkraczają takie gatunki jak: przymiotno kanadyjskie, pieprzyca gruzowa, wiechlina roczna, bylica pospolita i lucerna siewna (Greszta, Morawski, 1980; Klimont, Bulińska-Radomska, 2009; Klimont i in., 2014) a na gruncie wapna poflotacyjnego pierwsze pojawiają się trawy m.in.: trzcinnik piaszkowy, kostrzewa trzcinowa i perz właściwy, następnie rośliny dwuliścienne m.in. koniczyna biała i podbiał pospolity, a następnie roślinność drzewiasta, głównie wierzby, topole i brzozy (Podyma, 1999, materiały niepublikowane; Klimont, 2010). Na terenach zdegradowanych przez przemysł i gospodarkę komunalną o szybkości i kierunku rozwoju sukcesji naturalnej decydują głównie: rodzaj złoża i jego właściwości fizyczne, chemiczne i mechaniczne, warunki klimatyczne a także skład gatunkowy roślin z obszarów sąsiadujących.

Celem prowadzonych badań było określenie gatunków roślin mogących spełniać rolę pionierską w sukcesji naturalnej na złożu wapna poflotacyjnego, a także ocena dynamiki zmian składu botanicznego zachodzących w kolejnych latach badań z uwzględnieniem chemicznych zmian właściwości złoża.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na terenie poeksploatacyjnym Kopalni Siarki „Jeziorko” niedaleko Tarnobrzega, który pokryto wapnem poflotacyjnym będącym odpadem poprodukcyjnym z pobliskiej odkrywkowej Kopalni Siarki „Machów”, gdzie siarkę elementarną otrzymywano z rudy siarkowej metodą flotacji. Wapno dostarczano na obszar poeksploatacyjny przy pomocy hydrotransportu i zdeponowano na powierzchni ok. 50 ha o miąższości średnio 1,5 m (od 1 do 6 m). Według danych literaturowych (Gołda, 2007; Klimont i in., 2002) wapno poflotacyjne można uznać za glinę średnią pylastą zawierającą następujące zawartości frakcji: piasek — 39%, pył — 27% i części splawialne — 34% w tym 7% iłu koloidalnego, o pH około 7,3.

Na wiosnę 1995 roku powierzchnię wapna poflotacyjnego nawieziono osadami ścieków komunalnych w dawce $250 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$ i dokładnie je z nim wymieszano. Następnie zastosowano nawożenie mineralne w dawce $70 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$, $75 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \cdot \text{ha}^{-1}$ i $100 \text{ kg K}_2\text{O} \cdot \text{ha}^{-1}$. Na przygotowanym gruncie założono dwa doświadczenia. Na pierwszym doświadczeniu (I) o powierzchni 0,25 ha wysiano nasiona kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea* Schreb.). Po zakończeniu wegetacji późną jesienią corocznie zeschniętą ruń kostrzewy ścinano i rozdrabniano. W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki czteroletnich badań prowadzonych w latach 2010–2013, których zakres obejmował rejestrowanie gatunków roślin naczyniowych oraz ich skalę pokrycia i towarzyskości powszechnie stosowaną metodą Braun-Blanqueta,

a także przypisanie im odpowiednich wartości fitosocjologicznych dla określenia trwałości w runi kostrzewy trzcinowej oraz dynamiki zmian w monokulturze tego taksonu w warunkach stresu abiotycznego. Na drugim doświadczeniu (II) nie wysiewano nasion i nie wysadzano żadnych roślin i pozostawiono je bez jakichkolwiek zabiegów agrotechnicznych, a w pracy przedstawiono wyniki z tego doświadczenia za lata 2010–2013 dotyczące składu gatunkowego roślinności zielnej i drzewiastej ze szczególnym uwzględnieniem zmian w składzie botanicznym roślin, jakie nastąpiły na skutek pożaru tych terenów wczesną jesienią 2006 roku. Sukcesję roślinności badano na powierzchni obsianej kostrzewą (doświadczenie I) i podlegającej sukcesji spontanicznej (doświadczenie II). Corocznie obserwacje prowadzono w pełni lata, czyli w okresie lipca i sierpnia. W obydwu doświadczeniach określono w podłożu: zawartość przyswajalnych P, K, Mg i materii organicznej oraz wartość pH, w materiale roślinnym (pędy roślin) zawartość P, K, Mg i Ca. Wariant kontrolny dla obydwu doświadczeń stanowiło podłoże wapna poflotacyjnego bez nawozów mineralnych i osadów ściekowych, nie porośnięte żadną roślinnością, pobrano z niego tylko próbki do analiz chemicznych złoża. Analizę statystyczną danych eksperymentalnych wykonano metodą analizy wariancji, istotność różnic między średnimi badanych cech oceniano testem Tukeya przy $NIR\alpha = 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Warunki pogodowe w czasie prowadzenia badań były zróżnicowane (tab. 1) i wpływały na przebieg wegetacji ocenianych gatunków roślin. Pierwszy rok badań (2010) charakteryzował się ciepłą, obfitą w opady wiosną oraz wilgotnym i ciepłym latem, co sprzyjało wegetacji i bujności roślin. Również drugi rok badań (2011) był ciepły i obfity w opady, głównie w okresie letnim, okazał się on najkorzystniejszy dla wegetacji roślin. Trzeci rok (2012) był mniej korzystny od dwóch poprzednich ze względu na zdecydowanie niższe opady szczególnie w miesiącach wiosennych i letnich oraz upalne lato. Czwarty, ostatni rok badań charakteryzował się późną i w początkowym okresie chłodną wiosną, co opóźniło rozpoczęcie wegetacji roślin, również niedobory wilgoci w miesiącach letnich nie stwarzały korzystnych warunków dla wzrostu i rozwoju roślin.

Wyniki obserwacji za 2010 rok wykazały, że w łanie kostrzewy trzcinowej pojawiły się nowe gatunki roślin. W pierwszym roku prowadzenia obserwacji (2010) odnotowano występowanie 25 gatunków roślin, z czego 7 stanowiły trawy, a 18 rośliny dwuliścienne, w tym 12 wieloletnich (tab. 2). W piętnastym roku od zasiewu, a pierwszym niniejszych badań nadal w łanie dominuje kostrzewa trzcinowa i stanowi zwartą ruń. Ale obok niej odnotowano w znacznej ilości takie gatunki jak perz właściwy (*Agropyron repens* (L.) P.B.), trzcinnik piaskowy (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth.), kupkówka pospolita (*Dactylis glomerata* L.) i mlecz polny (*Sonchus arvensis* L.). W porównaniu do 2009 roku (Klimont, Bulińska-Radomska 2010) przybyły nowe gatunki roślin dwuliściennych, takie jak mlecz kolczasty (*Sonchus asper* (L.) Hill.), koniczyna szwedzka (*Trifolium hybridum* L.), babka zwyczajna (*Plantago maior* L.) i traganek pęcherzykowaty (*Astragalus cicer* L.).

Tabela 1

Suma miesięcznych opadów oraz średnia miesięczna temperatura powietrza w latach 2010–2013
Sums of monthly rainfall and monthly average of air temperature in years 2010–2013

Miesiąc Month	Lata — Years							
	2010		2011		2012		2013	
	suma opadów sum of rainfall (mm)	temp. (°C)	suma opadów sum of rainfall (mm)	temp. (°C)	suma opadów sum of rainfall (mm)	temp. (°C)	suma opadów sum of rainfall (mm)	temp. (°C)
Styczeń January	23,8	-7,6	25,6	-1,0	34,2	-1,8	48,1	-3,4
Luty February	29,2	-1,8	14,2	-3,6	11,3	-7,2	25,2	-0,8
Marzec March	16,6	3,6	10,1	3,4	23,0	4,9	56,6	-1,5
Kwiecień April	34,1	9,4	49,9	10,8	29,2	9,9	31,8	9,0
Maj May	168,4	14,0	30,7	14,3	41,2	16,2	88,6	15,1
Czerwiec June	44,8	17,8	55,5	18,5	76,5	17,9	111,2	18,3
Lipiec July	125,7	21,2	382,9	18,1	53,6	21,2	33,4	19,5
Sierpień August	106,1	19,5	17,8	19,0	38,8	19,1	14,9	19,5
Wrzesień September	88,9	12,3	5,9	15,5	39,6	14,9	73,6	12,2
Październik October	9,2	5,6	23,8	8,0	124,0	8,2	5,4	10,3
Listopad November	48,2	6,5	0,0	2,4	21,7	5,4	73,7	5,3
Grudzień December	34,3	-4,7	21,3	1,8	24,0	-3,3	11,0	1,4
RO	729,3	8,0	637,7	8,9	517,1	8,7	573,5	8,7

RO — roczna suma opadów i średnia roczna temperatura powietrza; annual amount of rainfall and average temperature

W kolejnym roku badań, tj. 2011 odnotowano obecność następnych 3 gatunków roślin wieloletnich: bylicy pospolitej (*Artemisia vulgaris* L.), kostrzewy łąkowej (*Festuca pratensis* Huds.) i krwawnika pospolitego (*Achillea millefolium* L.) a w 2012 również 3 dalsze: koniczyna łąkowa (*Trifolium pratense* L.), lepnica biała (*Silene latifolia* Poir. ssp. *alba* (Mill.) Greuter&Burdet) i ostrożeń polny (*Cirsium arvense* (L.) Scop.). W osiemnastym roku od wysiewu, a ostatnim (2013) roku prowadzenia niniejszego etapu badań dotyczących kolejności i liczby gatunków pojawiających się w łanie kostrzewy trzcinowej wykorzystanej do rekultywacji metodami biologicznymi wapna poflotacyjnego wzbogaconego osadem ścieków komunalnych, odnotowano występowanie 36 gatunków roślin, z czego 10 stanowią formy krótkotrwałe a 26 wieloletnie. Występuje tam 8 gatunków traw i 9 gatunków roślin motylkowatych, w tym 8 wieloletnich. W odniesieniu do roku poprzedniego pojawiło się w składzie botanicznym 5 nowych taksonów: trzcina pospolita (*Phragmites communis* Trin.), marchew polna (*Daucus carota* L.), cykoria podróżnik (*Cichorium intybus* L.), nostrzyk żółty (*Melilotus officinalis* (L.) Lam. em.

Thuill) i wrotycz pospolity (*Tanacetum vulgare* L.). Z kolei w odniesieniu do ostatniego (2009) roku z poprzedniego, również czteroletniego, cyklu badań (Klimont, Bulińska-Radomska 2010), skład gatunkowy ładu kostrzewy wzbogacił się o 15 gatunków roślin.

Tabela 2

Zdjęcia fitosocjologiczne wykonane w lipcu i sierpniu metodą Braun-Blanqueta roślinności porastającej złoża wapna poflotacyjnego w latach 2010–2013
Phytosociological pictures of flora overgrowing soilless deposit of post-flotation lime in years 2010–2013 taken in July and August by the Braun-Blanquet procedure

Gatunek rośliny Plant species	Lata — Years							
	2010		2011		2012		2013	
	ilościowość towarzyskość abundance sociability		ilościowość towarzyskość abundance sociability		ilościowość towarzyskość abundance sociability		ilościowość towarzyskość abundance sociability	
	2	3	4	5	6	7	8	9
1	I	II	I	II	I	II	I	II
<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.	5.5	3.3	5.5	3.3	5.5	2.2	5.4	2.1
<i>Dactylis glomerata</i> L.	2.1	–	1.1	–	1.1	–	1.1	–
<i>Calamagrostis epigeios</i> (L.) Roth.	2.2	2.2	2.2	1.2	2.2	1.2	2.2	1.2
<i>Agropyron repens</i> (L.) P.B.	2.2	+1	2.2	+1	2.2	+1	2.3	+1
<i>Sonchus arvensis</i> L.	2.1	1.1	2.1	1.1	2.2	+1	2.2	+1
<i>Viola arvensis</i> Murr.	1.2	–	1.2	–	1.3	–	1.3	–
<i>Poa pratensis</i> L.	1.2	–	1.2	–	1.2	–	1.2	–
<i>Tripleurospermum inodorum</i> (L.) Schulz-Bip.	1.1	–	1.1	–	1.1	–	1.1	–
<i>Bromus mollis</i> L.	1.1	–	2.1	–	2.1	+1	2.2	+1
<i>Taraxacum officinale</i> Web.	+1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2
<i>Capsella bursa pastoris</i> (L.) Med.	+1	–	+1	–	+1	–	+1	–
<i>Erigeron canadensis</i> L.	+1	–	+1	–	1.1	–	1.1	–
<i>Linearia vulgaris</i> (L.) Mill.	+1	–	+1	–	+1	–	+1	–
<i>Lepidium ruderae</i> L.	+1	–	+1	–	+1	–	+1	–
<i>Tussilago farfara</i> L.	+1	2.1	+1	2.1	+1	2.1	+1	2.2
<i>Trifolium repens</i> L.	+1	2.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	2.2
<i>Poa annua</i> L.	+1	–	+1	–	+1	–	+1	–
<i>Lotus corniculatus</i> L.	+1	+1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2
<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
<i>Medicago falcata</i> L.	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
<i>Plantago lanceolata</i> L.	+1	+1	+1	+1	1.2	+1	1.2	+1
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill.	+1	–	+1	–	+1	+1	+1	–
<i>Trifolium hybridum</i> L.	+1	–	1.1	–	1.2	–	1.2	–
<i>Plantago maior</i> L.	+1	–	+1	–	+1	–	+1	–
<i>Astragalus cicer</i> L.	+1	–	+1	–	+1	–	+1	–

c.d. Tabela 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Solidago virga-aurea</i> L.	-,-	+1	-,-	1.1	-,-	1.1	-,-	1.1
<i>Solidago canadensis</i> L.	-,-	+1	-,-	1.1	-,-	1.1	-,-	1.1
<i>Trifolium pratense</i> L.	-,-	+1	-,-	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1
<i>Trifolium arvense</i> L.	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1
<i>Silene latifolia</i>								
<i>Poir.ssp.alba</i> (Mill.)	-,-	+1	-,-	+1	+1	+1	+1	+1
Greuter&Burdet								
<i>Oenothera biennis</i> L.	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1
<i>Arenaria absinthium</i> L.	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1
<i>Salix viminalis</i> L.	-,-	2.2	-,-	2.2	-,-	2.3	-,-	2.3
<i>Salix caprea</i> L.	-,-	2.1	-,-	2.1	-,-	2.1	-,-	2.1
<i>Salix pentandra</i> L.	-,-	2.1	-,-	2.1	-,-	2.1	-,-	2.2
<i>Salix purpurea</i> L.	-,-	2.2	-,-	2.2	-,-	2.2	-,-	2.2
<i>Salix acutifolia</i> Willd.	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1
<i>Populus alba</i> L.	-,-	2.2	-,-	2.2	-,-	2.3	-,-	2.3
<i>Populus nigra</i> L.	-,-	2.2	-,-	2.2	-,-	2.2	-,-	3.3
<i>Populus termula</i> L.	-,-	2.3	-,-	2.3	-,-	2.3	-,-	2.3
<i>Betula pubescens</i> Ehrh.	-,-	2.1	-,-	2.1	-,-	2.1	-,-	1.1
<i>Betula verrucosa</i> Ehrh.	-,-	2.1	-,-	2.1	-,-	1.1	-,-	1.1
<i>Pinus silvestris</i> L.	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1
<i>Quercus rubra</i> L.	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1
<i>Quercus robur</i> L.	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	-,-	-,-	+1	-,-	1.1	-,-	1.1	-,-
<i>Festuca pratensis</i> Huds.	-,-	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1	-,-
<i>Achillea millefolium</i> L.	-,-	-,-	+1	-,-	+1	-,-	+1	-,-
<i>Medicago lupulina</i> L.	-,-	-,-	-,-	+1	-,-	+1	-,-	1.1
<i>Cirsium arvense</i> (L.)								
Scop.	-,-	-,-	-,-	+1	+1	+1	+1	1.1
<i>Phragmites communis</i>								
Trin.	-,-	-,-	-,-	+1	-,-	1.1	-,-	1.1
<i>Astragalus glycyphyllos</i>								
L.	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	+1	+1	+1
<i>Vicia tetrasperma</i> (L.)								
Schreb.	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	+1	-,-	+1
<i>Daucus carota</i> L.	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	+1	+1	+1
<i>Solidago serotina</i> Ait.	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	+1	-,-	1.1
<i>Cichorium intybus</i> L.	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	+1	-,-
<i>Melilotus officinalis</i> (L.)								
Lam. em. Thuill.	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	+1	-,-
<i>Tanacetum vulgare</i> L.	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	+1	-,-
<i>Glechoma hederacea</i> L.	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	+1
<i>Oxalis acetosella</i> L.	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-	+1

I — doświadczenie I; experiment I

II — doświadczenie II; experiment II

Prowadzone badania wykazały, że kostrzewa trzcinowa najbardziej ze wszystkich traw nadaje się do biologicznej rekultywacji bezglebowych gruntów ze względu na bardzo silny system korzeniowy oraz wytrzymałość na suszę i zaskorupianie podłoża, co potwierdzają wyniki pracy Górala i Sybilskiej (2000). Także prace Klimonta (Klimont 2007; Klimont, Bulińska-Radomska, 2008, Klimont, 2012) wykazały, że gatunek ten znakomicie się rozwija na podłożu wapna poflotacyjnego wytwarzając liczne pędy generatywne, tworząc

zwartą ruń. Jest też stosowany najczęściej na tereny pogórnice kopalń węgla kamiennego (Olszewski, 2009). W miejsce niewielkich ubytków i wypadnięć zwartej runi kostrzewy wchodzi perzu właściwy, który ze względu na silne rozłogi mogące sięgać w głąb podłoża, dobrze znosi ekstremalne warunki siedliska, także trzcinnik piaskowy — roślina pionierska w sukcesji naturalnej w zasadzie rozwija się na każdym podłożu oraz z dwuliściennych mleczu polny. Udział kupkówki pospolitej powoli maleje w kolejnych latach badań na korzyść perzu właściwego, stokłosa miękkiej i mleczu polnego. Ten ostatni ma silny, rozgałęziony korzeń z odrostami do tworzenia nowych roślin. Obserwuje się wzrost liczby gatunków roślin motylkowatych z 6 w pierwszym roku badań do 9 w ostatnim czwartym roku. Ze względu na silny palowy system korzeniowy i możliwość wiązania wolnego azotu z powietrza długo utrzymują się w runi, co jest zgodne z doniesieniami Górala (2001). Mniej licznie występowały fiołek polny (*Viola arvensis* Murr.), wiechlina łąkowa (*Poa pratensis* L.) i maruna bezwonna (*Tripleurospermum inodorum* (L.) Schulz. Bip.), pozostałe gatunki występowały pojedynczo wykazując znikome pokrycie.

Na powierzchnię nie obsianą i nie obsadzoną żadnymi roślinami oraz pozostawioną bez jakichkolwiek zabiegów agrotechnicznych wkroczyła roślinność zielna oraz drzewiasta w procesie sukcesji naturalnej (tab. 2). Wyniki badań przeprowadzonych latem 2010 roku pokazały, że zasiedlało go 31 gatunków roślin, z czego 18 stanowiła roślinność zielna, a w niej 3 gatunki traw, wśród nich dominowała kostrzewa trzcinowa, mniejszy udział stanowił trzcinnik piaskowy, a rośliny perzu występowały pojedynczo. Wśród gatunków dwuliściennych obficie występowały rośliny koniczyny białej i podbiału pospolitego, a dość obficie mleczu polnego i mniszka pospolitego, stwierdzono również obecność pojedynczych roślin komonicy różkowej, przelotu pospolitego, lucerny sierpowatej, babki lancetowatej, nawłoci kanadyjskiej i pospolitej, koniczyny łąkowej i polnej, lepnicy białej, wiesiołka dwuletniego i bylicy piołunu. Wśród drzew dominowały wierzby, głównie wiciowa (*Salix viminalis* L.), iwa (*Salix caprea* L.), pięcioprzecikowa (*Salix pentandra* L.), purpurowa (*Salix purpurea* L.) i pojedynczo ostrolistna (*Salix acutifolia* Willd.) a także topole: biała (*Populus alba* L.), czarna (*Populus nigra* L.), osika (*Populus tremula* L.) i brzozy: omszona (*Betula pubescens* Ehrh.) i brodawkowata (*Betula verrucosa* Ehrh.), obserwowano także pojedyncze egzemplarze sosny zwyczajnej (*Pinus silvestris* L.), dębu czerwonego (*Quercus rubra* L.) i szypułkowego (*Quercus robur* L.). Pojedyncze osobniki topól i brzozy sięgały nawet do 10 m wysokości. W porównaniu do ostatniego (2009) roku poprzedniego etapu badań (Klimont, Bulińska-Radomska 2010) przybyło 5 gatunków roślin zielnych i 1 gatunek drzewa. W drugim roku prowadzenia doświadczenia obserwowano pojawienie się nowych wieloletnich gatunków roślinności zielnej: lucerny nerkowatej (*Medicago lupulina* L.), ostrożnia polnego (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) i trzciny pospolitej (*Phragmites communis* Trin.). Wiosną 2012 w trzecim roku badań znaleziono nowe pojedyncze gatunki roślinności zielnej: traganka szerokolistnego (*Astragodus glycyphyllos* L.), wyki czteronasiennej (*Vicia tetrasperma* (L.) Schreb.), marchwi polnej (*Daucus carota* L.) i nawłoci pospolitej (*Selidago serotina* Ait.). W czwartym (2013) roku prowadzenia obserwacji stwierdzono pojawienie się pojedynczych egzemplarzy 2 nowych gatunków roślin: bluszczu kurdybanka (*Glechoma hederacea* L.) i szczawiku zajęczego (*Oxalis acetosella* L.). Odnotowano również dynamiczne zmiany w

liczebności osobników zasiedlających badaną powierzchnię. Wśród roślinności zielnej maleje udział w runi kostrzewy trzcinowej i trzcinnika piaskowego, znikomy jest też udział perzu właściwego, na korzyść wieloletnich roślin dwuliściennych: mniszka lekarskiego (*Taraxacum officinale* Web.), podbiału pospolitego (*Tussilago farfara* L.), koniczyny białej (*Trifolium repens* L.), komonicy zwyczajnej (*Lotus corniculatus* L.), nawłoci pospolitej (*Solidago virga aurea* L.), kanadyjskiej (*Solidago canadensis* L.) i późnej (*Solidago serotina* Ait.), lucerny nerkowatej i trzciny pospolitej. Wśród drzew dominują wierzby i topole, maleje udział światłolubnych brzoź omszonej i brodawkowatej, a ich większe skupiska utrzymują się na obrzeżach doświadczenia, gdzie jest większy dostęp światła, natomiast osobniki sosny zwyczajnej, dębu czerwonego i szypułkowego występują pojedynczo. W ostatnim roku badań a osiemnastym od czasu pozostawienia go bez jakichkolwiek zabiegów pratotechnicznych zaobserwowano występowanie 41 gatunków roślin, w tym 28 gatunków roślinności zielnej i 13 gatunków drzew. Wśród roślinności zielnej zdecydowaną większość stanowiły rośliny wieloletnie, w tym 4 gatunki trwałych traw. W porównaniu do pierwszego roku niniejszych badań zaobserwowano wzbogacenie składu botanicznego doświadczenia o 10 nowych gatunków roślinności zielnej z 18 do 28 taksonów, natomiast liczba roślinności drzewiastej nie uległa zmianie. Natomiast porównując skład botaniczny obserwowany w ostatnim roku niniejszych badań (2013) do pierwszego (2006) roku poprzedniego cyklu badań, w ciągu ośmiu lat prowadzenia doświadczenia liczba gatunków występujących na doświadczeniu wzrosła prawie 2,5 krotnie z 17 do 41 (Klimont, Bulińska-Radomska, 2010), przy czym należy zaznaczyć, że był to zdecydowany wzrost liczby gatunków roślin zielnych z 7 do 28 taksonów a przybyły tylko 3 gatunki drzew. W okresie wiosny na doświadczeniu z kostrzewą trzcinową pojawiły się liczne gatunki typowych chwastów polnych: rogownica pospolita (*Cerastium vulgatum* L.), kurzyślad polny (*Anagallis arvensis* L.), przetacznik trójlistkowy (*Veronica triphyllos* L.), a na terenie podlegającym sukcesji naturalnej tobołki polne (*Thlaspi arvense* L.), przetacznik bluszczykowy (*Veronica hederifolia* L.), nawrot polny (*Lithospermum arvense* L.), których nie obserwowano już w lipcu i czerwcu, podobnie jak w poprzednim cyklu badań.

Porównując skład botaniczny i liczbę gatunków zasiedlających obydwie doświadczenia obserwuje się wyraźne różnice. Doświadczenie polegające na sukcesji naturalnej zasiedla 41 gatunków roślin, z czego 28 stanowią rośliny zielne a 13 roślinność drzewiasta. Natomiast doświadczenie obsiane kostrzewą trzcinową porasta 36 gatunków tylko roślinności zielnej, co wynika z corocznego jesiennego wykaszania pielęgnacyjnego łanu utrudniającego rozwój roślinności drzewiastej. Liczba gatunków zasiedlających tereny sukcesji naturalnej jest wyższa w porównaniu do terenów obsianych podobnie jak w poprzednim cyklu badań (Klimont, Bulińska-Radomska, 2010). O tempie sukcesji roślinnej, ale w odniesieniu do odłogów gruntów ornych donosi Kostuch (2003) wykazując, że jest ona szybsza w górach i tam w początkowym stadium dominują trawy, a na niżu trwa ona dłużej i dominują rośliny dwuliścienne. Natomiast Łabza i in. (2004) podają, że na odłogowanych gruntach z każdym rokiem stają się one bogatsze w gatunki i w tym czasie maleje liczba taksonów krótkotrwałych a rośnie wieloletnich podobnie jak w niniejszych badaniach prowadzonych na rekultywowanym podłożu. Także badania

Podstawki-Chmielewskiej i in. (2004) wykazały, że skład florystyczny zbiorowiska występującego na odłogowanym polu zmierza w kierunku przewagi gatunków wieloletnich i wraz z wiekiem odłogu pojawiają się większa liczba gatunków drzew, podobnie jak w niniejszym doświadczeniu na rekultywowanych terenach sukcesji spontanicznej. Tereny po otworowej eksploatacji siarki są bardziej zdewastowane i trudniejsze do rekultywacji niż te po kopalniach odkrywkowych (Levyk, Brzezińska, 2007). Prace Podymy (1995, materiały niepublikowane), Majtkowskiego i in. (1996), Górala (2001), Klimonta (2007), Klimonta i Bulińskiej-Radomskiej (2008) wykazały pionierską rolę trzcinnika piaskowego na gruntach bezglebowych wapna poflotacyjnego, dominuje on w łanie, szczególnie w miejscach usłonecznionych, a ustępuje, kiedy na obszar wkracza roślinność drzewiasta, podobnie jak w przedmiotowych badaniach. Z traw także kostrzewa trzcinowa charakteryzowała się największym udziałem na terenie doświadczenia opisującego proces sukcesji naturalnej. Jest ona gatunkiem pionierskim w rekultywacji terenów przemysłowych osadników szlamów posodowych (Boroń i in., 2000), składowisk popiołów paleniskowych (Klimont, Bulińska-Radomska, 2009; Klimont i in., 2014; Góral, Rola, 2001), składowisk odpadów komunalnych (Klimont, Bulińska-Radomska, 2010; Klimont i in., 2013), a także do ochrony i rekultywacji gruntów (Góral, 2001). Z drzew dominowały wierzby — 5 gatunków i topole — 3 gatunki, w mniejszym stopniu brzozy.

Boroń i in. (2000) donosi, że na kompleks stawów osadowych posodowych o wysokim pH wkracza w procesie naturalnej sukcesji roślinność drzewiasta: brzozy, topole, wierzby, tworząc skupiska na tle innych pojedynczych gatunków drzew. Te same gatunki drzew, a dodatkowo z traw kostrzewa trzcinowa i stokłosa bezostna stosowane są do rekultywacji terenów pokopalnianych węgla kamiennego (Olszewski, 2009). Również topole, wierzby i brzozy jako gatunki pionierskie pojawiły się na wierzchowinie składowiska popiołów paleniskowych, co pokazały prace Klimonta i Bulińskiej-Radomskiej (2009) i Klimonta i in. (2014). Inne badania pokazały, że wybrane gatunki i mieszańce wierzby bardzo dobrze rozwijają się na bezglebowym gruncie wapna poflotacyjnego użyźnionego osadem ściekowym a ich udatność przyjęć i przeżywalność w tak ekstremalnych warunkach zależy od doboru odpowiedniej formy tej rośliny (Klimont, 2007; Klimont, Bulińska-Radomska, 2010). Na podłożu, gdzie wysiano kostrzewę trzcinową w pierwszych latach po siewie odnotowano pojawienie się roślinności trawiastej: wiechliny rocznej, stokłosa miękkiej i trzcinnika piaskowego, z kolei na gruncie podlegającym sukcesji spontanicznej: przymiotna kanadyjskiego, pieprzycy gruzowej, a w następnej kolejności traw: trzcinnika piaskowego, perzu właściwego i kostrzewy trzcinowej (Podyma 1996–1998, materiały niepublikowane).

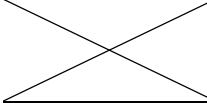
Wapno poflotacyjne (szlamy poflotacyjne), którym pokryte są tereny posiarkowe, jest odpadem przemysłowym pozbawionym życia biologicznego gwarantującego uruchomienie procesów glebotwórczych. Dlatego wprowadzenie do podłoża osadów ściekowych zainicjowało te procesy w martwym podłożu i wraz z porastającą roślinnością wpłynęło na utworzenie poziomu organiczno-próchnicznego gromadzącego przyswajalne formy składników pokarmowych P, K i Mg (Klimont i in., 2002; Klimont, 2011). Wyniki analiz próbek gruntu, na którym prowadzono doświadczenie pokazały, że zawiera on dostatecznie wysoką zawartość wszystkich makroelementów do wzrostu i rozwoju

porastających go roślin. Odnotowano zdecydowanie wyższą zawartość wszystkich badanych składników w podłożu pobranym spod roślinności porastającej doświadczenie, na którym wysiano kostrzewę trzcinową (tab. 3) w stosunku do podłoża podlegającego sukcesji naturalnej — doświadczenie II. Różnice te występowały w każdym roku badań, jak też przy porównaniu średnich wartości za czteroletni cykl badań. W porównaniu do poprzedniego cyklu badań (Klimont, Bulińska-Radomska, 2010) obserwuje się wzrost zawartości przyswajalnego P w podłożu na obydwu doświadczeniach i obydwu poziomach glebowych, spadek zawartości przyswajalnego K także na obydwu doświadczeniach i w każdym poziomie oraz wzrost zawartości Mg, ale tylko w poziomie organiczno-próchnicznym. Nastąpił również wzrost materii organicznej w poziomie organiczno-próchnicznym doświadczenia I i obydwu poziomach glebowych doświadczenia II. Wprowadzenie do wapiennego podłoża osadów ściekowych wraz z porastającą roślinnością wpłynęło na niewielkie, ale zauważalne obniżenie jego pH w obydwu poziomach glebowych na obydwu doświadczeniach, przy czym spadki te w poziomie organiczno-próchnicznym są większe niż głębiej (tab. 3). Zmiany pH podłoża skutkują zmianami flory w kolejnych latach badań (tab. 2, 3). Badania procesów glebotwórczych, które zachodzą w tworzących się glebach terenów poeksploatacyjnych mogą pozwolić na poznanie związków między stadium sukcesji pierwotnej szaty roślinnej a fizycznymi, fizyczno-chemicznymi właściwościami gleb powstających na terenach poeksploatacyjnych (Levyk, Brzezińska, 2007).

Tabela 3

Zawartość składników pokarmowych i materii organicznej w złożu wapna po flotacji oraz w materiale roślinnym pobranym z tego podłoża (2010–2013)
Contents of nutrients and organic matter in the post-flotation lime and plant material (2010–2013)

Gatunek rośliny Plant species	Głębokość pobierania Depth (cm)	Cechy Traits									
		podłoże — substrate									
		pH [w 1n KCl]					P [mg·kg ⁻¹]				
		2010	2011	2012	2013	$\bar{x}$	2010	2011	2012	2013	$\bar{x}$
Kontrola Control	OA	7,60	7,50	7,40	7,30	7,40	12,3	11,4	10,9	5,7	10,1
	C	7,60	7,20	7,30	7,40	7,40	10,4	6,3	7,2	4,8	7,2
I	OA	7,00	7,20	7,20	7,30	7,18	62,8	61,0	84,1	22,2	57,5
	C	7,30	7,30	7,30	7,40	7,32	18,7	14,4	41,2	9,20	20,9
II	OA	7,10	7,10	7,10	7,20	7,12	57,9	50,6	55,8	20,5	46,2
	C	7,30	7,20	7,30	7,30	7,28	22,2	14,8	18,7	13,9	17,4
NIR α = 0,05		r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	8,48	8,48	8,48	8,48	5,98
LSD α = 0,05		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.					
Materiał roślinny — Plant material											
Ca [g·kg ⁻¹]						P [g·kg ⁻¹]					
2010	2011	2012	2013	$\bar{x}$		2010	2011	2012	2013	$\bar{x}$	
I	3,64	4,06	4,54	4,60	4,21	2,76	3,29	3,68	2,10	2,96	
II	3,24	6,73	5,59	3,68	4,81	2,19	4,55	3,45	2,84	3,26	
NIR α = 0,05		r.n.	1,42	r.n.	r.n.	r.n.	1,05	r.n.	r.n.	r.n.	
LSD α = 0,05		n.s.		n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	

Gatunek rośliny Plant species	Głębokość pobierania Depth (cm)	Cechy Traits														
		podłoże — substrate														
		K [mg·kg ⁻¹]					Mg [mg·kg ⁻¹]					materia organiczna organic matter [g·kg ⁻¹]				
		2010	2011	2012	2013	$\bar{x}$	2010	2011	2012	2013	$\bar{x}$	2010	2011	2012	2013	$\bar{x}$
Kontrola Control	OA	14,9	20,8	10,0	30,7	19,1	12,0	11,0	14,0	10,0	11,8	6,1	6,7	9,1	10,5	8,1
	C	12,4	15,7	5,2	8,3	10,4	14,0	9,0	14,0	11,0	12,0	2,3	4,2	3,8	2,0	3,3
I	OA	53,1	84,7	78,0	68,1	71,0	30,0	30,0	22,0	24,0	26,5	65,6	41,4	56,5	77,5	60,2
	C	33,2	37,9	39,1	18,3	32,1	14,0	20,0	12,0	11,0	14,2	12,6	9,2	7,8	8,7	9,6
II	OA	49,8	64,7	55,6	57,2	56,8	24,9	20,0	21,0	14,1	20,0	56,1	33,6	23,7	57,9	42,8
	C	34,0	29,9	28,7	27,4	30,0	14,9	13,0	14,0	10,0	13,0	7,7	8,9	8,8	7,3	8,2
NIR α = 0,05		7,50	7,50	7,50	7,50	5,42	6,10	6,10	6,10	6,10	4,51	10,28	10,28	10,28	10,28	6,94
LSD α = 0,05																
		Materiał roślinny Plant material														
		K [g·kg ⁻¹]					Mg [g·kg ⁻¹]									
		2010	2011	2012	2013	$\bar{x}$	2010	2011	2012	2013	$\bar{x}$					
I		17,2	15,69	31,70	14,90	19,87	1,30	1,35	1,26	1,20	1,28					
II		15,5	17,81	32,56	13,60	19,87	1,56	1,22	1,52	1,40	1,42					
NIR α = 0,05		r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	r.n.					
LSD α = 0,05		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.					

OA — poziom organiczno-próchniczny; organic humus level

C — poziom skały macierzystej; bedrock level

r.n. / n.s — różnica nieistotna; not significant difference

Mogą być one przydatne w czasie rekultywacji biologicznej z zastosowaniem wybranych gatunków roślin obszarów poeksploatacyjnych Kopalni Siarki „Jeziórko”.

WNIOSKI

1. Ukształtowana w wyniku osiemnastoletniej sukcesji szata roślinna charakteryzuje się dość dużą bioróżnorodnością, tereny obsiane kostrzewą trzcinową zasiedla 36 gatunków roślin zielnych a teren poddany sukcesji naturalnej 41 gatunków, w tym 13 drzew.
2. W łąnie kostrzewy trzcinowej rośnie udział traw: perzu właściwego, trzcinnika piaskowego i stokłosa miękkiej, a udział kupkówki pospolitej maleje, z dwuliściennych wzrasta udział mlecza polnego, fiołka polnego, mniszka pospolitego i babki lancetowatej oraz liczba gatunków roślin motylkowatych.
3. Na gruncie podlegającym sukcesji spontanicznej wśród roślinności zielnej maleje udział kostrzewy trzcinowej, trzcinnika piaskowego i perzu właściwego na korzyść wieloletnich roślin dwuliściennych m.in.: mniszka lekarskiego, podbiału pospolitego, koniczyzny białej oraz nawłoci pospolitej, kanadyjskiej i późnej. Wśród drzew dominują gatunki wierzby i topoli, maleje natomiast udział światłolubnej brzozy omszonej i brodawkowatej a okazy dębu szypułkowatego i czerwonego oraz sosny zwyczajnej występują pojedynczo.
4. Osady ściekowe oraz system korzeniowy porastającej roślinności intensyfikują w złożu wapna poflotacyjnego procesy glebotwórcze. Odnotowano zdecydowany wzrost

zawartości materii organicznej oraz przyswajalnych P, K i Mg w próbkach pobranych spod roślinności porastającej powierzchnię obydwu doświadczeń w porównaniu do wariantu kontrolnego, jednocześnie zawartość tych składników jest istotnie wyższa w podłożu obsianym kostrzewą trzcinową w stosunku do tej, która podlega sukcesji spontanicznej.

LITERATURA

- Bajor P., Bulińska-Radomska Z., Klimont K., Osińska A. 2014. Ocena rozwoju roślinności na składowisku popiołów paleniskowych użyźnionych osadem ściekowym. *Problemy Inżynierii Rolniczej* 2 (84): 51 — 61.
- Boroń K., Zając E., Klatka S. 2000. Rekultywacja terenu składowiska odpadów KZS „SOLVAY” w Krakowie. *Inżynieria Ekologiczna* nr 1, PTIE Baranów Sandomierski: 58 — 64.
- Gołda T. 2007. Wykorzystanie szlamów poflotacyjnych rudy siarkowej do rekultywacji terenów poeksploatacyjnych w górnictwie otworowym siarki. *Inżynieria Ekologiczna* nr 19, PTIE Warszawa: 79 — 88.
- Góral S. 2001. Roślinność zielna w ochronie i rekultywacji gruntów. *Inżynieria Ekologiczna* 3, PTIE Bydgoszcz: 161 — 178.
- Góral S., Rola S. 2001. Trawy na popiołach elektrociepłowni nawożonych osadami ściekowymi. *Inżynieria Ekologiczna* 3, PTIE Bydgoszcz: 146 — 150.
- Góral S., Sybilska A. 2000. Przydatność polskich odmian hodowlanych (*Festuca arundinacea* Schreb.) do rekultywacji gruntów zdewastowanych. *Łąkarstwo w Polsce* 3, Poznań: 199 — 204.
- Greszta I., Morawski S. 1980. Zagospodarowanie popiołów dla renowacji środowiska naturalnego. PAN Oddz. Kraków: 56 ss.
- Jońca M. 2000. Zastosowanie osadów ściekowych do rekultywacji gruntów Kopalni Siarki „Jeziórko”. *Inżynieria Ekologiczna* nr 1, PTIE Baranów Sandomierski: 27 — 36.
- Klimont K. 2007. Ocena przydatności wybranych gatunków roślin użytkowych do rekultywacji terenów zdewastowanych przez przemysł i gospodarkę komunalną. *Problemy Inżynierii Rolniczej* 2(56): 27 — 36.
- Klimont K. 2011. Rekultywacyjna efektywność osadów ściekowych na bezglebowym podłożu wapna poflotacyjnego i popiołów paleniskowych. *Problemy Inżynierii Rolniczej* 2: 51 — 61.
- Klimont K. 2012. Ocena przydatności topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.) i kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea* Schreb.) do rekultywacji bezglebowego podłoża wapna poflotacyjnego użyźnionego osadem ściekowym. *Biul. IHAR* 265: 89 — 97.
- Klimont K., Bulińska-Radomska Z. 2009. Badanie rozwoju wybranych gatunków do umacniania składowisk popiołów paleniskowych z elektrociepłowni. *Problemy Inżynierii Rolniczej* 2/2009: 135 — 145.
- Klimont K., Bulińska-Radomska Z. 2010. Ocena przydatności wybranych gatunków roślin miododajnych oraz różnych form *Salix* spp. do rekultywacji terenów zdewastowanych przez przemysł siarkowy. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.* z. 555: 517 — 528.
- Klimont K., Bulińska-Radomska Z. 2010. Sukcesja roślin na terenach poeksploatacyjnych Kopalni Siarki „Jeziórko”. *Biul. IHAR* 257/258: 29 — 37.
- Klimont K., Bulińska-Radomska Z., Górka J. 2013. Możliwość wykorzystania wybranych roślin miododajnych do rekultywacji terenów po eksploatacji siarki. *Polish Journal of Agronomy* 12, Puławy: 17 — 25.
- Klimont K., Bulińska-Radomska Z., Osińska A., Bajor P. 2013. Kształtowanie się składu gatunkowego roślin wprowadzonych i spontanicznie zasiedlających użyźnione składowisko odpadów komunalnych. *Biul. IHAR* 270: 109 — 121.
- Klimont K., Góral S., Jońca M. 2002. Rekultywacyjna efektywność osadów ściekowych na podłożu wapna poflotacyjnego. *Biul. IHAR* 223/224: 415 — 425.
- Kostuch R. 2003. Sukcesja roślinna na odłogowanych gruntach ornych. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie* t. 3 z.2(8): 57 — 78.
- Levyk V., Brzezińska M. 2007. Stan środowiska glebowego na terenie byłej Kopalni Siarki „Jaworów” (Ukraina) i „Machów” (Polska) w świetle aktualnych badań. *Acta Agrophisica* 10(1): 149 — 157.

- Łabza T., Hochół E., Stupnicka-Rodzinkiewicz E. 2004. Zmiany sukcesyjne roślinności pól wyłączonych z uprawy. „Sukcesja wtórna roślinności na gruntach porolnych”. XXVIII Krajowa Konferencja Naukowa z cyklu „Rejonizacja chwastów segetalnych w Polsce”. UW-M Olsztyn 8-10.07.2004: 7.
- Majtkowski W., Podyma W., Góral S. 1996. Gatunki roślin do rekultywacji terenów zdegradowanych przez przemysł i gospodarkę komunalną, w: Nowe rośliny uprawne na cele spożywcze, przemysłowe i jako odnawialne źródło energii. SGGW, Warszawa: 136 — 148.
- Martyn W., Buczek Z., Jońca M., Sowińska J. 2001. Zastosowanie osadów ściekowych w rekultywacji terenów pogórnich w Kopalni Siarki „Jeziórko”. Inżynieria Ekologiczna nr 3, PTIE Bydgoszcz: 99 — 105.
- Olszewski P. 2009. Funkcje użytkowe szaty roślinnej na terenach likwidowanych kopalni węgla kamiennego w zagłębiu dąbrowskim i ich wykorzystanie w procesie rekultywacji. Prace Naukowe GIG, Górnictwo i środowisko 3: 89 — 111.
- Podstawka-Chmielewska E., Pałys E., Kurus I. 2004. Sukcesja roślinna w czasie 10-letniego odłogowania gruntów ornych na glebie lekkiej. „Sukcesja wtórna roślinności na gruntach porolnych”. XXVIII Krajowa Konferencja Naukowa z cyklu „Rejonizacja chwastów segetalnych w Polsce”. UW-M Olsztyn 8-10.07.2004: 36.
- Siuta J., Jońca M. 1997. Rekultywacyjne działanie osadu ściekowego na wapnie poflotacyjnym w Kopalni Siarki „Jeziórko”. Mat. konf. „Przyrodnicze użytkowanie osadów ściekowych”, IOŚ Puławy-Lublin-Jeziórko 26–28 V 1997: 39 — 48.
- Wiśniewska-Kielian B., Lipiński W. 2007. Ocena składu chemicznego roślin. Oddz. Krakowski PTIE, Krajowa Stacja Chemiczno-Rolnicza — Kraków-Warszawa-Wrocław: 57 ss.

SPIS TREŚCI — CONTENTS

Agnieszka Niedziela Weronika Jarska Piotr T. Bednarek	Wybrane elementy nowoczesnych rozwiązań wpływające na skuteczność programów hodowlanych Up-to-date solutions in modern plant breeding programs	3
Weronika Jarska Agnieszka Niedziela Renata Orłowska Piotr T. Bednarek	Strategie molekularne w nowoczesnej hodowli roślin Molecular strategies in modern plant breeding	17
Tadeusz Drzazga Marcin Studnicki	Analiza adaptacji środowiskowej rodów hodowlanych w wielokrotnych, jednorocznych doświadczeniach, na przykładzie plonowania rodów pszenicy ozimej Evaluation of adaptability to environments of varieties in multiple annual trials: a case study of winter wheat	29
Bogna Zawieja Andrzej Bichoński	Selekcja rodów hodowlanych jęczmienia jarego na podstawie analizy statystycznej trzyletniej serii doświadczeń The selection of breeding lines of spring barley on the basis of statistical analysis of three year trial series	39
Wojciech Rybiński Tadeusz Adamski Maria Surma Jan Bocianowski	Uzyskiwanie haploidów i ocena zmienności cech ilościowych linii dihaploidalnych jęczmienia jarego z wykorzystaniem metody <i>Hordeum bulbosum</i> i mutagenazy Obtaining of haploids with use of <i>Hordeum bulbosum</i> method and mutagenesis and analysis of quantitative traits variation in spring barley DH lines	51
Elżbieta Mielniczuk Irena Kiecana Małgorzata Cegiełko Alina Pastucha Juliusz Perkowski	Wpływ sztucznego zakażania owsa przez <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc. na plon oraz zawartość mikotoksyn w ziarnie The effect of artificial inoculation of oat with <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc. on the yield and mycotoxin content in the grain	65
Irena Kiecana Małgorzata Cegiełko Elżbieta Mielniczuk Alina Pastucha	Występowanie fuzariozy wiech owsa w 2013 roku oraz szkodliwość <i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb. dla wybranych odmian Incidence of oat scab in 2013 and pathogenicity of <i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb. to selected cultivars	77
Cezary Trawczyński	Właściwości chemiczne gleby lekkiej w ekologicznym systemie produkcji The chemical properties of light soil in organic system of agricultural production	89
Krystyna Rykaczewska	Morphology and anatomy of the root system of new potato cultivars Part I. Morphology of the root system Morfologia i anatomia systemu korzeniowego nowych odmian ziemniaka Część I. Morfologia systemu korzeniowego	99
		129

Krzysztof Klimont	Sukcesja zbiorowisk roślinnych na złożu wapna po flotacyjnego	111
Zofia Bulińska-Radomska	pokrywającego tereny po otworowej eksploatacji siarki	
Józef Górka	Succession of flora communities on soil less deposit of post flotation lime on the post- mining area of sulfur mine	