

Rdza na jęczmieniu. *Fot. Marta Dmochowska-Boguta*

**BIULETYN
INSTYTUTU HODOWLI
I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
NR 288/2020**



INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
RADZIKÓW, 05-870 BŁONIE

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Dyrektor: Prof. dr hab. Henryk Bujak

Komitety Redakcyjne

NAUKA

Redaktor Naczelny: Danuta Boros

Maja Boczkowska, Henryk J. Czembor, Anna Linkiewicz, Wiesław Mądry, Katarzyna Mikołajczyk,
Sławomir Podlaski, Barbara Zagdańska

WDROŻENIA

Redaktor Tematyczny: Wojciech Nowacki

Józef Adamczyk, Karol Bujoczek, Andrzej Chodkowski, Wiesław Dzwonkowski, Edward Gacek, Piotr
Kamiński, Karol Marciniak, Przemysław Matysik, Juliusz Młodecki, Jarosław Mostowski, Adam Stę-
pień, Roman Warzecha, Sławomir Wróbel

KONFERENCJE

Redaktor Tematyczny: Magdalena Szechyńska-Hebda

Katarzyna Gacek, Wiesław Podyma

Czasopismo ukazuje się od 1951 roku

Redaktor techniczny i skład komputerowy: Aleksandra Pindor

Wykorzystanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*

Use of molecular and phenotypic markers to identify wheat eyespot resistance genes caused by *Oculimacula yallundae* and *O. aciformis*

Maciej Majka¹, Magdalena Gawłowska¹, Adriana Twardawska¹, Marek Korbas², Jakub Danielewicz², Tomasz Góral³, Bogusława Ługowska⁴, Jolanta Belter¹, Edward Witkowski⁵, Tadeusz Drzazga⁶, Przemysław Matysik⁷, Urszula Woźna-Pawlak⁸, Halina Wiśniewska¹ ✉

¹ Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

² Instytut Ochrony Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

³ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie

⁴ DANKO Hodowla Roślin, Choryń 27, 64-000 Kościan

⁵ Hodowla Roślin Smolice, Grupa IHAR, Smolice 134, 63-740 Kobylin

⁶ Małopolska Hodowla Roślin, ul. Sportowa 21, 55-040 Kobierzyce

⁷ Hodowla Roślin Strzelce, Grupa IHAR, Główna 20, 99-307 Strzelce

⁸ Poznańska Hodowla Roślin, Antoniny 2, 64-100 Leszno

✉ e-mail: hwis@igr.poznan.pl

Łamliwość źdźbła to jedna z ważniejszych chorób pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) powodowana przez dwa grzyby patogeniczne *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula aciformis*. Istnieje kilka źródeł odporności na ten patogen, lecz jak dotąd tylko dwa geny *Pch1* i *Pch2* zostały przniesione do pszenicy uprawnej i warunkują odporność. Wybranie najkorzystniejszych markerów molekularnych dla określenia obecności genów odporności na łamliwość źdźbła u pszenicy może poprawić skuteczność i dokładność przy wyborze genotypów odpornych na tę chorobę. Celem pracy było określenie efektywności markerów molekularnych i markera izoenzymatycznego dla genów *Pch1* i *Pch2* oraz wytypowanie genotypów pszenicy ozimej o podwyższonej odporności w odniesieniu do porażenia roślin w testach inokulacyjnych przeprowadzonych w fazie siewki oraz rośliny dojrzałej. Materiał badawczy stanowiło 159 linii hodowlanych pszenicy ozimej oraz pięć odmian kontrolnych: Artist, Kilimanjaro, Kometa, Patras i Rendezvous. Do identyfikacji genów odporności wykorzystano pięć markerów, trzy do identyfikacji genu *Pch1* (*EpD1b*, *XustSSR2001-7DL*, *Xorw1*) oraz dwa dla genu *Pch2* (*Xcfa2040*, *Xwmc525*). Biorąc pod uwagę analizę molekularną genów, wyniki inokulacji siewek oraz wyniki porażenia źdźbeł dojrzałych roślin, stwierdzono brak objawów porażenia źdźbeł u linii/odmian pszenicy ozimej, u których zidentyfikowano oba geny *Pch1* i *Pch2*. Stwierdzono u nich również najniższe porażenie siewek. Najwyższy procent porażonych źdźbeł odnotowano u genotypów, gdzie nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2*. U tych genotypów zaobserwowano również najwyższe porażenie w teście siewkowym. Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna oraz na masę tysiąca ziarniaków (MTZ). U genotypów z genami *Pch1* i *Pch2* stwierdzono nieznacznie wyższe wartości dla obu parametrów technologicznych.

Słowa kluczowe: geny odporności, łamliwość źdźbła, *Pch1*, *Pch2*, *Triticum aestivum*

Eyespot is one of the most important diseases of wheat (*Triticum aestivum* L.), caused by two pathogenic fungi *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula aciformis*. There are several sources of resistance to this pathogen, but so far only two genes *Pch1* and *Pch2* have been transferred to wheat and confer the resistance. The selection of the most favorable genetic markers for determining the presence of eyespot resistance genes may improve the efficiency and accuracy in the selection of wheat genotypes resistant for this disease. The aim of the work was to determine the effectiveness of molecular markers and protein marker for *Pch1* and *Pch2* genes and to select genotypes of winter wheat with increased resistance in relation to plant infection in inoculation tests carried out at the seedling and adult plant stage. Plant material consist of 159 breeding lines of winter wheat and five control varieties: Artist, Kilimanjaro, Kometa, Patras and Rendezvous. To identify resistant genes, five molecular markers were used. Three for *Pch1* gene (*EpD1b*, *XustSSR2001-7DL*, *Xorw1*) and two for *Pch2* gene (*Xcfa2040*, *Xwmc525*). Considering the molecular analysis of genes, results of seedlings inoculation and the results of plant stem infestation, it was found that there were no infection symptoms of stalks in the winter wheat lines and/or varieties, in which both *Pch1* and *Pch2* genes were identified. In these lines/varieties, the lowest infection of seedlings was also observed. The highest percentage of infected sheaths was identified in genotypes where *Pch1* and *Pch2* genes were not found. The highest seedling infection was also observed for these genotypes. It was shown that the presence of *Pch1* and *Pch2* genes or their absence did not significantly affect the grain yield and the thousands kernels weight (TKW). Genotypes with the *Pch1* and *Pch2* genes showed slightly higher values for both technological parameters.

Key words: resistance genes, eyespot, *Pch1*, *Pch2*, *Triticum aestivum*

Wstęp

Łamliwość źdźbła to jedna z ważniejszych chorób pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) oraz innych zbóż. Powodowana jest przez dwa grzyby patogeniczne *Oculimacula yallundae* (Wallwork & Spooner) Crous & W. Gams i *Oculimacula aciformis* (Nirenberg) Y. Marin & Crous (Fron, 1912; Deighton, 1973). Występuje szczególnie podczas łagodnych zim i chłodnych wiosen, kiedy to na zewnętrznych pochwach liści pojawiają się bursztynowo-brązowe plamy będące objawem infekcji grzybów patogennych. W trakcie wegetacji patogen z pochw liściowych przedostaje się na podstawy źdźbła, gdzie na obszarze plam w źdźbłę tworzy się watowata grzybnia. Podstawa źdźbła próchnieje, co może powodować zginanie lub łamanie się źdźbeł. Skutkuje to obniżką plonu nawet o 50% poprzez zmniejszenie długości kłosa, obniżenie masy 1000 ziarniaków oraz wyleganie (Fitt i in., 1988; Kwiatek i in., 2015; 2016; Korbas i in., 2017). Pszenica ozima jest w większym stopniu narażona na porażenie patogennymi grzybami z rodzaju *Oculimacula*, niż forma jara, ze względu na korzystne warunki środowiskowe dla infekcji w okresie jesiennym i zimowym (Murray, 2010).

Istnieje kilka źródeł odporności na łamliwość źdźbła m.in. odmiany Rendezvous, Annie, Hermann, Princeps, Manager (Dumalasova i in., 2015) oraz polska odmiana Kometa. Pomimo podwyższonej odporności roślin na patogeny grzybowe z rodzaju *Oculimacula*, odmiany te mogą cechować się niższą wartością technologiczną ze względu na połączenie z locus genów negatywnie wpływających na plonowanie (Dumalasova i in., 2015). Do tej pory tylko dwa geny *Pch1* i *Pch2* zostały przeniesione do pszenicy uprawnej i warunkują odporność. Najbardziej efektywny jest gen *Pch1*, który został zidentyfikowany w *Aegilops ventricosa* [$2n = 4x = 28$, $D^vD^vM^vM^v$] i translokowany do długiego ramienia chromosomu 7D pszenicy (Maia, 1967; Jahier i in., 1978; McMillin i in., 1986; Worland i in., 1988; Mena i in., 1992; Muranty i in., 2002). Nie zapewnia on całkowitej odporności rośliny, jednakże znacząco redukuje skalę porażenia oraz penetrację podstawy źdźbła przez grzyby z rodzaju *Oculimacula*. Dotychczas na rynek wprowadzono kilka odmian posiadających gen *Pch1*: Renan, Rendezvous, Roazon, Titlis (Dumalasova i in., 2015). Drugim genem, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła, jest *Pch2* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 7A pszenicy odmiany Capelle-Desprez (Chapman i in., 2008), jednakże nie jest on homeologiem genu *Pch1*, znajdującego się w podobnej lokalizacji na chromosomie 7D (Pasquariello i in., 2017). Warunkuje on odporność w fazie siewki, jednak

posiada on mniejszą efektywność w zapobieganiu infekcji niż gen *Pch1* (Burt i in., 2014). Z tego względu gen *Pch2* może być traktowany jako dodatkowe źródło odporności pszenicy na łamliwość podstawy źdźbła.

Dotychczas opracowano kilka markerów sprzężonych z genem *Pch1* pozwalających na jego identyfikację. Jednym z nich jest translokowany do heksaploidalnej pszenicy, wraz z genem *Pch1*, locus kodujący endopeptydazę *EpD1b*. W pszenicy endopeptydaza 1 (*Ep-1*) jest kontrolowana przez 3 loci: *Ep-A1*, *Ep-B1* i *Ep-D1* zlokalizowane odpowiednio w chromosomach: 7AL, 7BL i 7DL. *Ep-D1* posiada dwa allele: *Ep-D1a* — pochodzący z pszenicy oraz *Ep-D1b* - pochodzący z *Aegilops ventricosa*. *Ep-D1b* jest użytecznym markerem izoenzymatycznym, dziedziczonym kodominacyjnie. Jego identyfikacja pozwala stwierdzić obecność genu *Pch1*, ze względu na bliskie położenie tych dwóch sekwencji na dłuższym ramieniu chromosomu 7D (7DL). Według danych literaturowych marker *Ep-D1b* prawie w 100% określa reakcję na porażenie grzybami *O. yallundae* i *O. aciformis* (Santra i in., 2006). Opracowano kilka markerów SSR dla genu *Pch1*, również powiązanych z locus *Ep-D1*: *XustSSR2001-7DL* (Santra i in., 2006; Leonard i in., 2008), *Xorw1*, *Xorw5*, *Xorw6*, *Xbarc97*, *Xwmc14*, *Xcfd175* i *Xgwm37* (Leonard i in., 2008). *Xorw1* to marker, który wykazuje całkowite sprzężenie z locus *Ep-D1* i genem *Pch1* (Leonard i in., 2008). *Xorw5* i *Xorw6* są również całkowicie sprzężone z genem *Pch1* wraz grupą loci mikrosatelitarnych *Xcfd175*, *Xbarc97* i *Xwmc14*. Markery *Xorw1*, *Xorw5* i *Xorw6* nie są polimorficzne dlatego ich dokładne położenie w długim ramieniu chromosomu 7D nie zostało określone. Natomiast locus markera *XustSSR2001-7DL*, leży w pewnej odległości od genu *Pch1* (4,1 cM). Leonard i in. (2008) określili, że markery *Xorw1*, *Xorw5* i *Xorw6* pozwalają na 100% określenie obecności lub braku genu *Pch1*, podczas gdy skuteczność markerów *Xgwm37*, *Xbarc76*, *XustSSR2001-7DL*, *Xwmc14*, *Xbarc97* i *Xcfd175* oszacowano na odpowiednio 95, 95, 98, 98, 93 i 77%. Zespół Meyer i in. (2011) badali korelacje występujące pomiędzy znanymi markerami. Określili, iż *Xorw1* w pełni pozwala na identyfikację genu *Pch1* u roślin, które wcześniej analizowano za pomocą markera *Ep-D1*, ze względu na ich pełną korelację ($r = 1,000$). *Xorw6* jak i *Xcfd175* również wykazują bardzo wysoką korelację, odpowiednio $r = 0,994$ i $r = 0,950$, natomiast *Xwmc14* oraz *Xbarc76* charakteryzuje niska korelacja względem *Ep-D1* ($r < 0,400$).

Drugim genem, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła jest *Pch2* zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu 7A pszenicy odmiany Capelle-Desprez.

Warunkuje on odporność już w fazie siewki. Mapowanie genetyczne chromosomu 7A przy użyciu kilku markerów SSR ujawniło iż dwa z nich, *Xcfa2040* oraz *Xwmc525* znajdują się w najbliższej odległości od genu *Pch2* oraz cechują się najwyższą istotnością w odporności na łamliwość źdźbła. Odpowiadają one za zmienność fenotypową badanych populacji odpowiednio w 30,7% i 36,3% (Chapman i in., 2008). Wybranie najkorzystniejszych markerów molekularnych dla określenia obecności genów odporności na łamliwość źdźbła u pszenicy może poprawić skuteczność i dokładność przy wyborze genotypów odpornych na tę chorobę.

Celem pracy było określenie efektywności markerów dla genów związanych z odpornością na łamliwość podstawy źdźbła powodowaną przez *O. yallundae* i *O. acufiformis* oraz wytypowanie genotypów pszenicy ozimej o podwyższonej odporności na łamliwość źdźbła na podstawie obecności markerów dla genów *Pch1* i *Pch2* oraz testów inokulacyjnych.

Material i metody

Material badawczy

Material badawczy stanowiło 159 linii hodowlanych pszenicy ozimej o zróżnicowanym podłożu genetycznym, uzyskanych z pięciu spółek hodowlanych (DANKO Hodowla Roślin Spółka z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Grupa IHAR, Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o., Poznańska Hodowla Roślin Spółka z o.o. oraz Hodowla Roślin Smolice-Grupa IHAR oraz pięć odmian kontrolnych: Artist, Kilimanjaro, Kometa, Patras i Rendezvous (wzorzec odporności).

Metody badawcze

W identyfikacji genów warunkujących odporność w badanych formach pszenicy wykorzystano pięć markerów. Dla genu *Pch1* dwa markery molekularne: *XustSSR2001-7DL* oraz *Xorw1*. Obecność genu *Pch1* była identyfikowana również przy użyciu markera izoenzymatycznego w postaci endopeptydazy *EpD1b*. Przy identyfikacji genu *Pch2* wykorzystano dwa markery molekularne: *Xwmc525* i *Xcfa2040* (tab. 1).

2a) Identyfikacja markera *EpD1b*

Analizę polimorfizmu enzymów prowadzono z młodych liści roślin rosnących w warunkach kontrolowanych w fitotronie (IGR PAN, Poznań). Rozcierano 2 cm² świeżej tkanki liściowej na blokach chłodzących w 0,5 ml buforu ekstrakcyjnego (glicyloglicyna pH 7,4). Fragmenty bibuły 6 × 4 mm nasączone ekstraktem roślinnym umieszczano w 10% żelu skrobiowego (bufor tris-citrate pH 7) i poddano wstępnej elektroforezie (20 min, 220 V, 40 mA). Po tym czasie usunięto bibuły i prowadzono elektroforezę przez ok. 4 godziny (240 V, 40 mA, 5°C). Żele cięto na plastry o grubości 1 mm i inkubowano w temperaturze 37°C przez godzinę w 0,7% roztworze niskotopliwej agarozы zawierającym 3 mg Fast Black K Salt i 5 mg BANA w 0,1 M Trizma maleate-NaOH — pH 6,4 (Santra i in., 2006; Wiśniewska i in., 2016, 2019).

2b) Identyfikacja markerów SSR: *XustSSR2001-7DL*, *Xorw1*, *Xcfa2040*, *Xwmc525*

Do badań nad identyfikacją markerów mikrosatelitarnych SSR (ang. Simple Sequence Repeats — proste sekwencje powtarzalne) pobierano oddzielnie material z każdej z pięciu

Tabela 1
Table 1

Markery molekularne wykorzystane w badaniach
Molecular markers used in the study

Lp. No.	Marker	Gen Gene	Sekwencje starterów (5'-3') Primers sequences (5'-3')	Lokalizacja w chromosomie Localization in chromosome	Literatura Literature	
1	<i>EpD1b</i>	<i>Pch1</i>		7D	McMillin i in. 1986	
2	<i>XustSSR2001-7DL</i>	<i>Pch1</i>	<i>XustSSR2001-7DL F</i>	CAT CGT GTG GCC AAC TTG TT	7D	Groenewald i in. 2003
			<i>XustSSR2001-7DL R</i>	TTC CTC GTG TCT AGT GTC TC		
3	<i>Xorw1</i>	<i>Pch1</i>	<i>Xorw1 F</i>	CTA TTA CAT GAA ATC TTA TTC TCC	7D	Leonard i in. 2008
			<i>Xorw1 R</i>	CAG CAG TAA CGA GAA TGT GG		
4	<i>Xcfa2040</i>	<i>Pch2</i>	<i>Xcfa2040 F</i>	TCA AAT GAT TTC AGG TAA CCA TA	7A	Chapman i in. 2008
			<i>Xcfa2040 R</i>	TTC CTG ATC CCA CCA AAC AT		
5	<i>Xwmc525</i>	<i>Pch2</i>	<i>Xwmc525 F</i>	GTT TGA CGT GTT TGC TGC TTA C	7A	Chapman i in. 2008
			<i>Xwmc525 R</i>	CTA CGG ATA ATG ATT GCT GGC T		

roślin badanego genotypu. Materiał roślinny w postaci liści 14-dniowych siewek pszenicy ozimej (faza rozwojowa: przed kłoszeniem) został zebrany do oddzielnych probówek typu Eppendorf (2 ml) i poddany głębokiemu mrożeniu (-80°C) w celu przechowania. Izolacja genomowego DNA z 5 roślin wszystkich analizowanych genotypów przeprowadzona była przy użyciu kitu do izolacji roślinnego genomowego DNA (EURx) według wytycznych producenta. Roztwór DNA przechowywany był w chłodziarce w temperaturze 4°C . Przedmiotem analiz była identyfikacja markerów *XustSSR2001-7DL* i *Xorw1* powiązanych z *locus* genu *Pch1*, warunkującego odporność na łamliwość podstawy źdźbła.

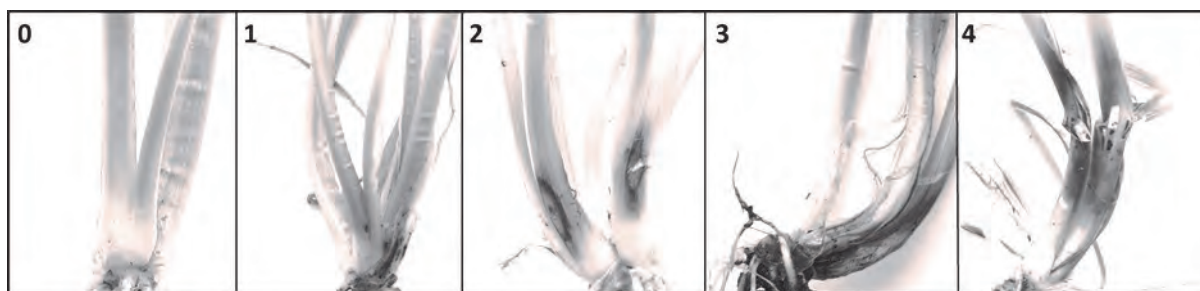
Ponadto wykonana została analiza molekularna obecności genu *Pch2*. Wykorzystane zostały również markery typu SSR: *Xwmc525* oraz *Xcfa2040* zlokalizowane na chromosomie 7A, które według map genetycznych są sprzężone z *locus* genu *Pch2*. Analizy markerów SSR sprzężonych z genami *Pch1* i *Pch2* polegały na amplifikacji fragmentów DNA za pomocą specyficznych starterów metodą PCR. Reakcję PCR wraz z elektroforezą wykonano na wyizolowanym DNA z wszystkich analizowanych genotypów w 5 powtórzeniach. Reakcje PCR zostały przeprowadzone zgodnie z procedurą dołączoną do 2x PCR TaqNovaHS PCR Master Mix (Blirt) w termocyklerze Labcycler Gradient (Sensoquest). Skład mieszaniny reakcyjnej obejmował Master Mix (zawierający polimerazę hot startową Taq), $10\ \mu\text{M}$ każdego startera F i R, matrycę DNA oraz wodę

dostarczoną przez producenta (Blirt). Temperatura przyłączenia starterów została ustalona empirycznie. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji przeprowadzono na żelu agarozowym (2–3%, Sigma), a wizualizację z wykorzystaniem systemu do archiwizacji (UVIsave HD5, Uvitec) (Kwiatek i in., 2012, 2015, 2016; Majka i in., 2018).

2c) Testy inokulacyjne

Testy inokulacyjne w fazie siewki (BBCH 12-13)

Testy inokulacyjne siewek w fazie trzech liści (164 genotypy) przeprowadzono w warunkach kontrolowanych w fitotronie (IGR PAN, Poznań). Do inokulacji wykorzystano szczepy *Oculimacula aciformis* i *O. yallundae* pochodzące z plantacji wielkoobszarowych pszenicy. Wyzolowane szczepy przechowywano na płytkach Petriego w laboratorium Zakładu Mykologii IOR — PIB w Poznaniu w temperaturze $4-5^{\circ}\text{C}$ i częściowo w zamrażarce (-70°C) na skosach. Szczepy namnażano na pożywce AGZ na szalkach Petriego przez 10–12 tygodni w temperaturze $12-14^{\circ}\text{C}$. Zarodnikowanie uzyskano poprzez poddawanie otrzymanych kultur czynnikom, takim jak promieniowanie ultrafioletowe (UV) i zmiany dobowe temperatury i światła w inkubatorach do hodowli grzybów 6h — UV, 12 światło. Zawiesinę grzybów do inokulacji wykonano poprzez zeskrobanie grzybni z płytek przerośniętych kulturami grzyba *O. yallundae* i *O. aciformis* w proporcji 1:1 oraz zmieszanie z wodą destylowaną. Liczbę zarodników ustalano przy pomocy komory Thoma (stężenie $4\ \text{mln}/1\ \text{ml}$). Inokulowano (pędzlowanie) po 5 siewek z każdego



Rys. 1. Ocena występowania objawów porażenia siewek z wykorzystaniem skali 0–4

- 0 — brak symptomów porażenia siewki
- 1 — niewielkie porażenie koleoptyla
- 2 — mniej niż 50% zainfekowanej powierzchni pochwy liściowej/obwodu źdźbła
- 3 — ponad 50% powierzchni obwodu źdźbła zainfekowanej
- 4 — 100% zainfekowanej powierzchni obwodu źdźbła (murszejąca tkanka)

Fig. 1. Evaluation of infection symptoms on seedlings using the 0–4 scale

- 0 — no symptoms of seedling infection
- 1 — slight coleoptile infection
- 2 — less than 50% of infected leaf sheaths
- 3 — more than 50% of the infected blade
- 4 — 100% of the infected blade (rotten tissue)

ze 164 genotypów pszenicy. Po inokulacji siewki hodowano w kontrolowanych warunkach temperatury (dzień 12°C — noc 10°C), oświetlenia (12 godz. długość dnia) i wilgotności (75%) przez okres 8 tygodni. Następnie siewki poddano wizualnej ocenie porażenia. Koleoptyle i pochwy liściowe odslaniano i oceniano występowanie objawów porażenia z wykorzystaniem skali zamieszczonej na rys. 1.

Testy inokulacyjne w fazie 1–2 kolanka (BBCH 31–32) — badanie odporności roślin dojrzałych

Testy inokulacyjne polowe wykonane zostały w Kopaszewie (Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o.) w woj. wielkopolskim na 164 genotypach pszenicy ozimej w czterech powtórzeniach w drugiej dekadzie kwietnia 2018 roku. Poletka obejmowały 0,3 m² (na każde poletko wysiano 100 ziarniaków w dwóch rzędach). Przed siewem zastosowano nawożenie wieloskładnikowe: azotofosfor (Polidap) 60 kg/ha, potas i magnez (Kornkali) 80 kg/ha. Zastosowano także dwie dawki saletry, pierwsza 32% saletra amonowa (ZAKsan) 70 kg/ha oraz w drugiej dawce 27% saletra wapniowo-amonowa (CAN) z dodatkiem 4% MgO oraz 7% CaO. Zawiesina grzybni i zarodników użyta do inokulacji została wykonana w Zakładzie Mykologii Instytutu Ochrony Roślin — Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu według metodyki zamieszczonej przy testach inokulacyjnych w fazie siewki. Inokulacja wykonana została za pomocą opryskiwacza polowego mieszaniną zarodników i grzybni *O. yallundae* i *O. acufiformis* w proporcji 1:1. Stężenie inokulum wynosiło 4,0 mln zarodników na 1 ml. Na każdy wariant badawczy inokulowano 300 roślin, natomiast kontrola stanowiła 100 roślin. Po zbiorze, żdźbła badanych genotypów pszenicy zostały poddane ocenie makroskopowej w Zakładzie Mykologii IOR — PIB w Poznaniu. Ocena uwzględniała określenie procentu porażonych żdźbeł badanych genotypów pszenicy oraz określenie wskaźnika porażenia — K według wzoru (EPPO nr PP 1/28; Kwiatek i in., 2012):

$$K = \frac{[n(II) \times 0,25] + [n(III) \times 0,75] + n(IV)}{n(I + II + III)}$$

gdzie:

I — brak symptomów porażenia,

II — mniej niż 50% powierzchni pochwy liściowej lub obwodu żdźbła porażone w miejscu, gdzie porażenie jest najsilniejsze,

III — ponad 50% powierzchni pochwy liściowej lub obwodu żdźbła porażone w miejscu, gdzie porażenie jest najsilniejsze przy nadal twardej tkance,

IV — 100% powierzchni pochwy liściowej lub obwodu żdźbła porażone, przy murszącej tkance,

n — liczba ocenianych żdźbeł.

2d) Analiza parametrów struktury plonu

Elementy struktury plonu zostały oznaczone w warunkach kontrolnych. Masę tysiąca ziarniaków (MTZ) oznaczano na podstawie 1000 losowo wybranych ziarniaków uzyskanych z całego 10 m² poletka. Plon oznaczano z masy ziarna z poletka (10 m²).

2e) Analiza statystyczna

Przeprowadzono jednoczynnikowe analizy wariancji dla porażenia siewek, współczynnika K, porażenia żdźbeł, plonu z poletka oraz MTZ. Czynnikiem (zmienną zależną) była obecność genów odporności na łamliwość żdźbła. Zmienna przyjmowała wartości: *Pch1*, *Pch2*, *Pch1+Pch2*, 0 (brak genów). Istotność różnic średnich dla poszczególnych poziomów czynnika porównano testem Tukeya. Analizę przeprowadzono za pomocą programu statystycznego Microsoft® Excel 2016/XLSTAT© Ecology (Version 2019.1.3, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA).

Wyniki

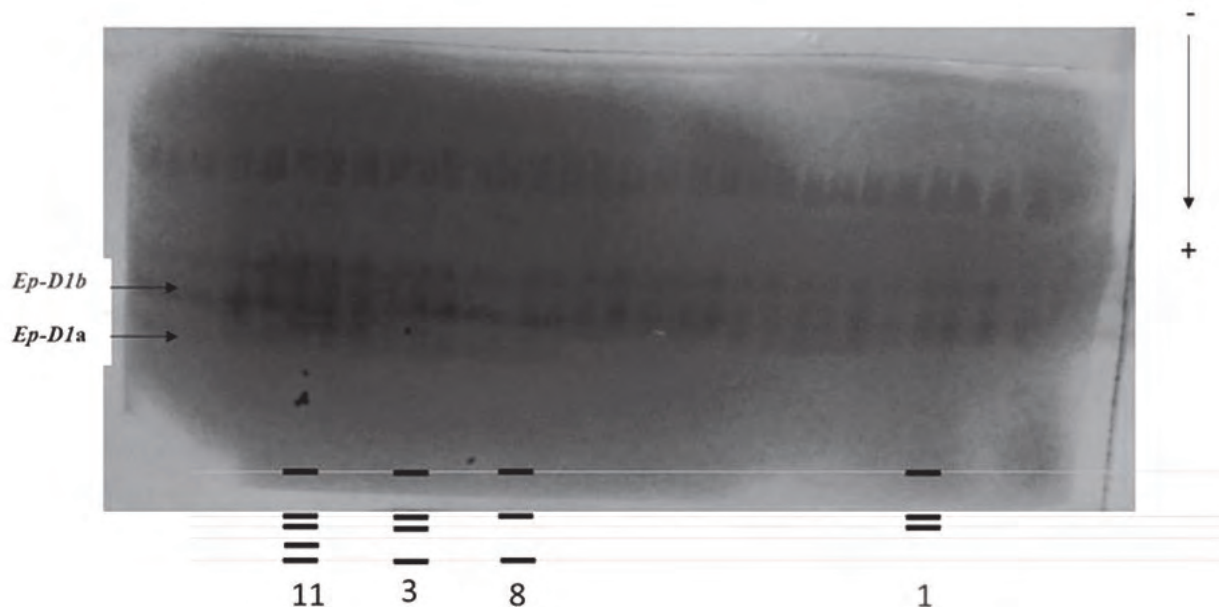
Prace związane z odpornością na łamliwość podstawy żdźbła powodowaną przez grzyby z rodzaju *Oculimacula* przeprowadzono na 159 liniach hodowlanych pszenicy ozimej uzyskanych z przekrzyżowań pszenic o różnym podłożu genetycznym. Do badań włączono również odmiany Artist, Kilimanjaro, Kometa, Patras oraz odmianę Rendezvous — jako wzorzec odporności. Badania prowadzono z wykorzystaniem 5 markerów molekularnych. Trzech dla genu *Pch1* warunkującego odporność rośliny w fazie dojrzewania, w tym jeden marker izoenzymatyczny (*EpD1b*) i dwa markery SSR: *XustSSR2001-7DL* i *Xorw1* oraz dwa markery *Xwmc525* i *Xcfa2040*, dla genu *Pch2*, który warunkuje odporność w fazie siewki i ma niewielki wpływ na odporność rośliny dojrzałej.

Tabela 2

Table 2

Klasy zymogramów stwierdzonych w badanych genotypach pszenicy ozimej w 2018 roku
Selected classes of zymograms in the genotypes of winter wheat analyzed in 2018

Typ wzoru Type of banding pattern	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Ep-D1b</i> górny upper	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
środkowy middle	-	-	-	-	-	-	-	-	=	=	=	=	=
dolny lower	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ep-D1a</i> górny upper	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dolny lower	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liczba genotypów No. of genotypes	29	0	75	0	2	0	14	25	1	0	17	0	0



Rys. 2. Wybrane klasy zymogramów w genotypach pszenicy (*Ep-D1b* — typ nr 1) — elektroforeza na żelu skrobiowym
 Fig. 2. Selected classes of zymograms in wheat genotypes (*Ep-D1b* — type no. 1) — starch gel electropho

W badaniach analizowano po pięć roślin z każdego badanego genotypu.

Identyfikacja obecności markera izoenzymatycznego *Ep-D1b* w badanych genotypach pszenic ozimych

U badanych genotypów obserwowano zymogramy, które można przypisać do 7 z 13 klas (tab. 2, rys. 2).

Typ pierwszy reprezentowany przez odmianę Rendezvous i Kometa, a także 27 (16,6%) badanych linii pszenicy charakteryzował się trzema prążkami dla *Ep-D1b*, które identyfikują formy odporne na infekcję grzybową powodowaną przez *O. yallundae* i *O. acufomis*. Większość badanych linii wykazywała typ wzoru nr 3 (46% genotypów). Kolejnymi kategoriami pod względem liczby genotypów były kategorie: 1, 8 i 11 (tab. 2, rys. 2).

Identyfikacja markerów SSR: *XustSSR2001-7DL*, *Xorw1*, *Xcfa2040*, *Xwmc525*

Analizy markerów SSR sprzężonych z genami *Pch1* i *Pch2* polegały na: amplifikacji fragmentów DNA za pomocą specyficznych starterów metodą PCR, rozdziale elektroforetycznym produktów amplifikacji w żelu agarozowym (2-3%) oraz wizualizacji z wykorzystaniem systemu do archiwizacji żeli.

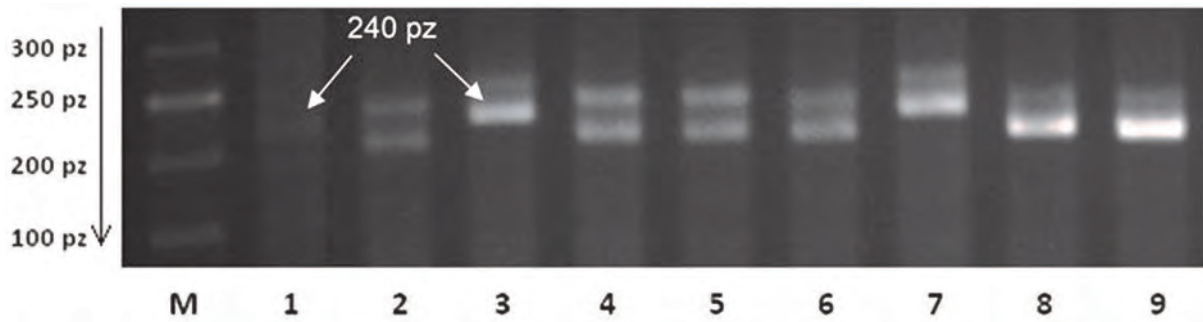
Scharakteryzowano dwa produkty amplifikacji *XustSSR2001-7DL* (markera dla genu *Pch1*) w postaci prążków o wielkości 240 par zasad (pz) oraz 220 pz (rys. 3). W rezultacie reakcji PCR

przeprowadzonej z wykorzystaniem DNA kontrolnej odmiany Rendezvous uzyskano produkt amplifikacji o wielkości 240 pz. W analizach poszczególnych genotypów obserwowano występowanie pojedynczych produktów 220 pz lub 240 pz. U czternastu (9%) genotypów stwierdzono produkt amplifikacji o wielkości 240 pz (taki jak u wzorcowej odmiany Rendezvous) (rys. 3).

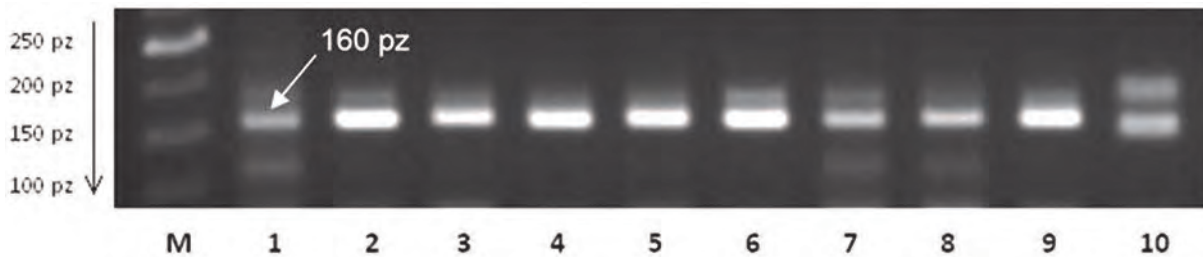
Drugi nowo opracowany marker dla genu *Pch1* — *Xorw1*, wykazujący całkowite sprzężenie z locus *Ep-D1* i genem *Pch1* charakteryzował się trzema produktami amplifikacji o wielkości 150, 160 i 170 pz (rys. 4). Odporna odmiana wzorcowa Rendezvous wykazywała obecność produktu o długości 160 pz i taki układ stwierdzono u 25 badanych genotypów pszenicy ozimej (rys. 4).

W badaniach genu *Pch2* wykorzystano dwa markery: *Xwmc525* i *Xcfa2040*. U odpornej odmiany Rendezvous po zastosowaniu markera *Xwmc525* stwierdzono produkt amplifikacji o długości 180 pz. Takie produkty amplifikacji stwierdzono również u 58 badanych genotypów (rys. 5).

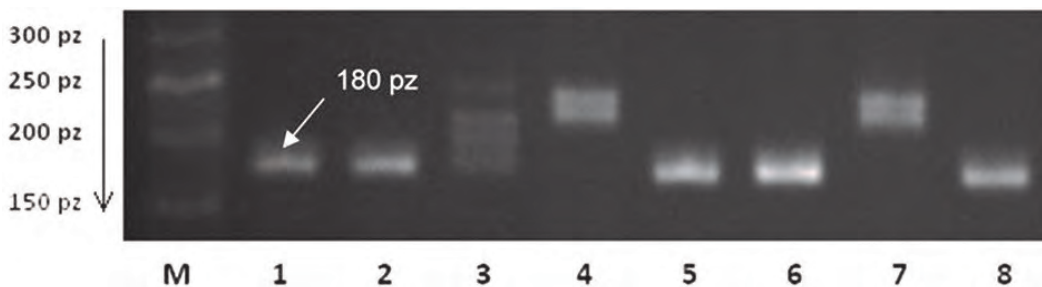
Drugi marker *Xcfa2040* podobnie jak marker *Xwmc525* zlokalizowany jest w obrębie locus *Pch2* (odległość 1.3 cM od *Xwmc525*). U odpornej odmiany Rendezvous stwierdzono produkt amplifikacji o długości 286 pz. Takie produkty amplifikacji stwierdzono również u 55 badanych genotypów. U genotypów, u których stwierdzono produkt właściwy dla markera *Xcfa2040*,



Rys. 3. Produkty amplifikacji markera *XustSSR2001-7DL* (240 pz — obecność *Pch1*, 220 pz — brak genu *Pch1*).
 1 — Rendezvous, 3 i 7 — obecność *Pch1*; 2, 4, 5, 8, 9 — brak *Pch1*, M — marker wielkości
 Fig. 3. Amplification products of marker *XustSSR2001-7DL* (240 bp — the presence of *Pch1*, 220 bp — lack of *Pch1*).
 1 — Rendezvous, 3 and 7 — the presence of *Pch1*; 2, 4, 5, 8, 9 — lack of *Pch1*, M — DNA ladder



Rys. 4. Produkty amplifikacji markera *Xorw1* (160 pz — obecność *Pch1*). 1 — Rendezvous, 2—9 — obecność *Pch1*;
 10 — brak *Pch1*, M — marker wielkości
 Fig. 4. Amplification products of marker *Xorw1* (160 bp — the presence of *Pch1*). 1 — Rendezvous, 2-9 — the presence of *Pch1*; 10 — lack of *Pch1*, M — DNA ladder



Rys. 5. Produkty amplifikacji markera *Xwmc525* (180 pz — obecność *Pch2*). 1 — Rendezvous, 2, 5, 6, 8 — obecność *Pch2*;
 3, 4, 7 — brak *Pch2*, M — marker wielkości
 Fig. 5. Amplification products of marker *Xwmc525* (180 bp — the presence of *Pch2*). 1 — Rendezvous, 2, 5, 6, 8 — the presence of *Pch2*; 3, 4, 7 — lack of *Pch2*, M — DNA ladder

stwierdzono również obecność produktu właściwego dla markera *Xwmc525*, co pozwala na prawidłową identyfikację genu *Pch2*.

W tabeli 3 zebrano genotypy pszenicy ozimej, w których stwierdzono geny *Pch1* i/lub *Pch2*.

Geny *Pch1* i *Pch2* (identyfikowane z użyciem wyżej wymienionych markerów dla genów *Pch1* i *Pch2*) stwierdzono u pięciu badanych genotypów pszenicy ozimej (4,19%): KBP 167, SMH 9662, KBP 1655, KBP 1656, STH 4431, odmianie Kometa oraz Rendezvous.

W czterech genotypach (2,39%): KBP 1622, KBP 1624, STH 5347 i STH 6157 z użyciem markera izoenzymatycznego i jednego markera molekularnego (*Xorw1*) zidentyfikowano gen *Pch1*. Wydaje się, że u tych genotypów najprawdopodobniej doszło do przełamania sprzężenia między *locus Pch1*, a *locus* markera *XustSSR2001-7DL*, który leży w większej odległości od genu *Pch1* (4,1 cM). Zidentyfikowano również gen *Pch2*, używając do identyfikacji dwóch markerów: *Xwmc525* i *Xcfa2040*.

W ośmiu liniach pszenicy ozimej (4,79%): KBP 16 5, KBP 16 29, KBP 16 31, NAD 15004, KBP 16 4, KBP 16 6, KBP 16 28 i SMH 9415 zidentyfikowano gen *Pch1* z użyciem markera

izoenzymatycznego oraz dwóch markerów SSR: *XustSSR2001-7DL* i *Xorw1*. Nie zidentyfikowano natomiast genu *Pch2*, prowadząc badania z użyciem dwóch markerów molekularnych: *Xwmc525* i *Xcfa2040*.

W kolejnych ośmiu liniach pszenicy ozimej (4,79%) zidentyfikowano tylko gen *Pch1* z użyciem markera izoenzymatycznego oraz jednego markera *Xorw1*. Nie identyfikowano markera *XustSSR2001-7DL*, gdzie najprawdopodobniej również doszło do przełamania sprzężenia między *locus Pch1*, a *locus* markera *XustSSR2001-7DL*. Nie identyfikowano również markerów dla genu *Pch2*.

U 49 linii pszenicy ozimej (29,35%) stwierdzono tylko gen *Pch2*.

W pozostałych 91 liniach hodowlanych pszenicy ozimej (54,49%) nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2*.

Wyniki identyfikacji molekularnej genów *Pch1* i *Pch2*, związanych z odpornością pszenicy na łamliwość źdźbła, konfrontowano z wynikami testów po indukowanej inokulacji siewek. Wykonano ją zawieszoną grzybnia i zarodników *O. yallundae* i *O. acufiformis* w doświadczeniu prowadzonym w fitotronie w IGR PAN (test

Tabela 3
Table 3

Genotypy pszenicy ozimej, u których zidentyfikowano markery dla genów *Pch1* i *Pch2*
Genotypes of winter wheat, where the markers for genes *Pch1* and *Pch2* were identified

Nr No.	Genotyp Genotype	<i>Pch1</i>			<i>Pch2</i>	
		<i>EpD1b</i>	<i>XustSSR2001-7DL</i>	<i>Xorw1</i>	<i>Xwmc525</i>	<i>Xcfa2040</i>
1	Rendezvous (RV)	+	240	160	180	286
2	Kometa	+	240	160	180	286
3	KBP 167	+	240	160	180	286
4	KBP 1655	+	240	160	180	286
5	SMH 9662	+	240	160	180	286
6	KBP 1656	+	240	160	180	286
7	STH 4431	+	240	160	180	286
8	KBP 16 22	+	Brak	160	180	286
9	KBP 16 24	+	Brak	160	180	286
10	STH 5347	+	Brak	160	180	286
11	STH 6157	+	Brak	160	180	286
12	KBP 16 5	+	240	160	Brak	Brak
13	KBP 16 29	+	240	160	Brak	Brak
14	KBP 16 31	+	240	160	Brak	Brak
15	NAD 15004	+	240	160	Brak	Brak
16	KBP 16 4	+	240	160	Brak	Brak
17	KBP 16 6	+	240	160	Brak	Brak
18	KBP 16 28	+	240	160	Brak	Brak
19	SMH 9415	+	240	160	Brak	Brak
20	STH 6102	+	Brak	160	Brak	Brak
21	STH 6111	+	Brak	160	Brak	Brak
22	STH 6116	+	Brak	160	Brak	Brak
23	STH 6130	+	Brak	160	Brak	Brak
24	STH 6132	+	Brak	160	Brak	Brak
25	STH 6156	+	Brak	160	Brak	Brak
26	KBP 16 12	+	Brak	160	Brak	Brak
27	KBP 16 33	+	Brak	160	Brak	Brak

Tabela 4
Table 4

Identyfikacja genów odporności na łamliwość źdźbła, porażenie siewek i porażenie źdźbeł u linii/odmian pszenicy ozimej
Identification of genes determining resistance to eyespot, infection of seedlings and infection of stems in lines/varieties of winter wheat

Geny odporności Resistance genes	Liczba badanych linii/ odmian Number of analyzed lines/ varieties	Test siewkowy Seedling test			Test polowy Field test			
		porażenie infection			współczynnik K K index		% porażenia źdźbeł % of infected sheaths	
		średnia average	odchylenie standardowe std. dev.	zakres range	średnia average	odchylenie standardowe std. dev.	średnia average	odchylenie standardowe std. dev.
<i>Pch1 + Pch2</i>	11	1,18 b	0,58	0–3	0 b	0	0 b	0
<i>Pch1</i>	16	1,61 b	1,00	0–4	0,05 b	0,09	0,31 b	0,60
<i>Pch2</i>	49	1,77 b	1,14	0–4	0,23 a	0,20	1,35 a	1,03
Brak genu Lack of genes	88	2,31 a	1,03	0–4	0,29 a	0,23	1,66 a	1,24
	razem 164 total 164	1,71			0,14		0,83	

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$
Means marked with the same letter are not statistically significantly different at $P = 0.05$

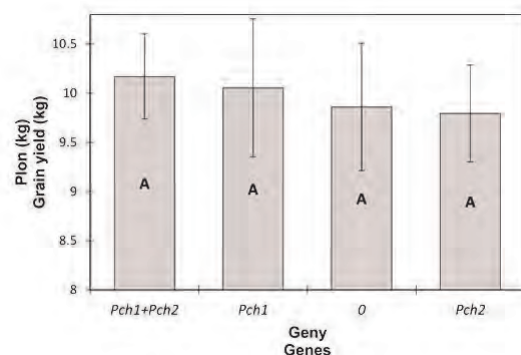
siewkowy) oraz w polowym teście inokulacyjnym (w fazie 1–2 kolanka z użyciem zawiesiny grzybni i zarodników *O. yallundae* i *O. acuformis*) — poletka w Kopaszewie.

Testy inokulacyjne siewek prowadzono na 159 liniach hodowlanych i pięciu odmianach kontrolnych, w tym odmianie Rendezvous (wzorec odporności). Najmniejsze porażenie siewek w skali 0–5 stwierdzono u genotypów posiadających geny *Pch1* i *Pch2* (średnia 1,18), a najwyższe dla genotypów, u których nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2* (średnia 2,31) (tab. 4).

W ocenianym sezonie (test polowy) pomimo początkowo dogodnych warunków do infekcji obserwowano niewielkie porażenie źdźbeł pszenicy przez grzyby z rodzaju *Oculimacula*. W dużej mierze wynikało to z warunków pogodowych panujących przez cały sezon wegetacyjny, które uniemożliwiły rozwój patogena na roślinach pomimo inokulacji szczepami *Oculimacula* sp., charakteryzującymi się wysoką zdolnością do infekowania roślin pszenicy (tab. 4). Biorąc pod uwagę analizę molekularną genów związanych z odpornością na łamliwość źdźbła, wyniki inokulacji siewek oraz wyniki porażenia źdźbeł dojrzałych roślin po inokulacji w fazie 1–2 kolanka (BBCH 31–32) stwierdzono brak porażenia źdźbeł u linii/odmian pszenicy ozimej, u których zidentyfikowano oba geny *Pch1* i *Pch2*. Stwierdzono u nich również najniższe porażenie siewek (1,18 w skali 0–6). Najwyższy procent porażonych źdźbeł (1,66%)

odnotowano u genotypów, u których badanymi markerami nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2*. U tych genotypów odnotowano również najwyższe porażenie siewek w teście fitotronowym (2,31 w skali 0–6) (tab. 4).

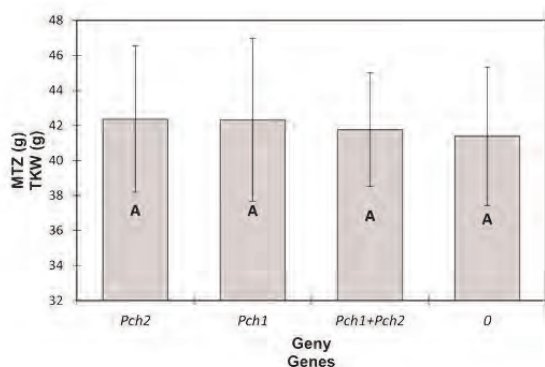
W celu oszacowania, czy obecność genów *Pch1* i *Pch2* w badanych genotypach ma istotny wpływ na wielkości komponentów struktury plonu, wykonano analizę wariancji dla masy tysiąca ziarniaków (MTZ) i plonu ziarna z poletka. Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna, chociaż plon był najwyższy przy obecności obu genów (rys. 7).



Rys. 7. Porównanie średniego plonu dla grup genotypów posiadających gen *Pch1*, *Pch2*, *Pch1+Pch2* i nieposiadających genów *Pch1* i *Pch2*(0). Linie pokazują wartości odchylenia standardowego. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$

Fig. 7. Comparison of the average grain yield for groups of lines having the *Pch1* gene, *Pch2* gene, *Pch1+Pch2* genes and those lacking the *Pch1* and *Pch2* genes (0). Bars show values of standard deviation. Means marked with the same letter are not statistically significantly different at $P = 0.05$

Obserwowano również brak istotnego wpływu obecności genów *Pch1*, *Pch2* lub ich braku na masę tysiąca ziarniaków (MTZ). U genotypów z genami *Pch1* i *Pch2* stwierdzono nieznacznie wyższe wartości MTZ, niż u genotypów bez obu genów lub z jednym genem *Pch1* lub *Pch2* (rys. 8). Masa tysiąca ziaren rosła jeżeli był obecny gen *Pch1* i dodatkowo wzrastała, kiedy identyfikowana była obecność obu genów *Pch1* i *Pch2* (rys. 8).



Rys. 8. Porównanie masy tysiąca ziarniaków dla grup genotypów posiadających gen *Pch1*, *Pch2*, *Pch1+Pch2* i nieposiadających genów *Pch1* i *Pch2* (0). Linie pokazują wartości odchylenia standardowego. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$

Fig. 8. Comparison of the thousand kernel weight for groups of lines that have the *Pch1* gene, *Pch2* gene, *Pch1+Pch2* genes and those lacking the *Pch1* and *Pch2* genes (0). Bars show values of standard deviation. Means marked with the same letter are not statistically significantly different at $P = 0.05$

Dyskusja

Przeprowadzone badania wykazały, że najbardziej efektywny dla zapewnienia odporności na łamliwość źdźbła jest gen *Pch1*. Redukuje on znacząco skalę porażenia przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Oculimacula* oraz ich penetrację podstawy źdźbła. Potwierdzono, że obecność genu *Pch1*, identyfikowanego trzema markerami molekularnymi, w liniach pszenicy ozimej wpływa na obniżenie porażenia dojrzałych źdźbeł pszenicy. Podobne wyniki nasz Zespół uzyskał w doświadczeniach prowadzonych na liniach hodowlanych pszenicy ozimej w 2017 roku (Majka i in., 2018). Stwierdzono również, że do identyfikacji genu *Pch1* najkorzystniejsze jest stosowanie markera izoenzymatycznego *EpD1* oraz *Xorw1*, ponieważ locus zastosowanego markera *XustSSR2001-7DL* leży w większej odległości od genu *Pch1* (4,1 cM). W liniach: KBP 1622, KBP 1624, STH 5347 i STH

6157 doszło najprawdopodobniej do przełamania sprzężenia między locus *Pch1*, a locus markera *XustSSR2001-7DL*. Markery *EpD1* i *Xorw1* leżące w niewielkiej odległości od genu *Pch1* potwierdziły jego obecność w badanych liniach pszenicy ozimej. Analizy z wykorzystaniem markera izoenzymatycznego *EpD1* pozwoliły na stwierdzenie, że żadna z linii nie reprezentuje typu 2, 4, 12 i 13 jakie uzyskano w 2017 roku u innych testowanych linii hodowlanych pszenicy. Jednakże w roku 2017 były to również najmniej liczne typy wzorów prążkowych (odpowiednio 1, 1, 3 i 1 linia). Co więcej, całkowita liczba roślin w których zidentyfikowano gen *Pch1* (typ 1 wzoru prążkowego — 29 linii) była wyższa w roku 2018, niż w badaniu linii hodowlanych w roku 2017 (16 linii) (Majka i in., 2018). Badania Santra i in. (2006) wykazały że, tylko obecność prążków dla *Ep-D1b* przy jednoczesnym braku prążków *Ep-D1a* gwarantuje odporność na łamliwość źdźbła. Gen *Pch1* zidentyfikowano u 14,1% badanych linii hodowlanych pszenicy, co w odniesieniu do 6,9% z roku 2017 stanowi sporą różnicę i świadczy o właściwym kierunku programów hodowlanych zorientowanych na zwiększenie wartości agronomicznej pszenicy w Polsce.

Zidentyfikowano również gen *Pch2*, używając do tego celu dwóch markerów: *Xwmc525* i *Xcfa2040*. Warunkuje on odporność w fazie siewki, jednak jego efektywność zapobiegania infekcji przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Oculimacula* jest mniejsza od genu *Pch1* (Burt i in., 2014). Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają niewielką rolę genu *Pch2* w zapewnieniu odporności na infekcję przez *Oculimacula* sp. Wyniki uzyskane dla obu markerów molekularnych były tożsame, co wskazuje, że są one równie skuteczne w identyfikacji obecności genu *Pch2*.

Gen *Pch1* jest wciąż efektywny i warunkuje podwyższoną odporność na łamliwość podstawy źdźbła, aczkolwiek istnieje efekt plejotropowy związany z przeniesieniem segmentu chromosomu 7D *Ae. ventricosa* do pszenicy, mający wpływ na wielkość plonu (Johnson, 1992). W pracach, gdzie badano wpływ genu *Pch1* na parametry struktury plonu, obserwowano negatywny wpływ tego genu na wielkość plonu oraz masę tysiąca ziarniaków (Koen i in., 2002; Kwiatek i in., 2016). Uzyskane w tej pracy wyniki pozwalają stwierdzić, że w badanych liniach obecność genu *Pch1* nie ma istotnego wpływu na plon ziarna i masę tysiąca ziarniaków, a nawet wartości te są nieznacznie wyższe w liniach posiadających gen *Pch1*, jak również w liniach posiadających zarówno gen *Pch1*, jak i *Pch2*. Jest to najprawdopodobniej związane z obecnością zredukowanego segmentu przeniesionego do pszenicy z *Ae. ventricosa*, gdzie

negatywne sprzężenie jest przełamane, o czym może również świadczyć przełamanie sprzężenia pomiędzy *XustSSR2001-7DL*, a genem *Pch1*. Dodatkowe wyjaśnienie może stanowić istnienie innego genetycznego źródła mającego wpływ na wielkość plonu w badanych liniach hodowlanych pszenicy.

Na podstawie wyników testów inokulacyjnych wykonanych zarówno w fazie siewki w fitotronie, jak i w doświadczeniu polowym zaobserwowano, że najniższe porażenie roślin obserwuje się w przypadku obecności obydwu genów *Pch1* i *Pch2*. W dalszej kolejności wysoka odporność roślin na infekcję przez *Oculimacula* sp. determinowana jest przez gen *Pch1*, a na końcu przez gen *Pch2*, przy czym różnica w stopniu porażenia siewek w przypadku obecności pojedynczych genów była mniejsza, niż w przypadku roślin dojrzałych, co wskazuje na ekspresję genu *Pch2* we wczesnej fazie rozwoju rośliny. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi wysokiej efektywności genu *Pch1* w zapewnieniu odporności pszenicy na łamliwość podstawy źdźbła oraz marginalnym wpływie genu *Pch2*, który może być traktowany jako dodatkowe źródło odporności pszenicy na łamliwość podstawy źdźbła (Burt i in., 2014; Kwiatek i in., 2016; Majka i in., 2018).

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyselekcjonowanie 23 linii hodowlanych pszenicy, posiadających gen *Pch1*, w tym ośmiu posiadających również gen *Pch2*, o podwyższonej odporności na łamliwość podstawy źdźbła, bez negatywnego wpływu na elementy struktury plonu.

Literatura

- Burt C., Hollins T. W., Nicholas P. 2014. Identification of a QTL conferring seedling and adult plant resistance to eyespot on chromosome 5A of Cappelle Desprez. *Theor. Appl. Genet.* 122: 119 — 128.
- Chapman N., Burt C., Dong H., Nicholson P. 2008. The development of PCR-based markers for the selection of eyespot resistance genes *Pch1* and *Pch2*. *Theor Appl Genet* 117: 425 — 433.
- Deighton F. C. 1973. Studies on *Cercospora* and allied genera. IV. *Cercospora* Sacc., *Pseudocercospora* gen. nov. and *Pseudocercosporidium* gen. nov. *Mycological Papers* 133:1 — 62.
- Dumalasova V., Palicova J., Hanzalova A., Bizova I., Laisova-Svobodova L. 2015. Eyespot Resistance Gene *Pch1* and Methods of Study of its Effectiveness in Wheat Cultivars. *Czech J Genet Plant Breed*, 51 (4): 166 — 173.
- EPPO no. PP 1/28 — Standards — PP1 Efficiency of plant protection products — Summary list of approved Standards (2018 – 09).
- Fitt B. D. L., Goulds A., Polley R. W. 1988. Eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) epidemiology in relation to prediction of disease severity and yield loss in winter wheat — a Review. *Plant Pathology* 37: 311 — 328.
- Fron M. G. 1912. Contribution a l'etude de la maladie due 'piet noir des cereales' ou 'maladie du pietin'. *Annales de la Science Agronomique, France IV*: 1.
- Groenewald J. Z., Marais A. S., Marais G. F. 2003. Amplified fragment length polymorphism-derived microsatellite sequence linked to the *Pch1* and *Ep-D1* loci in common wheat. *Plant Breeding* 122(1): 83 — 85.
- Jahier J., Doussinault G., Dosba F., Bourgeois F. 1978. Monosomic analysis of resistance to eyespot in the variety „Roazon”. In: *Proceedings of the Fifth International Wheat Genetics Symposium*, Luty 23–28, New Delhi, Indie: 437 — 440.
- Johnson R. 1992. Past, present and future opportunities in breeding for disease resistance, with examples from wheat. *Euphytica* 63: 3 — 22.
- Koen E., Labuschagne, M. T., Viljoen, C. D. 2002. The influence of eyespot resistance genes on baking quality and yield in wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 1537 — 1540.
- Korbas M., Parandowski A., Węgorok P., Jajor E., Horoszkiewicz-Janka J., Zamojska J., Danielewicz J., Czyżewski M., Dworzańska D. 2017. *Vademecum środków ochrony roślin*, Wyd. Agronom, Poznań.
- Kwiatek M., Pankiewicz K., Wiśniewska H., Korbas M., Danielewicz J. 2012. Identification of *Pch1* eyespot resistance gene in the collection of wheat lines (*Triticum Aestivum* L.). *Journal of Plant Protection Research* 52 (2): 254 — 258.
- Kwiatek M., Wiśniewska H., Kaczmarek Z., Korbas M., Gawłowska M., Majka M., Pankiewicz K., Danielewicz J., Belter J. 2015. Using markers and field evaluation to identify the source of eyespot resistance gene *Pch1* in the collection of wheat breeding lines. *Cereal Research Communications* 43: 638 — 648.
- Kwiatek M., Wiśniewska H., Korbas M., Gawłowska M., Belter J., Majka M., Danielewicz J. 2016. How do eyespot resistance genes transferred into winter wheat breeding lines affect their yield? *Journal of Plant Protection Research* 56: 319 — 322.
- Leonard J. M., Watson C. J., Carter A. H., Hansen J. L., Zemetra R. S., Santra D. K., Campbell K. G., Riera-Lizarazu O. 2008. Identification of a candidate gene for the wheat endopeptidase *EpD1* locus and two other STS markers linked to the eyespot resistance gene *Pch1*. *Theor. Appl. Genet.* 116: 261 — 270.
- Maia N. 1967. Obtention de blés tendres résistants au piétinverse (*Cercospora herpotrichoides*) par croisements interspécifiques blés x *Aegilops*. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 53: 149 — 155.
- Majka M., Kwiatek M., Korbas M., Danielewicz J., Gawłowska M., Góral T., Wiśniewska H. 2018. Eyespot resistance of winter wheat breeding lines evaluated with the marker-assisted selection and inoculation tests at the seedling and adult plant stage. *Journal of Plant Protection Research* 58:387 — 394.
- McMillin D. E., Allan R. E., Roberts D. E. 1986. Association of an isozyme locus and strawbreaker foot rot resistance derived from *Aegilops ventricosa* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 72: 743 — 747.
- Mena M., Doussinault G., Lopez-Braña I., Aguaded S., García-Olmedo F., Delibes A. 1992. Eyespot resistance gene *Pch-1* in H-93 wheat lines. Evidence of linkage to markers of chromosome group 7 and resolution from the endopeptidase locus *Ep-D1b*. *Theor. Appl. Genet.* 83: 1044 — 1047.
- Meyer N., Lind V., Heindorf M., Korzun V., Friedt W., Ordon F. 2011. Diagnostic value of molecular markers linked to the eyespot resistance gene *Pch1* in wheat. *Euphytica* 177: 267 — 275.

- Muranty H., Jahier J., Tanguy A. M., Worland A. J., Law C. 2002. Inheritance of resistance of wheat to eyespot at the adult stage. *Plant Breeding* 121: 536 — 538.
- Murray T. D. 2010. Eyespot (strawbreaker foot rot). In: *Compendium of Wheat Diseases and Pests* (Bockus W. W., Bowden R. L., Hunger R. M., Murray T. D., Smiley R. W., Morrill W. ed.). 3rd ed. APS Press, Minneapolis 171: 32 — 34.
- Pasquariello M., Ham J., Burt C., Jahier J., Paillard S., Uauy C., Nicholson P. 2017. The eyespot resistance genes *Pch1* and *Pch2* of wheat are not homoeoloci. *Theor. Appl. Genet.* 130: 91 — 107.
- Santra D. K., Watt C., Little L., Kidwell K. K., Campbell K. G. 2006. Comparison of a modified assay method for the endopeptidase marker *Ep-D1b* with the Sequence Tag Site marker *XustSSR2001-7DL*. *Plant Breeding* 125: 13 — 18.
- Wiśniewska H., Kwiatek M., Majka M., Gawłowska M., Belter J. 2016. Selekcja pszenicy odpornej na łamliwość podstawy źdźbła z wykorzystaniem markerów izoenzymatycznych i molekularnych. (W:) *Metody biotechnologiczne w hodowli pszenicy — wybrane zagadnienia* (red.) Surma M., Kuczyńska A., Adamski T., Wydawnictwo ProDRUK Poznań, ISBN 978-83-64246-33-3: 27 — 35.
- Wiśniewska H., Majka M., Kwiatek M., Gawłowska M., Surma M., Adamski T., Kaczmarek Z., Drzazga T., Ługowska B., Korbas M., Belter J. 2019. Production of wheat doubled haploids resistant to eyespot supported by marker-assisted selection, *Electronic Journal of Biotechnology* 37:11 — 17.
- Worland A. J., Law C. N., Hollins T. W., Koebner R. M. D., Giura A. 1988. Location of a gene for resistance to eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) on chromosome 7D of bread wheat. *Plant Breeding* 101: 43 — 51.

The effect of nitrogen fertilization on yield efficiency and quality of tubers potato varieties cultivated in an integrated production system

Wpływ nawożenia mineralnego azotem na efektywność plonowania i jakość bulw odmian ziemniaka uprawianych w integrowanym systemie produkcji

Cezary Trawczyński ✉

Zakład Agronomii Ziemniaka Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Jadwisinie

✉ e-mail: c.trawczyński@ihar.edu.pl

The aim of the research conducted in the years 2016 – 2018 was to perform the effect of nitrogen on the total yield and quality evaluation of edible and starch potato varieties harvested after tuber maturity, as well as to establish fertilization efficiency indices. The quality of tubers was expressed: yield structure, share of deformations, content of starch and nitrates (V), but the nitrogen utilization efficiency as agronomic efficiency (AE) and fertilizer recovery efficiency (FRE) in tubers. Two experimental factors were researched: nitrogen doses (0, 50, 100, 150 kg·ha⁻¹) and varieties (Impresja, Mazur, Otolia, Szyper and Widawa) tested under different weather conditions. The total yield fresh matter between nitrogen doses ranged from 42.8 to 53.7 t·ha⁻¹ and for varieties from 42.1 (var. Szyper) to 54.8 t·ha⁻¹ (var. Impresja). Increasing nitrogen doses caused an increase share in the yield structure big tubers (diameter above 60 mm), nitrates (V) and total nitrogen content and nitrogen uptake with tuber yield, but decrease starch content and nitrogen fertilization efficiency indicators. On the basis of quadratic function parameters, it was shown that the varieties of Impresja, Szyper and Otolia were characterized by greater requirements in relation to the optimal nitrogen dose than the varieties of Mazur and Widawa. More assessed features determined the weather conditions during the growing season than the factors studied: the nitrogen fertilization dose and the variety. In the year with the highest amount of rainfall in relation to the average of many years, the largest decrease was recorded: tuber yield, share of big tubers in the yield structure, nitrogen uptake and agronomic efficiency. Year with the most rainfall was characterized by the highest reduction the yield of tubers, share big tubers in the yield structure, nitrogen uptake and its agronomic efficiency.

Key words: efficiency indicators, nitrogen doses, potato varieties, quality, yield.

Celem badań przeprowadzonych w latach 2016–2018 było określenie wpływu nawożenia mineralnego azotem na plon ogólny i wybrane cechy jakości bulw odmian jadalnych i skrobiowych ziemniaka zbieranych po dojrzewaniu bulw, a także ustalenie wskaźników efektywności nawożenia. Jakość bulw oceniono na podstawie ich struktury, zdeformowania, zawartości skrobi i azotanów, a wydajność nawożenia azotem mineralnym wyrażono efektywnością agronomiczną (AE) i efektywnością odzyskania nawozów (FRE) przez bulwy. W badaniach uwzględniono dwa czynniki doświadczalne: dawkę azotu (0, 50, 100, 150 kg·ha⁻¹) i odmiany (Impresja, Mazur, Otolia, Szyper i Widawa) uprawiane z uwzględnieniem warunków pogodowych. Ogólny plon świeżej masy bulw pomiędzy dawkami azotu (0–150 kg·ha⁻¹) zawierał się od 42,8 do 53,7 t·ha⁻¹, a dla odmian od 42,1 (odmiana Szyper) do 54,8 t·ha⁻¹ (odmiana Impresja). Zwiększenie dawki azotu spowodowało wzrost udziału w strukturze plonu bulw dużych (o średnicy powyżej 60 mm), zawartości azotanów (V) i azotu ogólnego oraz pobranie azotu z plonem bulw, natomiast wpłynęło na zmniejszenie zawartość skrobi w bulwach i wskaźników efektywności nawożenia azotem. Na podstawie parametrów funkcji kwadratowej wykazano, że odmiany Impresja, Szyper i Otolia charakteryzowały się większymi wymaganiami w stosunku do optymalnej dawki azotu niż odmiany Mazur i Widawa. Więcej ocenianych cech determinowały warunki pogodowe w okresie wegetacji, niż badane czynniki: dawka nawożenia mineralnego azotem i odmiana. W roku o najwyższej ilości opadów w stosunku do średniej z wielolecia stwierdzono największe zmniejszenie: plonu bulw, udziału bulw dużych w strukturze plonu, pobrania azotu i efektywności agronomicznej.

Słowa kluczowe: wskaźniki efektywności, dawki azotu, odmiany ziemniaka, jakość bulw, plon

Introduction

Potato, despite the decrease of its crop area in recent years, remains one of the main nutritional products, together with rice and wheat (Dzwonkowski, 2017). One of the main reasons for reducing the crop area of potato in the sowing structure is the fact that this plant is becoming less and less competitive in terms of expenditure incurred for its production in comparison to other field crops. Therefore, solutions that would contribute to the best use of the yield potential of this plant should be sought. One of the main

goals in this aspect is to increase the efficiency of some treatments in the cultivation technology of this species. An element of potato production, which significantly affects the expenditure on its cultivation, is fertilization, including the most important mineral nitrogen, the tuber component that most determines their quality and yield (Maltas et al., 2018). The use of mineral nitrogen, for example because of the environmental aspect or growing price of fertilizers, should be limited in order to apply precise doses for specific potato cultivars (Baishya et al., 2013; Fontes et al., 2010; Rens et al., 2018). A properly determined dose

of nitrogen ensures that appropriate quality parameters and the highest possible efficiency in relation to the tuber size are obtained and its quantity received from the fertilizers is optimal (Cohan et al., 2018). The above assumptions regarding mineral nitrogen fertilization are consistent with the standards in force since 2014 in the area of the integrated potato production system (IP), which generally assumes limiting the chemicalization of agriculture (Nowacki, 2013). It should be emphasised that potato has relatively high nutritional needs, but is characterised by a lower use of this component from fertilizers compared to other crop species (Goffart et al., 2008). According to Vos (2009), fertilizer nitrogen recovery efficiency is 45%. In Canada, nitrogen recovery efficiency for tubers ranged from 21 to 62% (Cambouris et al., 2008; Zebrath et al., 2012). According to Polish studies, nitrogen recovery by early potato cultivars harvested after maturation ranges from 45 to 50% for the lowest nitrogen dose, i.e. $50 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, and from 25 to 35% for the highest nitrogen dose, i.e. $200 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Kopiński, 2017; Trawczyński, Wierzbička, 2014). This indicates that part of the applied mineral nitrogen may remain unused and as a waste penetrate into the atmosphere or groundwater, becoming a threat to the environment. The differences in the yield and the quality of potato tubers, as well as the efficiency of fertilization may result from the impact of specific biotic and abiotic factors. These include, among others, properties of the cultivars, fertilizer dose or changes in weather conditions during the growing season.

The aim of the study was to assess the impact of nitrogen fertilization on the yield, selected quality characteristics of tubers, as well as values of the uptake, use and use efficiency of this ingredient for new potato cultivars grown in accordance with the integrated production system.

Material and Methods

In field experiments conducted in 2016–2018 in the Jadwisin Department of the Plant Breeding and Acclimatization Institute, National Research Institute ($52^{\circ}45' \text{ N}$, $21^{\circ}63' \text{ E}$), the response of potato cultivars to mineral nitrogen fertilization was determined. The analysed factors included:

1. nitrogen doses (4): 0, 50, 100, $150 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$,
2. potato cultivar (5): Impresja (table cultivar, very early), Mazur (table cultivar, mid-early), Otolia (table cultivar, mid-early), Szyper (starchy cultivar, mid-early) and Widawa (starchy cultivar, mid-early).

The experimental design was a split-plot randomised block in three replications. A plot consisted of four rows spaced at a distance of 0.75 m, with a distance of 0.33 cm between seeds within each row. The size of the field was 14.85 m^2 . The number of plants per one plot was 60.

The research was carried out on arable light soil classified as belonging to soils with clay translocation, type Luvisols, subtype Stagnic Luvisols (Marcinek et al., 2011). The soil was characterised by acid pH, high phosphorus content, and average content of mineral nitrogen, potassium and magnesium. The content of organic carbon in the soil was low (Table 1).

Table 1
Soil chemical properties in the field before planting

Year	N mineral ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$)	C organic ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	pH in KCl	Content in the soil ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		
				P	K	Mg
2016	50	6.8	5.4	89	112	32
2017	50	8.4	5.0	88	122	22
2018	60	8.8	5.4	79	104	26

Organic fertilizer consisted of cut winter triticale straw, ploughed after the harvest, at an amount of $5 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ and the green mass of white mustard stubble crop at an amount of $15\text{--}16 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ and it served as a fertilizer applied in the autumn. Mineral phosphorus and potassium fertilization was carried out in early spring at doses of $26.2 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ P (triple superphosphate — 17.4% P) and $99.6 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ K (potassium salt — 49.8% K), based on the content of available forms of these components in the soil. Nitrogen fertilization on plots with up to $100 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ N was applied in spring before planting tubers, while on plots with $150 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ N a supplementary dose of $50 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ N was added right before the emergence of potato plants. Nitrogen was used in a form of ammonium nitrate (nitrochalk — 27% N). Potatoes were planted manually in the third decade of April and harvested after the maturation of tubers in the second decade of September.

Weather conditions in the years of the study were determined on the basis of the sum of rainfall and average air temperatures compared to the long-term average and Sielianinov's hydrothermal coefficients. The year 2016, compared to other years, was characterised by the sum of rainfall in the growing season, which was the closest to the long-term average. A slight rainfall deficit was recorded only at the beginning and the end of the growing season (April and September). In 2017, the most rainfall was recorded compared to other years, and the months of June and September were particularly wet. In turn, 2018 was one of the driest years. The sum of rainfall for the entire growing season was 79.2 mm lower compared to the average. The largest rainfall deficit was recorded at the beginning of the vegetation season, in May and June. In general, all analysed years of the study were warm, and especially

2018, when the air temperature throughout the growing season was 3.5° C higher than the long-term average. On the basis of the Sielianinov's hydrothermal coefficient, it was demonstrated that the years 2016 and 2017 were wet and that the year 2018 was dry (Table 2).

Weeds were removed mechanically (twice

Table 2

Weather conditions in the study years (from the meteorological station in Jadwisin)

Year	Month						
	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Sum/Mean
Sum of rainfalls (mm)							
2016	31.4	92.2	85.4	103.6	61.4	9.5	383.5
2017	8.9	10.1	107.5	78.8	57.0	140.8	407.1
2018	21.7	43.4	41.0	75.2	60.6	30.9	272.8
1967-2015	37.0	57.0	75.0	76.0	61.0	48.0	352.0
Mean air temperature (°C)							
2016	9.3	15.3	18.7	19.6	18.4	15.7	16.2
2017	7.3	14.1	18.1	18.4	19.4	13.8	15.2
2018	13.2	17.6	19.1	21.2	20.8	15.8	18.0
1967-2015	7.9	13.7	16.6	18.5	17.9	13.2	14.5
Sielianinov's hydrothermic coefficients (K)*							
2016	1.12	1.94	1.52	1.70	1.07	0.20	1.26
2017	0.40	0.23	1.98	1.38	0.95	3.39	1.39
2018	0.54	0.79	0.71	1.14	0.93	0.65	0.79

*Coefficient value (Bac et al., 1998); K< 0.50 severe drought; K: 0.51–0.99 drought; K: 1.00–2.00 humidity; K>2.00 high humidity

before the emergence of the potato plants) and chemically: one treatment immediately before the emergence (Afalón 450 SC at a dose of 2 l·ha⁻¹) and the second one after the emergence of the potato plants (Titus 25 WG at a dose of 60 g·ha⁻¹ + Trend 90 EC at a dose of 0.1 l·ha⁻¹). During the growing season, fungicides against potato blight were applied four times (Ekonom 72 WP at 2 kg·ha⁻¹, Pyton Consentó 450 SC at 2 l·ha⁻¹, Infinito 687.5 SC at 1.5 l·ha⁻¹, Revus 250 SC at 0.6 l·ha⁻¹). During the growing period, insecticides against Colorado potato beetle were applied three times (Actara 25 WG at 70 g·ha⁻¹, Calypso 480 SC at 75 ml·ha⁻¹ and Apacz 50 WG at 60 g·ha⁻¹).

During the harvest, the total tuber yield was determined and two tuber samples were collected from each plot. In a sample of 5 kg of tubers, crop structure: the percentage of small tubers (with a diameter below 35 mm), medium tubers (with a diameter of 35 to 60 mm) and big tubers (with a diameter above 60 mm), as well as the percentage of deformed tubers was determined.

Subsequently, a sample of 5 kg of tubers was collected in order to determine the following chemical characteristics: content of starch and nitrates in fresh weight, dry matter and total nitrogen in dry matter. The starch content was determined by the Ewers polarimetric method (PN-EN ISO 10520, 2002), where the hydrolysis of starch was carried out in a boiling water bath, and the protein was precipitated with phosphoric acid, with the use of readouts on a Polamat S automatic polarimeter. The nitrate content (NO₃) was determined by a colorimetric method based on the Griess test, using a mixture of zinc and manganese with the reduction of nitrates to nitrites, the dry matter content was assessed by two-stage drying, and the concentration of nitrogen in tubers was determined by the Kjeldahl method.

The dependence of potato yield on N fertilization doses was calculated according to the quadratic function:

$$Y = a + bX + cX^2$$

where, Y = tuber yield, X = nitrogen doses, a = yield for the 0 dose, b = yield increase per kg of N; c = yield decrease factor.

The optimal dose of nitrogen (X_{opt}) was calculated according to the equation:

$$X_{opt} = -b/2c$$

Maximal tuber yield (Y_{max}) for X_{opt} was calculated according to the equation:

$$Y_{max} = a - b^2/4c$$

Agronomic efficiency (AE) for X_{opt} was calculated according to the equation:

$$AE X_{opt} = (Y_{max} - Y_0)/X_{opt}$$

Subsequently, nitrogen uptake (NU_p) with tuber yield, as well as nitrogen use efficiency indicators: agronomic efficiency (AE) and fertilizer nitrogen recovery efficiency (FRE) for tubers were calculated. The calculated nitrogen use efficiency parameters for potatoes were adopted from Vos (2009) and Zebarth et al. (2008). They were determined using the following formulas:

Nitrogen uptake (NU_p) with tuber yield was calculated according to the formula:

$$NU_p; \text{kg} \cdot \text{ha}^{-1} = [(\% \text{ N in DM} \times \text{DW}/100) \times 1000] \\ \text{where: DM-dry matter content (\%); DW-tuber dry weight (t} \cdot \text{ha}^{-1}\text{).}$$

Nitrogen agronomic efficiency (AE, kg·kg⁻¹) was calculated according to the formula:

$$AE; \text{kg} \cdot \text{kg}^{-1} = [(Y_N - Y_0)/N_X]$$

As the ratio of difference between Y_N-tuber fresh weight yield at the fertilized plot and Y₀-tuber fresh weight yield at the unfertilized plot, and the dose N_X.

Fertilizer recovery efficiency (FRE, %) in tuber was calculated according to the formula:
 FRE; % = [(N uptake by tubers for N_x – N uptake by tubers for N₀)/N_x] × 100

Nitrogen uptake with the tuber yield at the fertilized plot (kg ha⁻¹) minus Nitrogen uptake with the tuber yield at the unfertilized plot (kg·ha⁻¹) divided by N_x. This parameter is also referred to as nitrogen use for potato tubers.

The results of the experiments were statistically analysed using the ANOVA software. The analysis of variance of the examined features (dependent variables) was carried out according to the nitrogen dose, cultivar and year (independent variables). There were 60 plots: 5 cultivars × 4 nitrogen doses × 3 years × 3 replications (180 items of statistical data). Comparisons of mean values were performed using the Tukey Test at p < 0.05 and at p < 0.01. The influence of the factors demonstrated by the Fisher–Snedecor distribution for all characteristics was presented. Non-linear regression analysis of total yield depending on the nitrogen fertilization, was used to determine optimal nitrogen doses. The components of variance were assessed in order to determine the sources of variability of the examined features in the total variability. The percentage of individual components of variance was used to assess the impact of weather conditions in given years, the applied nitrogen dose, the characteristics of the cultivars and their interaction on the variability of the tested components.

Results and Discussion

Significant differences in tuber yield and quality were obtained both in relation to the nitrogen dose, properties of the cultivars and weather conditions in the years of the study. Regardless of the tested cultivars and years, the yield of fresh tuber weight in the fertilization range of 0 -150 kg·ha⁻¹ N equalled from 42.8 to 53.7 t·ha⁻¹. A significant gradual increase in the yield of fresh tuber weight was observed up to a dose of 100 kg·ha⁻¹ N, and after exceeding this dose a decrease was noted (Table 3). The dependence of tuber yield on the increasing dose of mineral nitrogen fertilization was a confirmation

Table 3
 Fresh weight yield FW (t·ha⁻¹) and quality of potato tubers depending on the study factors

Treatment	FW t·ha ⁻¹	% of tuber fraction (mm)			D ¹ %	Star ^h %	NO ₃ (V) mg·kg ⁻¹
		<35	35-60	>60			
0	42.8 c	4.4 a	71.4 a	24.2 c	6.7 b	15.5 c	18.8 d
50	48.8 b	3.3 a	62.9 b	33.8 b	8.4 a	16.1 b	28.0 c
100	54.5 a	3.2 a	55.3 c	41.5 a	7.5 ba	16.5 a	45.2 b
150	53.7 a	1.2 b	53.5 c	45.3 a	7.3 ba	16.2 b	60.5 a
Impresja	54.8 a	5.2 a	60.6 c	34.2 b	4.5 d	9.5 d	59.1 a
Mazur	52.9 b	0.8 d	39.6 d	59.6 a	11.0 a	15.8 b	27.3 d
Otolia	51.6 b	2.0 dc	67.2 b	30.8 b	6.5 c	14.6 c	50.5 b
Szyper	42.1 d	3.8 ba	75.9 a	20.3 c	8.7 b	20.2 a	21.0 e
Widawa	48.4 c	3.2 bc	60.5 c	36.3 b	6.7 c	20.2 a	32.7 c
2016	56.9 a	1.9 b	58.0 b	40.1 a	7.8 b	16.8 a	20.8 b
2017	45.4 c	4.9 a	70.8 a	24.3 c	9.6 a	16.3 b	14.4 c
2018	47.6 b	5.2 a	60.4 b	34.4 b	5.1 c	15.1 c	79.3 a
Significance of the impact							
Nitrogen dose (1)	xx	xx	xx	xx	x	xx	xx
Cultivar (2)	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
Year (3)	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
(1×2)	x	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	xx	xx
(1×3)	n.s.	xx	x	n.s.	x	xx	xx
(2×3)	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
(1×2×3)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	x	xx	xx
Percentage of total variability (%)							
Nitrogen dose (1)	27.6	18.4	19.1	18.1	3.1	1.0	13.8
Cultivar (2)	18.4	23.3	41.0	37.4	30.5	91.7	8.4
Year (3)	46.9	38.5	31.0	36.3	42.3	5.4	68.8
(1×2)	0.9	1.2	0.5	0.4	0.6	0.1	0.6
(1×3)	0.1	9.3	1.1	0.7	2.6	0.1	6.0
(2×3)	5.6	7.9	7.1	7.0	19.6	1.5	2.2
(1×2×3)	0.4	1.4	0.3	0.3	1.4	0.1	0.3

xx highly significant at α ≤ 0.01; x significant at α ≤ 0.05; n.s., not significant
 Mean values with the same letter do not differ significantly;
 1 Deformations

of numerous previously conducted studies (Cohan et al., 2018; Fontes et al., 2010; Rens et al., 2016).

The precise determination of optimal nitrogen doses allows for the analysis of tuber yield depending on the dose of this component with the use of quadratic regression analysis (Cohan et al., 2018; Giletto, Echeverría, 2015; Maltas et al., 2018).

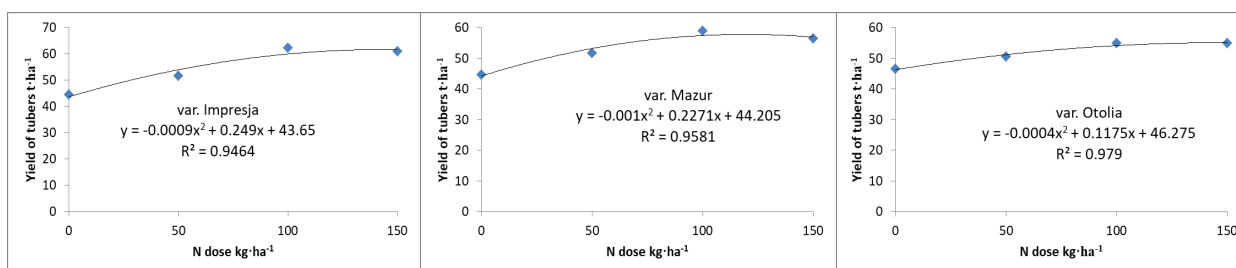


Fig. 1. Impact of N doses on tuber yield for table cultivars

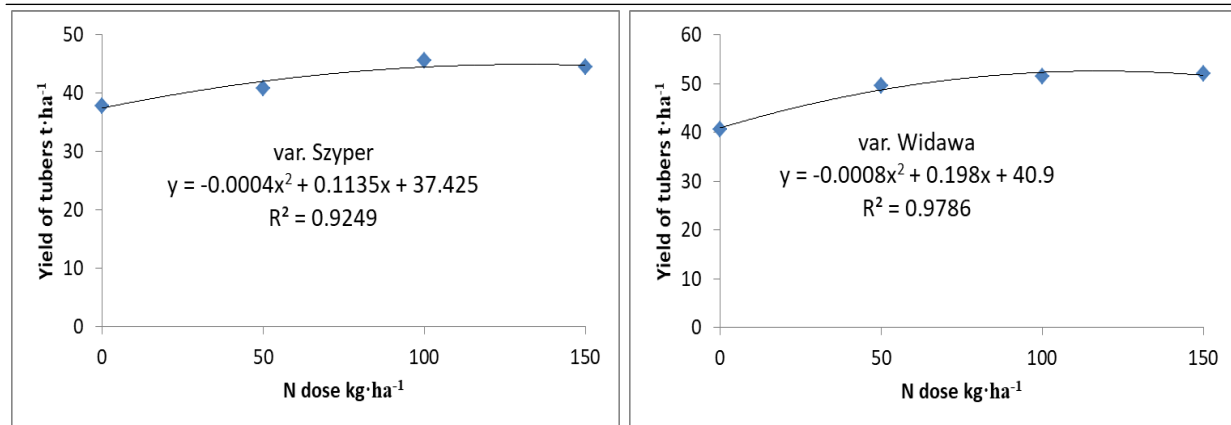


Fig. 2. Impact of N doses on tuber yield for starchy cultivars

The study showed that the needs of the cultivars in terms of the optimal dose of mineral nitrogen were different (Fig. 1–2).

Optimal nitrogen doses for each cultivar were as follows: Mazur — 114 kg·ha⁻¹, Widawa — 124 kg·ha⁻¹, Impresja — 138 kg·ha⁻¹, Szyper — 143 kg·ha⁻¹ and Otolia 145 kg·ha⁻¹, whereas tuber yields at these doses accounted for: 57.1, 53.3, 60.8, 45.6 and 54.7 t·ha⁻¹, respectively (Table 4).

Table 4
Parameters of the quadratic model describing the relationship between tuber yield and nitrogen dose

Cultivar	Ymax t·ha ⁻¹	Xopt kg·ha ⁻¹	AE Xopt kg·kg ⁻¹
Impresja	60.8	138	124
Mazur	57.1	114	114
Otolia	54.7	145	58
Szyper	45.6	143	57
Widawa	53.3	124	100

Large variation in the optimal nitrogen dose for different cultivars was demonstrated by Maltas et al. (2018) and Cohan et al. (2018). Optimal nitrogen doses in different years ranged from 78 to 194 kg·ha⁻¹, and the mean value for different years in case of Bintje and Laura cultivars amounted to 94 and 155 kg·ha⁻¹ N, respectively, Maltas et al. (2018). In the study of Cohan et al. (2018) optimal nitrogen doses for the total tuber yield in case of five cultivars ranged from 130 to 170 kg·ha⁻¹ N. Rens et al. (2018). The highest tuber yield was achieved for nitrogen doses from 114 to 138 kg·ha⁻¹. Regarding the cultivars, it was found that the Impresja cultivar had the significantly highest tuber yield, which a starchy cultivar, Szyper, the lowest one. Regardless of the dose of mineral nitrogen and the analysed years, the difference in fresh tuber yields between these cultivars was 30%. The year 2016 was the most favourable for high accumulation of tuber yields, as it was moderately cold and the sum of rainfall was closest to the long-term average throughout the growing season. In turn, the lowest tuber yield was obtained in 2017, which may result from the largest, compared to other years, excess rainfall. The difference in fresh tuber yield for these years

was 25% (Table 3). The assessment of variance components showed that weather conditions in given years (46.9%) had the greatest impact on the variability of total tuber yield, while nitrogen doses (27.6%) and genotype (18.4%) had a significantly lower impact — Table 3. Similarly, a large impact of growing conditions during the tuber harvest, and the smallest one in relation to the genetic characteristics of the cultivars, Sawicka et al. (2011), were observed.

In addition to fresh weight yield, the size of tubers and different size percentage are basic characteristics of potatoes in case of table cultivars. The percentage of big and deformed tubers in the yield is the main measure of its commercial value. In the discussed studies it was found that as the mineral nitrogen dose increased, the percentage of small (smaller than 35 mm in diameter) and medium (35 to 60 mm in diameter) tubers decreased, and the percentage of large tubers (larger than 60 mm in diameter) gradually increased, which has been confirmed in previous studies by Maltas et al. (2018). The increase in the percentage of commercial tubers, including big ones, in the crop structure as a result of mineral nitrogen fertilization, was also obtained by Kołodziejczyk (2014). In their research, the percentage of commercial tubers in the total yield increased as a result of increasing doses of nitrogen (0–180 kg·ha⁻¹) from 94% to 98%, while the percentage of large tubers increased from 58% to 74%. The percentage of a fraction of above 60 mm in the crop structure was mainly determined by genotypic characteristics and weather conditions (Table 3). In the present study, the Mazur cultivar was characterised by the highest percentage of large tubers in the crop structure. A significant impact of genotypic characteristics on the tuber crop structure has also been found by Baranowska et al. (2019). It was also demonstrated that weather conditions in 2016, favourable for potato yielding, compared to other years, significantly contributed to the highest percentage of large tubers in the crop (Table 3), which was a confirmation of previous studies (Badr et al., 2006; Baranowska et al., 2019).

Deformed tubers in the crop structure, for the range from 0 to 150 kg·ha⁻¹ N, constituted from 6.7 to 8.4%, and their percentage was not dependent on the nitrogen dose. The Impresja cultivar was characterised by the lowest percentage of deformed tubers in the crop, while the Mazur cultivar had the highest percentage of deformed tubers. The percentage of deformed tubers in the crop resulted mainly from weather conditions in given years (Table 3). The significantly highest percentage of deformed tubers was actually found in 2017, with the most uneven rainfall distribution during the growing season, as confirmed by Lutomirska and Jankowska (2012).

Starch and nitrates are one of the basic qualitative components of the chemical composition of potato tubers strongly dependent on the genotype, fertilization and changes in weather conditions during the growing season. The level of these components mainly determines the nutritional value of tubers (Pobereźny et al., 2015; Rymuza et al., 2015). The studies demonstrated that the table Mazury cultivar had a significantly higher starch content than the Otolia and Impresja cultivars (Table 3). In turn, starchy cultivars did not differ in the tuber starch content, but the content of this component was 52% higher compared to table cultivars. As the nitrogen dose increased, a significant increase in tuber starch content was found up to a dose of 100 kg·ha⁻¹. Previous studies confirmed the adverse impact of high doses of nitrogen on the content of starch in tubers (Öztürk et al., 2010). Actually, the weather conditions in 2016, which provided a sufficient level of humidity and warmth, had the most beneficial effect on the starch content in tubers. The significantly lowest starch content in tubers was obtained in 2018, which was dry, which generally promotes the accumulation of starch in tubers (Rymuza et al., 2015), but probably the exceptionally high air temperature in July and August determined a high reduction of this component in tubers. Based on the previous research, it was also confirmed that the main factor differentiating the starch content in tubers included weather conditions during the growing season, while cultivar differences were less important, and the content of this component was least dependent on the amount of nitrogen (Wierzbicka et al., 2008). The present study demonstrated that the genotype and weather conditions in given years determine the starch content in tubers more than the nitrogen dose (Table 3). In turn, nitrogen fertilization had the greatest impact on the level of nitrates in tubers, which was also confirmed by previous studies (Hmelak Gorenjak, Cencič 2013; Hmelak Gorenjak et al., 2014). The dose of nitrogen fertilization affected the increase in nitrates for 50, 100 and 150 kg N·ha⁻¹ by 9.2, 26.4 and 41.7 mg·kg⁻¹ in comparison to the control (a plot without N).

The permissible amount of 200 mg·kg⁻¹ of tuber fresh weight specified in the Minister of Health regulation (Commission Regulation EC, 2005) was not exceeded. The Impresja and Otolia cultivars were characterised a higher tendency to accumulate nitrates in tubers than other cultivars. In addition to nitrogen fertilization, the study also revealed a very significant impact of weather conditions on nitrate content in tubers during growth. The highest level of nitrates in tubers was found in the samples from 2018 (Table 3). Grudzińska, Zgórska (2008) confirmed that a dry and warm growing season favoured the accumulation of nitrates in tubers.

Nitrogen doses, genotypic characteristics and weather conditions in given years had a significant impact on nitrogen uptake (NUp) and fertilizer recovery efficiency (FRE) – Table 5. N uptake increased gradually with increasing nitrogen doses from 95.6 at the unfertilized plot to 161.1 kg·ha⁻¹ for the application of 150 kg·ha⁻¹ N. A similar nitrogen uptake with an increase in application dose was proved by other authors (Jamaati-E-Somarin et al., 2009; Vos, 2009). The Widawa cultivar was characterised by the significantly highest nitrogen uptake by tubers, while the Impresja cultivar had the lowest uptake. The significantly highest nitrogen uptake by tubers was achieved in 2018, because of, among others, the high content of total nitrogen in tubers. The lowest nitrogen uptake by tubers in 2017, with the highest rainfall during the growing season, may indicate that the nutrient was partially flushed from the root zone into groundwater, as it was emphasised in other studies (Arriaga et al., 2009; Shrestha et al., 2010). The nitrogen uptake by tubers was largely determined by mineral fertilization with this component and weather conditions during the growing season. As the nitrogen doses increased, an increase in nitrogen uptake was noted, but at the same time its fertilizer recovery efficiency decreased significantly. This indicated a decrease in the efficiency of nutrient uptake from fertilizers applied to soil, which was also documented in the literature (Cohan et al., 2018; Maltas et al., 2018; Rens et al., 2018; Vos, 2009). In the fertilization range of 50–150 kg·ha⁻¹ N, nitrogen recovery efficiency ranged from 50.6 to 43.6%. The tested cultivars differed in nitrogen recovery efficiency from 40.1% for the Otolia cultivar to 54.4% for the Mazur cultivar. In earlier studies, cultivars were characterised by similarly significant differences in nitrogen recovery, while weather conditions in given years, similarly to the results obtained in the present study, determined nitrogen recovery by tubers (Zebarth et al., 2012). The obtained tuber yield and the applied nitrogen dose determined the value of nitrogen agronomic efficiency (AE). This parameter was significantly differentiated mainly by nitrogen dose and

cultivar. With the increase in nitrogen dose from 50 to 150 kg·ha⁻¹ N the yield per 1 kg of applied nitrogen decreased from 120.0 to 72.6 kg of tubers. Regarding the cultivars, agronomic efficiency (AE) ranged from 63.4 to 169.2 kg of tubers per 1 kg of applied nitrogen (Table 5), and at the optimal nitrogen dose from 57 kg tubers for the Szyper cultivar to 124 kg tubers for the Impresja cultivar (Table 4).

In 2016, the most favourable year in terms of weather conditions during the growing season, the highest value of nitrogen agronomic efficiency was obtained, but this difference was not statistically significant compared to the remaining years of the study. In the conducted study it was demonstrated that the value of agronomic nitrogen efficiency and recovery of this component by tubers was mostly determined by genotypic characteristics (Table 5). In the study it was emphasised that the values of mineral nitrogen fertilization efficiency indices are of key importance because, on the one hand, they determine the profitability of production, and on the other hand, they allow determining the impact of fertilization with this component on the environment (Cambouris et al., 2008; Fontes et al., 2010; Maltas et al., 2018).

Conclusions

The increase in fertilization up to a dose of 150 kg·ha⁻¹ N had a significant negative effect on the starch content and nitrogen fertilization efficiency indices, and at the same time had a positive effect on the percentage of large tubers (diameter over 60 mm) in the structure, nitrates content, total nitrogen content and nitrogen uptake, as well as tuber yield.

The tested cultivars differed significantly in terms of tuber yield and crop structure, starch and nitrate content, nitrogen uptake, agronomic efficiency and recovery of this component.

The growing season with the highest rainfall was characterised by the largest reduction in tuber yield, percentage of large tubers in the crop structure, nitrogen uptake and agronomic efficiency for this component.

Mineral nitrogen fertilization largely determined nitrogen uptake and tuber yield, genotypic characteristics determined starch content and nitrogen agronomic efficiency index, as well as recovery of this component by potato tubers, while weather conditions in given years had the greatest impact on tuber yield, percentage of deformed tubers in the crop structure, nitrate content and total nitrogen content in tubers.

Optimal nitrogen doses obtained on the basis of tuber yield for the studied cultivars, which equalled from 114 to 145 kg·ha⁻¹ N, ensured correct tuber quality and high fertilization efficiency of this element.

Table 5
Effect of the study factors on the dry weight yield, DW (t·ha⁻¹), nitrogen content, N (%), uptake, NUp (kg·ha⁻¹), agronomic efficiency, AE (kg·kg⁻¹) and fertilizer recovery efficiency, FRE (%) by tubers

Treatment	DW	N	NUp	AE	FRE
0	9.2 c	1.04 d	95.6 d	–	–
50	10.8 b	1.12 c	120.9 c	120.0 a	50.6 a
100	11.9 a	1.20 b	142.8 b	117.0 a	47.2 b
150	12.3 a	1.31 a	161.1 a	72.6 b	43.6 c
Impresja	8.3 c	1.27 a	105.4 c	169.2 a	48.2 ba
Mazur	11.9 b	1.11 c	131.6 ba	119.9 b	54.4 a
Otolia	10.7 d	1.27 a	132.1 ba	63.4 c	40.1 c
Szyper	11.3 c	1.12 b	126.5 b	73.8 c	44.2 bc
Widawa	12.9 a	1.07 d	138.0 a	122.0 b	50.3 ba
2016	13.0 a	1.02 c	132.6 b	116.2 a	47.5 a
2017	10.1 b	1.04 b	105.0 c	104.1 a	47.2 a
2018	10.0 b	1.45 a	145.0 a	108.7 a	47.5 a
Significance of the impact					
Nitrogen dose (1)	xx	xx	xx	xx	x
Cultivar (2)	xx	xx	xx	xx	xx
Year (3)	xx	xx	xx	n.s.	n.s.
(1×2)	x	xx	n.s.	x	xx
(1×3)	n.s.	xx	n.s.	n.s.	x
(2×3)	xx	xx	xx	xx	xx
(1×2×3)	n.s.	xx	x	x	xx
Percentage of total variability (%)					
Nitrogen dose (1)	22.3	13.4	48.7	17.0	9.9
Cultivar (2)	27.5	7.0	8.1	51.3	41.5
Year (3)	43.7	78.7	40.3	1.8	0.0
(1×2)	0.4	0.2	0.2	7.1	10.3
(1×3)	0.3	0.2	0.2	3.1	8.8
(2×3)	5.6	0.2	2.2	15.2	21.7
(1×2×3)	0.2	0.2	0.3	4.6	7.8

xx highly significant at $\alpha \leq 0.01$; x significant at $\alpha \leq 0.05$; n.s., not significant

Mean values with the same letter do not differ significantly

References

- Arriaga F. J., Lowery B., Kelling K. A. 2009. Surfactant impact on nitrogen utilization and leaching in potatoes. *American Journal of Potato Research*, 86: 383-390.
- Bac S., Koźmiński C., Rojek M. 1998. *Agrometeorology*. Warsaw, State Scientific Publisher, 274.
- Badr M. A., El-Tohamy W. A., Zaghloul A. M. 2012. Yield and water use efficiency of potato grown under different irrigation and nitrogen levels in an arid region. *Agricultural Water Management*, 110: 9-15.
- Baishya, L. K., Kumar, M., Ghosh, M., Ghosh, D. C. 2013. Effect of integrated nutrient management on growth, productivity and economics of rainfed potato in Meghalaya hills. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 6: 69-77.

- Baranowska A., Zarzecka K., Mystkowska I., Gugala M. 2017. Profitability of edible potatoes cultivation Belarosa. *Scientific Annals of the Association Agri-Economy and Agribusiness*, 19 (5): 15-19.
- Baranowska A., Mystkowska I., Szczygalska E. 2019. Impact of growth biostimulators and herbicide on the yield structure of edible potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Acta Agrophysica* 26(1): 25-36.
- Cambouris A. N., Zebarth B. J., Nolin M. C., Lavendiere M. R. 2008. Apparent fertilizer nitrogen recovery and residual soil nitrate under continuous potato cropping: Effect of N fertilization rate and timing. *Canadian Journal of Soil Science*, 88: 813-825.
- Cohan J. P., Hannon C., Houilliez C., Gravouelle J. M., Geille A., Lampaert E., Laurent F. 2018. Effects of potato cultivar on the components of nitrogen use efficiency. *Potato Research*, 61: 231-246.
- Commission Regulation (EC) No 1822/2005 of 8 November 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards nitrates in certain vegetables.
- Dzwonkowski W. 2017. Evolution of potato production in Poland and the EU. *Scientific Journal Warsaw University of Life Sciences – SGGW. Problems of World Agriculture* vol. 17 (XXXII), 3:71-80.
- Fotyma M. 2009. Monitoring of Nmin content in soil of Poland. *Fertilizers and Fertilization*, 37: 108-128.
- Fontes P. C. R., Braun H., Busato C., Cecon P. R. 2010. Economic optimum nitrogen fertilization rates and nitrogen fertilization rate effects on tuber characteristics of potato cultivars. *Potato Research*, 53: 167-179.
- Giletto C. M., Echeverría H. E. 2015. Critical nitrogen dilution curve in processing potato cultivars. *American Journal of Plant Science*, 6 (19): 3144-3156.
- Grudzińska M., Zgórska K. 2008. Impact of weather conditions on the content of nitrates (V) in potato tubers. *Food. Science. Technology. Quality*, 5 (60): 98-106.
- Goffart J. P., Olivier M., Frankinet M. 2008. Potato crop nitrogen status assessment to improve N fertilization management and efficiency: past–present–future. *Potato Research*, 51: 355-383.
- Hmelak Gorenjak A., Cencič A. 2013. Nitrate in vegetables and their impact on human health. A review. *Acta Alimentaria*, 42 (2): 158-172.
- Hmelak Gorenjak A., Urih D., Langerholc T., Kristl J. 2014. Nitrate content in potatoes cultivated in contaminated groundwater areas. *Journal of Food Research*, 3 (1): 18-27.
- Jamaati-e-Somarin S., Tobeh A., Hassanzadeh M., Hokmalipour S., Zabihi-e-Mahmoodabad R. 2009. Effects of plant density and nitrogen fertilizer on nitrogen uptake from soil and nitrate pollution in potato tuber. *Research Journal of Environmental Science*, 3: 122-126.
- Kołodziejczyk M. 2014. Effect of nitrogen fertilization and microbial preparations on potato yielding. *Plant Soil and Environment*, 60: 379-386.
- Kopiński J. 2017. Evaluation of changes in the efficiency of nitrogen utilization in agricultural production of Poland. *Scientific Annals of the Association Agri-Economy and Agribusiness*, 19 (1): 85-91.
- Lutomirska B., Jankowska J. 2012. The occurrence of misshaped tubers and tubers with cracks on the surface depending on meteorological factors and cultivars. *Bulletin* 266: 131-142.
- Maltas A., Dupuis B., Sinaj S. 2018. Yield and quality response of two potato cultivars to nitrogen fertilization. *Potato Research*, 61: 97-114.
- Marcinek J., Komisarek J., Bednarek R., Mocek A., Skiba S., Wiatrowska K. 2011. Systematics of Polish Soil. *Soil Science Annual* 62 (3): 91-147.
- Nowacki W. 2012. Comparison of integrated production to other crop cultivation systems. *Progress and Plant Protection*, 52 (3): 740-745.
- Öztürk E., Kavurmacı Z., Kara K., Polat T. 2010. The effects of different nitrogen and phosphorus rates on some quality traits of potato. *Potato Research*, 53: 309–312.
- PN-EN ISO 10520. 2002. Determination of starch content. Ewers polarimetric method.
- Pobereźny J., Wszelaczyńska E., Wichrowska D., Jaskulski D. 2015. Content of nitrates in potato tubers depending on the organic matter, soil fertilizer, cultivation. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 75 (1): 42-49
- Rens L. R., Zotarelli L., Cantliffe D. J., Stoffella P. J., Gergela D., Burhans D. 2016. Commercial evaluation of seasonal distribution of nitrogen fertilizer for potato. *Potato Research*, 59: 1-20.
- Rens L.R., Zotarelli L., Rowland D.L., Morgan K.T. 2018. Optimizing nitrogen fertilizer rates and time of application for potatoes under seepage irrigation. *Field Crops Research*, 215: 49-58.
- Rymuza K., Radzka E., Lenartowicz T., 2015. The effect of environmental conditions on starch content in the tubers of medium-early potato cultivars. *Acta Agrophysica*, 22 (3): 279-289.
- Sawicka B., Michałek W., Pszczółkowski P. 2011. Determinants of yield potential of medium-late and late potato cultivars in central-eastern Poland. *Bulletin IHAR*, 259: 219-228.
- Shrestha R.K., Cooper L.R., MacGuidwin A.E. 2010. Strategies to reduce nitrate leaching into groundwater in potato grown in sandy soils: case study from North Central USA. *American Journal of Potato Research*, 87: 229-244.
- Swain E. Y., Rempelos L., Orr C. H., Hall G., Chapman R., Almadni, M., Stockdale E. A., Kidd J., Leifert C., Cooper J. M. 2014. Optimizing nitrogen use efficiency in wheat and potatoes: interactions between genotypes and agronomic practices. *Euphytica*, 199: 119-136.
- Trawczyński C., Wierzbicka A. 2014. The uptake and utilization by potato cultivars with different earliness of nitrogen from mineral fertilizers. *Bulletin IHAR*, 271: 45-54.
- Vos J. 2009. Nitrogen responses and nitrogen management in potato. *Potato Research*, 52: 305-317.
- Wierzbicka A., Mazurczyk W., Wroniak J. 2008. Influence of nitrogen fertilization and date of harvest on some tubers quality characteristics of early potato cultivars. *Advances of Agricultural Sciences Problem Issues*, 530: 207-216.
- Zebarth B.J., Tarn T. R., de Jong H., Murphy A. 2008. Nitrogen use efficiency characteristics of andigena and diploid potato selections. *American Journal of Potato Research*, 85: 210-218.
- Zebarth B. J., Belanger G., Cambouris A. N., Ziadi N. 2012. Nitrogen fertilization strategies in relation to potato tuber yield, quality, and crop N recovery. In: Zhonggi H., Larkin R., Honeycutt W., Eds., *Sustainable potato production: Global Case Studies*: 165-186.

Historia rozwoju statystycznych metod planowania i analizy doświadczeń rolniczych na świecie oraz w Polsce

A history of the development of statistical methods for designing and analyzing agricultural experiments in the world and in Poland

Wiesław Mądry✉, Dariusz Gozdowski

Katedra Biometrii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

✉ e-mail: wieslaw_madry@sggw.pl

W pracy przedstawiono główne kierunki badań, ich chronologię oraz osiągnięcia w zakresie metod statystyki matematycznej w zastosowaniu do biometrii i doświadczeń rolniczych, dokonywane od XVII wieku do czasów współczesnych. Uwzględniono dorobek uczonych na świecie oraz w Polsce. Podkreślono historyczne i współczesne znaczenie tych osiągnięć matematycznych i metodycznych dla rozwoju i postępu nauk empirycznych w ogóle, a zwłaszcza nauk rolniczych i biologicznych. Przedstawiono znaczenie zastosowania metod statystycznych w uznaniu empirycznych badań rolniczych, jako nauki rolnicze. Świadczenia i rozważania oraz autorskie osądy odkryć i wynalazków statystycznych na przestrzeni wieków i lat są udokumentowane i zilustrowane oryginalnym i publikacjami, a także realnymi dokonaniem pionierów statystyki, biometrii i doświadczeń rolniczych oraz współczesnych uczonych w tych dziedzinach i specjalnościach.

Słowa kluczowe: metody statystyczne, metody wielowymiarowe, modele statystyczne, estymacja parametrów statystycznych, hipotezy, testowanie hipotez, układy doświadczalne, wnioskowanie statystyczne, statystycy, biometrycy

The paper presents the main directions, chronology and achievements in the field of mathematical statistical methods applied to biometrics and agricultural experimentation, conducted from the 17th century to modern times. The achievements of scientists globally and in Poland are taken into account. The historical and present importance of these mathematical and methodological findings for the development and progress of empirical sciences in general, and especially agricultural and biological sciences, is emphasized. The importance of using statistical methods in the recognition of empirical agricultural research as agricultural science is presented. Testimonies and considerations on statistical discoveries and inventions over the centuries are documented and illustrated by the original publications and real activities of the pioneers of statistics, biometrics and agricultural experimentation, as well as contemporary scientists in these fields.

Key words: statistical methods, multivariate methods, statistical models, estimation, hypothesis testing, experimental designs, statistical inference, statisticians, biometricians

Motto

Nauka jest gromadzeniem udokumentowanych faktów, tak jak dom jest tworzeniem konstrukcji z kamieni; ale, podobnie, jak stos kamieni nie jest domem, tak sam zbiór faktów bez ich filozoficznego widzenia nie musi być nauką [*Henri Poincaré (1854–1912)*].

Jesteśmy zobowiązani do badania zjawisk tym dokładniej, im trudniej przychodzi nam uznać je za istniejące (*Pierre Simon de Laplace (1749–1827)*, *Essai philosophique sur les probabilités, Paris 1814*).

1. Wprowadzenie

Źródłami wiedzy o zjawiskach rolniczych od zarania dziejów były (1) obserwacje zjawisk rzeczywistych, intuicyjne kojarzenie relacji i współistnienia zdarzeń oraz wnioskowanie o współzależnościach, przyczynowości i prognozowaniu (np. obserwacje zjawisk pogodowych i ich wpływu na rośliny) oraz (2) praktyka rolnicza, w której od tysiącleci rolnicy eksperymentowali z czynnikami przyrodniczymi i agrotechnicznymi. Rolnik, żyjący w bliskim kontakcie z przyrodą i produkcją rolniczą,

doskonalił swoje zdolności obserwacyjne i poznawcze. Jako odwieczny eksperymentator i kustosz ziemi użytkowanej rolniczo, rolnik dochodził do całkiem nowych i użytecznych odkryć. Do dzisiaj są one aktualne i fascynują swoją głębią i realizmem oraz pięknem ludowego sztuki. W Europie postęp dokonywany tą drogą zdobywania wiedzy rolniczej doprowadził do zwielokrotnienia produkcji roślinnej i zwierzęcej pomiędzy XVII, a XIX wiekiem. Jednakże, dopiero po udowodnieniu teorii o mineralnym odżywianiu się roślin przez chemika Justusa von Liebiga (1803–1873), opublikowanej w 1840 roku w dziele *Chemia organiczna i jej związek z rolnictwem i fizjologią* oraz na skutek rozwoju nauki i przemysłu w XIX wieku, zaczęły rozwijać się nauki rolnicze w Europie i Polsce. Głównym źródłem wiedzy rolniczej stawały się empiryczne badania naukowe, oparte na metodzie indukcyjno-dedukcyjnej. Empiryczne metody badań naukowych są zgodne ze współczesną (kształtującą się od XVII wieku), nowożytną filozofią nauki. Obejmują one sposoby intersubiektywnego

poznawania i tworzenia wiedzy, oparte na prawach logiki i rachunku prawdopodobieństwa. Intersubiektywność metody naukowej oznacza powtarzanie badań w takich samych lub podobnych warunkach, poprzez nowe obserwacje lub doświadczenia w celu weryfikowania wniosków, wyprowadzonych metodą indukcyjną „od szczegółu do ogółu” na podstawie badań w pierwszym etapie. Powtarzanie badań w celu naukowego uwiarygodnienia wniosków jest kluczowym wymogiem ustawicznego procesu autokorekcyjnego w metodzie naukowej. Słowami filozofa nauki Karla Poppera (1902–1994) „pojedyncze, nie powtórzone, badania empiryczne nie mają dla nauki wystarczającego znaczenia”. Luminarz statystyki matematycznej oraz biometrii i metod statystycznych w doświadczalnictwie, Ronald Aylmer Fisher (1890–1962) dodaje: „możemy uznać, że zjawisko jest udowodnione eksperymentalnie wówczas, gdy wiemy, jak przeprowadzić eksperyment, który rzadko zawiedzie w wykazaniu istotnych statystycznie faktów” (Fisher, 1935). R. Fisher ma tu na uwadze zarówno poprawny statystycznie i powtarzalny realnie eksperyment, jak i test statystyczny o dużej mocy (test zapewniający małe prawdopodobieństwo błędu II rodzaju) przy niskim poziomie istotności (test zapewniający małe prawdopodobieństwo błędu I rodzaju).

Od prawie tysiąca lat badania naukowe w fizyce, astronomii i chemii były wykonywane coraz częściej metodami empirycznymi. Jedno z pierwszych metodycznych podejść do empirii w nowoczesnym sensie jest widoczne w badaniach optycznych arabskiego matematyka, astronoma i fizyka Ibn al-Haythama (965–1040), wybitnego filozofa *złotej ery islamu*. Podstawą intelektualną naukowych metod empirycznych jest doktryna filozoficzna, nazywana empiryzmem. Głosi ona, że źródłem ludzkiego poznania są wyłącznie lub przede wszystkim bodźce zewnętrzne docierające do naszego umysłu ze świata zewnętrznego, zaś wszelkie idee, teorie itp. są w stosunku do nich wtórne. Za twórcę nowoczesnego empiryzmu uznaje się brytyjskiego filozofa oraz poetę renesansu i baroku: Francisca Bacona (1561–1626). Zwolennikami empiryzmu byli genialni, uznawani za największych w dziejach świata, uczeni: Leonardo da Vinci (1452–1519) i Galileo Galilei — Galileusz (1564–1642). Galileusz (rówieśnik F. Bacona), będąc matematykiem oraz badaczem zjawisk fizycznych i pokrewnych, uważał, że sam eksperyment nie wystarcza w poznaniu naukowym. Krytykował pierwotne traktowanie empiryzmu. Sądził on, że samo nagromadzenie obserwacji o zdarzeniach nie stanowi nauki. Twierdził, że nauka ma za zadanie odkrywać powtarzalne współistnienia zdarzeń, czyli prawa przyrody, za pomocą rozumowania indukcyjnego, opartego na empirii. Współcześni badacze, także

w biologii i rolnictwie, w ten właśnie sposób postępują, traktując badania empiryczne i teoretyczne jako wzajemnie uzupełniające się w procesie wnioskowania o mechanizmach funkcjonowania świata.

Empiryczne metody badań rolniczych polegają przeważnie na przeprowadzaniu doświadczeń porównawczych, zwanych doświadczeniami czynnikowymi. Doświadczenie czynnikowe jest zbiorem działań wzbudzających określone reakcje zjawisk w pewnym materiale, pozostającym w tych samych warunkach, ale poddanym różnemu traktowaniu w postaci zmiennej przyczyny (czynnika). Doświadczenie jest naukowym sprawdzeniem tego, co się stanie z badanymi obiektami w konkretnych warunkach pod wpływem różnego traktowania. Podstawą filozoficzną doświadczeń czynnikowych jest tzw. kanon jedynej różnicy, sformułowany w 1843 roku przez wybitnego filozofa brytyjskiego, zwolennika empiryzmu, Johna Stuarta Milla (1806–1873). Kanon ten został opublikowany w jego pracy *System logiki dedukcyjnej i indukcyjnej*. Głosi on, że jeśli różne traktowanie materiału badawczego w tych samych warunkach powoduje różne reakcje obserwowanego zjawiska, to można wyprowadzić wniosek, że zastosowany czynnik ma wpływ na to zjawisko. W toku rozwoju badań doświadczalnych w rolnictwie i biologii stosowanej oraz towarzyszącej jemu ewolucji metodologicznej, około 150 lat temu wykształciło się pojęcie doświadczalnictwo (ang. experimentation). Ogólnie, doświadczalnictwo jest procesem naukowego odkrywania natury zjawisk, testowania hipotez lub demonstracji wybranych zjawisk, przeprowadzanym za pomocą metod doświadczalnych.

Doświadczalnictwo rolnicze (ang. *agricultural experimentation*) wyodrębniło się i ukształtowało jako pierwszy historycznie wzorzec doświadczalnictwa w ogóle. Jest ono obszerną, często interdyscyplinarną w dziedzinie nauk rolniczych, działalnością naukowo-badawczą i badawczo-wdrożeniową. Doświadczalnictwo rolnicze obejmuje: (a) wykonywanie optymalnie zaplanowanych czynnikowych ścisłych (kontrolowanych) doświadczeń laboratoryjnych, wazonowych i polowych (ang. *controlled factor experiments*), zakładanie doświadczeń w gospodarstwach rolnych (ang. *on-farm experiments*) lub prowadzenie badań obserwacyjno-pomiarowych (ang. *observational and measurement studies*), takich, jak ankiety i statystyka gospodarcza (ang. *surveys, censuses*), (b) wykorzystanie wyników z tych badań do wnioskowania o zjawiskach w celach naukowych lub wdrożeniowych. Każda dyscyplina nauk rolniczych, a nawet ich specjalności wypracowały swoje specyficzne doświadczalnictwo, z osobliwymi podstawami i metodami.

Termin doświadczalnictwo rolnicze ma też inne znaczenie. Określa on nazwę interdyscyplinarnej, metodyczno-statystycznej specjalności w dwóch dziedzinach naukowych, tj. nauk rolniczych i matematycznych, która ściśle towarzyszy eksperymentalnej działalności naukowo-badawczej (ang. *design of experiments, experimental design, design and analysis of experiments*). W tym znaczeniu doświadczalnictwo rolnicze zajmuje się (a) statystyczną metodyką planowania rolniczych ścisłych doświadczeń czynnikowych, doświadczeń w gospodarstwach rolnych i badań obserwacyjno-pomiarowych oraz (b) statystyczną analizą danych, interpretacją wyników i wnioskowaniem. Ta specjalność naukowa jest często nazywana statystycznymi metodami planowania i analizy doświadczeń rolniczych, statystyczną metodyką doświadczalnictwa rolniczego lub teorią doświadczenia rolniczego (Caliński, 2012). Początek ery tworzenia statystycznych metod planowania i analizy doświadczeń rolniczych przypada na koniec XIX wieku. Zbiega się on z początkiem przełomowego kształtowania nowego działu statystyki, którym jest statystyka matematyczna.

Statystyczna metodyka doświadczalnictwa rolniczego stała się wyodrębnionym i wyspecjalizowanym działem biometrii, która obejmuje szeroko pojęte zastosowania statystyki w naukach biologicznych i biologii stosowanej (głównie w naukach rolniczych i medycznych). Ta gałąź biometrii stanowi integralną składową całość kształtu metodologii rolniczych badań doświadczalnych (Oktaba, 2002; Caliński, 2012). Należy podkreślić, że dopiero zastosowanie statystyki matematycznej w doświadczalnictwie uczyniło niezaprzeczalnie z empirycznej metody doświadczalnej metodę naukową.

Metody statystyczne planowania i analizy doświadczeń rolniczych zaczęły rozwijać się szybko, w ślad za postępem ilościowym i jakościowym doświadczalnej działalności badawczej w nauce i praktyce rolniczej oraz teorii statystyki matematycznej. Można bez wahania powiedzieć, że rewolucyjny rozwój teorii statystyki matematycznej, jako działu matematyki stosowanej, był stymulowany od przełomu XIX i XX wieku do połowy XX wieku, głównie przez rosnące potrzeby metodyki statystycznej, koniecznej do prowadzenia coraz bardziej zaawansowanych naukowo badań doświadczalnych w naukach rolniczych (chemii rolnej, hodowli i uprawie roślin) oraz naukach biologicznych. Później, aż do czasów współczesnych, dalszy nie słabnący postęp statystycznej metodyki doświadczeń był i jest sprzężony silnie z rozwojem zarówno agronomii, jak i biologii (fizjologii, genetyki), medycyny, ekologii, nauk środowiskowych oraz innych nauk wywodzących się z biologii. Także, rozwój teorii metod

statystycznych stymulował postęp w doświadczalnictwie rolniczym oraz w metodologii i zakresie jakościowym i ilościowym badań (Oktaba, 2002; Caliński, 2012).

Metody statystyczne planowania i analizy doświadczeń rolniczych, zgodnie z teorią statystyki matematycznej, obejmują dwa zagadnienia. Pierwszym jest odpowiedni układ doświadczalny. Druga problematyka dotyczy analizy statystycznej danych wraz z optymalnym wnioskowaniem o zjawisku w kategoriach parametrów zmiennych losowych w populacji generalnej. Dlatego metody statystyczne zapewniają możliwie wyczerpujące merytorycznie wnioskowanie indukcyjne o prawidłowościach badanych zjawisk na podstawie danych z przeprowadzonego doświadczenia. Tak uzyskiwane wnioski są powtarzalne, z założonym dużym prawdopodobieństwem, w kolejnych, takich samych lub podobnych eksperymentach. Dlatego, wnioski z dobrze przeprowadzonych i zinterpretowanych doświadczeń wzbogacają wiedzę naukową, zgodnie z filozofią nauki i zastosowaniem empirycznej metody naukowej.

Wnioskowanie statystyczne z danych doświadczalnych odbywa się na podstawie odpowiedniego modelu statystycznego tych danych. Model ten opisuje formalnie zależności przyczynowo-skutkowe lub/i relacje oraz współzależności różnych ekspresji badanego zjawiska. Wnioskowanie statystyczne polega na a) możliwie precyzyjnej ocenie (estymacji) parametrów modelu statystycznego, które charakteryzują prawidłowości badanych zjawisk oraz b) sprawdzaniu hipotez o tych parametrach.

W kolejnych rozdziałach będziemy odkrywać i kontemplować dokonania wielkich uczonych w Polsce i na świecie, których talent, wizja i pasja badawcza doprowadziły na przestrzeni dziejów do ukształtowania teorii statystyki matematycznej oraz biometrii i doświadczalnictwa. Ilustrują one wielkość matematyki i jej rolę w przybliżaniu naszego poznania i rozumienia praw materialnych do prawdy o rzeczywistości, koniecznych do zrównoważonego wykorzystania zasobów Ziemi. R. Fisher powiedział, że powstanie biometrii w XX wieku, podobnie jak geometrii w III wieku p.n.e., wydaje się podkreślać jeden z wielkich przełomowych okresów rozwoju myśli ludzkiej. Jest wielce znamienne, że wielcy matematycy, statystycy i biometrycy mieli zainteresowania przyrodnicze (fizyką, chemią, biologią, rolnictwem) i matematyczne oraz odebrali staranne wykształcenie w tych dziedzinach. Próba ukazania ich dzieła jest celem niniejszej pracy. Niektóre fragmenty tekstu tej pracy są zawarte w Księdze Pamiątkowej, przygotowywanej do wydania z okazji 100-lecia Doświadczalnictwa Rolniczego w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

2. Rozwój statystyki i jej zastosowań w doświadczalnictwie do 1920 roku

To, co dzisiaj nazywamy statystyką, ma dość skomplikowaną historię (Oktaba, 2002; Ostasiewicz, 2012). W niniejszym rozdziale przybliżymy część tej historii, poczynając od czasów nowożytnych, kiedy kształtowała się statystyka jako sztuka gromadzenia i wykorzystywania danych ze spisów ludnościowych i gospodarczych, a także teoria rachunku prawdopodobieństwa, aż do końca XIX wieku i pierwszych dwóch dekad XX wieku (do początku pracy R. Fishera w Rothamsted w 1919 roku), kiedy to ukształtowały się fundamenty teorii statystyki matematycznej i jej pierwszych zastosowań w biologii, czyli podstawy biometrii i metod doświadczalnictwa.

Mimo że dobrze udokumentowana historia dyscypliny, określonej jako statystyka, jest niezbyt długa, to jednak jej korzenie sięgają państw antycznych, głównie: Egiptu, Chin, Babilonu, Grecji, Persji, Indii i Rzymu, w których posługiwano się metodami, dzisiaj określanymi jako statystyczne, tj. spisami ludności i inwentaryzacją administracyjną dóbr. Obecnie tego typu działalnością, tj. statystyką gospodarczą, w Polsce zajmuje się przede wszystkim Główny Urząd Statystyczny (GUS), który prowadzi swoją działalność od ponad 100 lat (od 1918 roku). Ta zasłużona dla gospodarki i statystyki instytucja organizuje, koordynuje i wykonuje, między innymi, powszechne spisy rolne. Działalność GUS była i jest silnie inspirująca dla rozwoju metod statystycznych, zwłaszcza metod doboru próby (Neyman, 1934; Kozak, 2004 a, b) oraz szacowania i prognozowania wyników zjawisk gospodarczych.

Statystyka nowożytna pojawiła się wraz z rozwojem filozofii nowożytnej, której rozwój zawdzięczamy głównie René Descartes'owi (1596–1650), uczonemu francuskiemu o spolszczonym nazwisku Kartezjusz. Także F. Bacon, jako jeden z głównych twórców podstaw empiryzmu, miał duży wpływ na rozwój statystyki. W jego czasach rozwój statystyki zaczął być inspirowany i stymulowany uznaniem empiryzmu, jako doktryny metodologicznej badań naukowych.

Ważnym wydarzeniem w procesie narodzin statystyki, jako dyscypliny naukowej było ukazanie się w 1662 roku książki Johna Graunta (1620–1674) *Naturalne i polityczne obserwacje nad biuletynami śmiertelności*, opartej na londyńskich biuletynach śmiertelności. Graunt był wybitnym prekursorem i przedstawicielem kierunku badań nad gospodarką i demografią, zwanym arytmetyką polityczną. Badania te były oparte na wnikliwej analizie ilościowej danych ze spisów i rejestracji administracyjnej. Jako pierwszy, Graunt wykrył, że wnikliwa analiza licznych danych, pochodzących z obserwacji,

prowadzi do ukazania prawidłowości rządzących zjawiskami masowymi. Określenie *Statistik*, wywodzące się od łacińskiego słowa *status*, czyli państwo, pojawiło się po raz pierwszy w języku niemieckim w 1749 roku. Było ono użyte w pracy Gottfrieda Achenwalla (1719–1772) w rozumieniu wiedzy o państwie. Aż do połowy XIX wieku, statystyka, jako sztuka analizy danych, rozwijała się w Europie zachodniej, głównie na potrzeby państwowostwa. Te potrzeby były aż do prawie końca XIX wieku, ważną siłą inspirującą postęp w statystyce. Od co najmniej połowy XIX wieku statystyką zaczęli interesować się też przyrodnicy, biolodzy, rolnicy i lekarze.

Pierwszym śladem zainteresowań rachunkiem prawdopodobieństwa i statystyką w Polsce są *Dyskursy*, autorstwa wybitnego uczonego Jana Śniadeckiego (1756–1830), a także jego rękopis z 1790 roku *Rachunek zdarzeń i przypadków losu* (Ostasiewicz, 2012). Dla propagowania i rozwoju myśli statystycznej w naszym kraju w zastosowaniu do gospodarki oraz administracji państwa polskiego pod zaborami w dobie Księstwa Warszawskiego i początku Królestwa Polskiego, wielce zasłużył się Stanisław Staszic (1755–1826), znakomity, wszechstronnie wykształcony we Francji (studiował w Collège de France i Instytucie Przyrodniczym w Paryżu) naukowiec, przyrodnik oraz działacz państwowy, naukowy, gospodarczy, edukacyjny i społeczny. Na początku XIX wieku Staszic opublikował pracę *Statystyka Polski*, gdzie starał się pokazać Napoleonowi obraz historyczny i gospodarczy kraju, w którym tworzone Księstwo Warszawskie. Staszic był jednym z najważniejszych inicjatorów założenia w roku 1816 Instytutu Agronomicznego w Marymoncie pod Warszawą, którego kontynuatorką tradycji i historii jest Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Statystyka została formalnie uznana za naukę w początkach XIX wieku, kiedy to włączono ją jako sekcję do Brytyjskiego Towarzystwa Postępu Nauki i utworzono w roku 1834 Królewskie Towarzystwo Statystyczne. W drugiej połowie XIX wieku świadomość statystyczna w krajach Europy zachodniej była wysoka. Odbywały się międzynarodowe zjazdy statystyczne, znane były prace matematyków europejskich z rachunku prawdopodobieństwa. Ukazywały się też monografie. Ostasiewicz (2012) podaje, że w Polsce pierwsze książki na temat statystyki wydali w latach 1868–1870 Witold Załęski (1836–1908) oraz Zdzisław Korzybski (1834–1896). W. Załęski traktował metodę statystyczną jako jedną z metod poszukiwań naukowych. Uważał, że w świecie rzeczywistym zdarzenia zależą od przyczyn deterministycznych i losowych. Dlatego, głównym zadaniem statystyki jest usunięcie efektów losowych w analizie danych empirycznych i wykrycie prawa statystycznego,

które jest wyrazem prawa funkcjonowania świata rzeczywistego. Były to bardzo światłe poglądy o roli statystyki w empirycznym badaniu zjawisk. Dzisiaj statystyka spełnia tę samą rolę w naukowych badaniach empirycznych we wszystkich dziedzinach nauki. Około 1900 roku statystyka stała się już odrębną i dojrzałą dyscypliną naukową, która była wtedy na progu przełomowej ery wschodzenia i rozwoju teorii statystyki matematycznej, w której dotychczasowa statystyka została zamieniona w dział matematyki stosowanej, gwarantującej naukowy charakter empirycznej metody badań. Podstawą statystyki matematycznej jest teoria rachunku prawdopodobieństwa, tworzona zwykle z inspiracji empirycznej w celu opisu i analizy prawidłowości w zjawiskach masowych. Te zjawiska z natury mają charakter losowy lub deterministyczno-losowy, czyli nie są one w pełni kontrolowalne przez człowieka. Rozwój teorii probabilistycznej został zapoczątkowany w drugiej połowie XVII wieku przez francuskich matematyków: Blaise Pascala (1623–1662) i Pierre Fermata (1601–1665), którzy matematycznie uzasadnili prawidłowości występujące w grach losowych. Dalszy rozwój probabilistyki zawdzięczany jest m.in. takim matematykom, jak: Jakub. Bernoulli (1655–1705), który jako pierwszy uzasadnił i matematycznie określił tzw. prawo wielkich liczb, Abraham Moivre (1667–1754), który wprowadził pojęcie rozkładu prawdopodobieństwa oraz uogólnił prawo wielkich liczb Jakuba Bernoulliego (w pracy z 1733 roku), Daniel Bernoulli (1700–1782), który znacząco rozwinął probabilistyczną teorię błędów, Thomas Bayes (1702–1761) oraz Pierre Simon Laplace (1749–1827). Bayes był matematykiem najbardziej znanym ze sformułowania opublikowanego pośmiertnie twierdzenia Bayesa. Dotyczy ono prawdopodobieństwa warunkowego dwóch zdarzeń losowych. Na bazie tego twierdzenia została rozwinięta teoria wnioskowania bayesowskiego (statystyki bayesowskiej). Probabilistyczna teoria Bayesa znajduje obecnie liczne zastosowania, między innymi w metodach statystycznych, opartych na modelach liniowych i nieliniowych dla sklasyfikowanych danych doświadczalnych (da Silva i in., 2019). Laplace stworzył klasyczną definicję prawdopodobieństwa zdarzenia losowego oraz paradygmat klasycznego determinizmu. Teorie te przedstawił w monografiach *Théorie analytique des probabilités*, wydanej w 1812 roku oraz *Essai philosophique sur les probabilités*, wydanej w 1814 roku. Wymieniony paradygmat uznaje istnienie obiektywnych praw przyrody, które całkowicie determinują zjawiska rzeczywiste, więc człowiek, znając wszystkie prawa, którym podlegają zjawiska i mogąc je analizować, mógłby przewidzieć oraz częściowo kontrolować przebieg i rezultaty zjawisk. Pierre Simon

Laplace i Carl Friedrich Gauss (1777–1855) określili wzór funkcji gęstości prawdopodobieństw rozkładu normalnego zmiennej losowej, wzorując się na teorii błędów. Gauss, jako pierwszy, wyodrębnił składnik systema-tyczny i losowy w matematycznym opisie zjawisk masowych, w czym wyprzedził koncepcje regresyjne twórców statystyki matematycznej z końca XIX i pierwszych dwóch dekad XX wieku. Miał także znaczący udział, obok Adrien-Marie Legendre (1752–1833), w opracowaniu metody najmniejszych kwadratów, stanowiącej ważne kryterium w statystycznej estymacji parametrów zmiennych losowych w populacji generalnej. Zatem, ci dwaj wielcy matematycy: Laplace i Gauss wnieśli swój wczesny wkład w rozwój statystyki matematycznej, zanim opracowano jej teorie.

Przez drugą połowę XVII wieku, cały XVIII wiek oraz prawie cały XIX wiek teoria rachunku prawdopodobieństwa i statystyka budziły rosnące zainteresowanie wybitnych matematyków i fizyków oraz naukowców i administratorów, głównie w dziedzinie państwowostwa, arytmetyki politycznej i nauk przyrodniczych. Jednakże, dwie wymienione dyscypliny rozwijały się w znacznej izolacji, pierwsza miała charakter wybitnie matematyczny, choć była inspirowana empiryzmem, druga zaś miała wymiar empiryczny i aplikacyjny. Trwające dwa wieki prace arytmetyków politycznych, przyrodników, biologów oraz matematyków, rozwijających i coraz odważniej stosujących rachunek prawdopodobieństwa do wnioskowania z danych, doprowadziły w ostatniej ćwierci XIX wieku do znacznego zbliżenia ich celów badawczych oraz interdyscyplinarnej współpracy. Zaowocowała ona powstaniem nowego działu statystyki, jakim jest statystyka matematyczna. Prekursorami teorii statystyki matematycznej i jej pierwszych zastosowań w naukach biologicznych i rolniczych byli trzej Brytyjczycy, tj. Francis Galton (1822–1911), Karl Pearson (1857–1936) i William Sealy Gosset (1876–1937). Natomiast, największy wkład w rozwój teorii statystyki matematycznej i jej zastosowań wnieśli dwaj Brytyjczycy, tj. Ronald Fisher (1890–1962) i Egon Sharpe Pearson (1895–1980) oraz Polak Jerzy Sława-Neyman (1894–1981), publikujący od połowy 1920. lat pod nazwiskiem Jerzy Neyman (Statystycy Polscy, 2012).

Pierwsze idee, koncepcje i metody statystyki matematycznej, podobnie, jak wcześniejsza statystyka, zrodziły się z inspiracji i potrzeb praktycznych w biologicznych oraz przyrodniczo-technologicznych badaniach teoretycznych i empirycznych. Kategorie te dotyczyły populacji generalnej zdarzeń (jednostek) w zjawisku masowym oraz próby losowej i reprezentatywnej, teorii estymacji punktowej parametrów

statystycznych zmiennej losowej w populacji na podstawie dużej i małej próby, rozkładów prawdopodobieństw i częstości błędów i ich wariacji, statystycznej koncepcji korelacji i współczynnika korelacji prostej oraz liniowej regresji prostej. Do zdefiniowania i matematycznego ujęcia wielu z tych pierwszych, fundamentalnych koncepcji i technik statystyki matematycznej oraz ich zastosowania w teorii ewolucji, genetyce populacji cech skategoryzowanych i ilościowych, eugenice, medycynie, psychologii, a także w rolnictwie i technologii ogromnie przyczynili się Galton, K. Pearson oraz Gosset. Galton był pionierem zastosowania teorii rozkładu normalnego do dopasowania histogramów częstości na podstawie dużych prób, pracując nad tym zagadnieniami w latach 1870. oraz 1880. Na przełomie XIX i XX wieku, jeszcze przed powtórным odkryciem praw Mendla około 1900 roku, najpierw Galton, na gruncie ówczesnej wiedzy biologicznej, zaś później jego następca i kontynuator K. Pearson, z zastosowaniem teorii rachunku prawdopodobieństwa i statystyki matematycznej, stworzyli pierwszą szkołę biometrii oraz biometrycznej szkoły dziedziczenia i ewolucji.

K. Pearson w latach 1893–1904 bardzo rozwinął też techniki statystyczne na rzecz biometrii, szczególnie metody korelacji i regresji prostej oraz regresji wielokrotnej liniowej i nieliniowej, a także analizy składowych głównych. Wyniki jego pionierskich prac zostały opublikowane w 1901 roku (Pearson, 1901). Podkreślmy, że dwie pierwsze metody zostały opracowane pierwotnie, w latach 1880. w wersji graficznej i rachunkowej przez Galtona w trakcie rozwiązywania przez badacza różnych problemów w biologii: antropologii, genetyce ilościowej i eugenice. Były one szeroko promowane przez obu twórców, więc szybko znalazły zastosowanie w badaniach biologicznych, medycznych, antropologicznych, psychologicznych i innych, zaraz po ich publikacji w 1901 roku. K. Pearson był nie tylko prekursorem teorii estymacji parametrów, opracowując metodę momentów, ale teorii testowania hipotez statystycznych, wykorzystując rozkład chi-kwadrat i znaną w statystyce wartość p . Takie podejście K. Pearsona, podane w 1900 roku, choć ukierunkowało myślenie późniejszych twórców teorii testowania hipotez, Fishera, Neymana i E. Pearsona, to nie zostało ono przez nich przyjęte w pierwotnym kształcie (Johnson i Kotz, 1997). K. Pearson współzałożył w 1901 roku czasopismo *Biometrika*, które funkcjonuje do dziś i jest wciąż bardzo prestiżowe wśród statystyków i biometryków. Do około 1900 roku teoria estymacji (bez estymacji przedziałowej), oparta na dużej próbie, była już dobrze rozwinięta, głównie przez Galtona i K.

Pearsona. Jednakże, nie była ona wystarczająca dla Gosseta w prowadzonych przez niego pracach naukowo-wdrożeniowych. Jako dyplomowany chemik podjął on w 1899 roku prestiżową pracę analityka naukowego danych w browarze Guinnessa. Gosset miał do dyspozycji u swojego pracodawcy tylko małe zbiory danych (mało liczne próby). Zatem, opracował on własną, oryginalną teorię estymacji parametrów (dla przypadku średniej populacji i współczynnika korelacji prostej), opartej na małej próbie z wykorzystaniem probabilistycznych rozkładów dla błędów estymacji. W tym zakresie Gosset jest najbardziej znany ze swego pionierskiego odkrycia, opublikowanego w 1908 roku pod pseudonimem Student, jakim było opracowanie teorii rozkładu t (Student 1908). Rozkład t jest rodziną ciągłych rozkładów prawdopodobieństw, wywodzących się ze standaryzowanego rozkładu normalnego, który opisuje rozkład błędów estymacji średniej rozkładu normalnego w populacji wówczas, gdy liczebność próby jest mała, a odchylenie standardowe jest nieznane. W 1925 roku rozkład t został nazwany przez Fishera rozkładem Studenta, a później rozkładem t -Studenta, zaś oparty na nim podstawowy test statystyczny nazwano testem t -Studenta (Fisher, 1925).

Rozkład t -Studenta jest podstawą wielu innych późniejszych teorii i procedur statystycznych, takich, jak np. przedziały ufności dla średnich jednej i dwóch populacji, autorstwa Neymana (Neyman, 1937), a także analiza regresji i testy wielokrotnych porównań średnich obiektowych w doświadczalnictwie (Miller, 1981). Gosset był przyjacielem zarówno K. Pearsona (u którego odbył staż naukowy w University College of London w latach 1906/1907), jak i Fishera oraz E. Pearsona. Gosset ma także pionierski wkład do teorii eksperymentu. Planował on i nadzorował doświadczenia polowe z odmianami jęczmienia browarnego na użytek doskonalenia produkcji piwa w browarze Guinnessa, wkrótce po jego zatrudnieniu w 1899 roku. Fisher miał wielkie uznanie dla Gosseta za jego teorię wnioskowania z małych prób, niezwykłą intuicję badawczą, praktyczne nastawienie i prostotę podejścia w rozwijaniu statystyki matematycznej (Johnson i Kotz, 1997).

W pierwszych latach XX wieku, największy polski antropolog i biometryk tamtych czasów, Jan Czekanowski (1882–1965) stosował i promował metody korelacji i regresji wśród antropologów niemieckich, zyskując ich pełną akceptację i uznanie. Czekanowski, jako student Uniwersytetu w Zurychu (1902–1906) napisał artykuł o biometrii, a w roku 1913 opublikował pierwszy podręcznik biometrii w języku polskim *Zarys metod statystycznych w zastosowaniach do antropologii*. Dzieło ukazało się zaledwie

w dwa lata po pierwszym na świecie podręczniku statystyki matematycznej *An introduction to the theory of statistics*, autorstwa G. Yule'a. Podręcznik Czekanowskiego, zawierający m.in. wnioskowanie oparte na współczynniku korelacji oraz regresji prostej i wielokrotnej, odegrał wybitną rolę w rozpowszechnianiu biometrii wśród uczonych polskich przed I wojną światową i w okresie międzywojennym (Caliński, 2012; Statystycy Polscy, 2012). Statystyk Jan Czekanowski i geograf Eugeniusz Romer (1871–1954) odegrali znakomitą rolę ekspertów do spraw geograficznych, demograficznych i antropologicznych przy delegacji polskiej na konferencji pokojowej w Paryżu, odbywającej się w latach 1919–1920 i kończącej I wojnę światową. Pracowali oni tam od końca grudnia 1918 roku do końca października 1919 roku (Romer, 1989). Ich światłe argumenty merytoryczne, dotyczące praw Polski do odzyskania terytorium I Rzeczypospolitej w granicach z 1772 roku, miały duże znaczenie w negocjacjach pokojowych i pomogły przekonać zwycięskie mocarstwa w sprawie granic odrodzonej po zaborach Polski. Wśród Polaków, pionierską i ogromną rolę w zastosowaniach statystyki matematycznej w doświadczałnictwie rolniczym w końcu XIX wieku i pierwszych trzech dekadach XX wieku odegrał Edmund Załęski (1863–1932), z wykształcenia chemik, a z zainteresowań i dorobku także agrotechnik, hodowca roślin, doświadczałnik i statystyk, znakomita postać polskiej nauki rolniczej, prekursor teorii i zastosowań metod statystycznych w doświadczałnictwie i hodowli roślin w Polsce i na świecie. E. Załęski, pracował od 1888 roku w hodowli i nasiennictwie głównie buraka cukrowego i pszenicy, a od 1893 roku we własnej firmie hodowlanej (E. Załęski i S-ka), później w innych hodowlach. W tym czasie rozwijał swoją wiedzę matematyczną i statystyczną, wyniesioną z Politechniki w Rydze oraz konfrontował ją twórczo i wytrwale z praktyką doświadczałną w rozwijającej się hodowli roślin i ocenie odmian, doskonalił metodykę planowania i analizy doświadczeń. Doszedł on znacznie wcześniej przed Gossetem i Fisherem, do wspaniałych rozwiązań metodyczno-statystycznych i bardzo wysokiej precyzji doświadczeń rolniczych (nie osiągniętej jeszcze wtedy na zachodzie Europy), zwłaszcza w hodowli roślin. Znane jest zastosowanie metod E. Załęskiego w 1898 roku przez Aleksandra Janasza i Władysława Mayzela do doświadczeń zbiorowych, tzn. doświadczeń wielokrotnych. W 1907 roku E. Załęski wydał, jednocześnie w 5. językach, wyniki swoich osiągnięć w postaci publikacji *Instrukcja do urządzania doświadczeń porównawczych z różnemi odmianami buraków cukrowych*. Jest

ona uważana za pierwszy systematyczny wykład metodyki doświadczeń rolniczych z zastosowaniem rachunku prawdopodobieństwa i wczesnych metod statystycznych. Swoją pracą z 1907 roku E. Załęski wyprzedził co najmniej o rok pierwsze prace niemieckie i angielskie z tej dziedziny.

E. Załęski przedstawił tam także, opracowane przez siebie w ciągu prawie 20 lat pracy doświadczałnika, zasady stosowania wielu powtórzeń w doświadczeniach czynnikowych (nieznane jeszcze na Zachodzie) oraz koncepcję i zastosowanie metody wzorcowej (Statystycy Polscy, 2012). Metoda ta wykorzystuje wzorec (ang. *standard*), czyli ten sam obiekt doświadczałny, wysiewany w stałym odstępnie w różnych miejscach pola, do poprawienia obserwacji badanych obiektów ze względu na zmienność systematyczną żyzności glebowej. Polega ona na odtworzeniu za pomocą interpolacji liniowej hipotetycznych wartości danej cechy dla obiektów jednopowtórzeniowych, znajdujących się między systematycznie wysiewanymi wzorcami. Na poprawionych danych przeprowadzano analizy statystyczne, dostępne w tamtych latach, zaś od lat 1920., posługiwano się analizą wariancji. Edward Kostecki, bliski wieloletni współpracownik E. Załęskiego, wydał świadectwo o dziele swego mistrza z 1907 roku i jego znaczeniu w tamtym czasie, publikowane w *Gazecie Rolniczej* z 1933 roku (<http://dlibra.umcs.lublin.pl/dlibra/plain-content?id=6355>). Píše on „wyłuszczone w tej pracy zasady metodyczne, co ważniejsze, zasady te od razu stosowane przez Załęskiego i innych hodowców w praktyce, rzeczywiście o wiele wyprzedzały nie tylko oficjalnie obowiązujące przepisy, stosowane wówczas na Zachodzie, ale w wielu razach jeszcze dziś Zachód nie doszedł do ścisłości, osiągniętej metodami E. Załęskiego”. W 1908 roku na Międzynarodowym Zjeździe Rolniczym w Wiedniu, na wniosek E. Załęskiego podjęto rezolucję o stosowaniu metody najmniejszych kwadratów w doświadczałnictwie rolniczym do krytycznego wnioskowania. Późniejszy, dokonany po 1920 roku, imponujący wkład E. Załęskiego i jego licznych uczniów do teorii i praktyki doświadczałnictwa będzie opisany w rozdziale 3.

Alfred Hall (1864–1942), kierujący Stacją Doświadczałną w Rothamsted w latach 1902–1912, propagował i promował statystykę w licznych doświadczeniach rolniczych w tej sławnej rolniczej instytucji naukowej, dostrzegając wielką wartość danych zgromadzonych tamże od 1843 roku. Hall pracował na rzecz doskonalenia metodyki doświadczeń rolniczych w tych samych latach, co Załęski w Polsce, a Gosset w Anglii i Irlandii, którego polski uczyony cenił i współpracował z nim. W 1909 roku Hall opublikował

artykuł o znaczeniu błędu eksperymentalnego w doświadczeniach polowych (Hall, 1909). W tej pracy autor pisze „doświadczenia polowe, bez względu na badane czynniki, podlegają wielu źródłom błędów, głównie z powodu zmienności glebowej, zaś właściwa ocena zmienności błędu doświadczalnego decyduje o wiarygodności oceny efektów czynnikowych”. Dlatego Hall wykorzystał pewne podstawowe pojęcie statystyki (obliczanie średnich i ich błędów standardowych), aby określić, „jakie różnice średnich plonu dla dwóch obiektów doświadczalnych można uznać jako efekt różnego działania tych obiektów, a jakie różnice tych średnich wynikają ze zmienności błędu doświadczalnego”. Jak widać, rozumowanie Halla jest kolejnym, obok myśli Załęskiego i Gosseta, pierwowzorem nowej teorii testowania istotności statystycznej różnic średnich obiektowych, opracowanej w latach 1920. i 1930. zarówno przez Fishera, jak i wspólnie przez Neymana i E. Pearsona. Rok później Hall z agronomami podjęli próbę określenia liczby powtórzeń w doświadczeniach polowych w Rothamsted, które zapewniałyby stwierdzenie istotnych statystycznie różnic średnich obiektowych. Wyniki opublikowano w 1911 roku w *Journal of Agricultural Science*. To było prawdziwe prekursorstwo i zapowiedź tego, co miało nastąpić w Rothamsted 10 lat później. Kolejną zasługą Halla i współpracowników jest wdrożenie w 1910 roku i propagowanie na Zachodzie koncepcji doświadczalnego badania jednorodności pola. Takie badania polegają na wykonaniu doświadczeń beczynnikowych, nazywanych też doświadczeniami ślepych (ang. *uniformity trials, blank trials, dummy trials*), w których stosuje się wyrównaną uprawę jednej rośliny na polu doświadczalnym. Doświadczenia te służą ocenie zmienności przestrzennej żyzności glebowej w obrębie testowanego pola, na podstawie uzyskanych danych dla plonu lub innych zmiennych agronomicznych na najmniejszych poletkach, wydzielonych na tym polu. Dane te pozwalają także na wyznaczenie takiej wielkości i kształtu poletek oraz liczby poletek w bloku, które zapewniają możliwie minimalną ocenę wariancji błędu na testowanym polu doświadczalnym. Zatem, doświadczenia beczynnikowe przyczyniają się do zwiększenia precyzji doświadczeń i mocy testowania hipotez statystyczno-merytorycznych. Jest godne podkreślenia, że ideę doświadczenia beczynnikowego w swoich badaniach hodowlanych i odmianowych wprowadził i stosował też E. Załęski, już na początku XX wieku. Koncepcja doświadczeń beczynnikowych jest wciąż aktualna i stosowana w doświadczalnictwie polowym, chociaż stanowi ona duże wyzwanie praktyczne dla badacza. Analiza danych z doświadczeń beczynnikowych Halla

i współpracowników była ważną inspiracją dla Fishera przy tworzeniu blokowych układów doświadczalnych (Speed, 1992).

Należy podkreślić, że największy wpływ na rozwój statystycznej metodyki doświadczeń rolniczych na świecie od przełomu wieków do 1920 roku wywarli E. Załęski w Polsce oraz Gosset i Hall w Wielkiej Brytanii (Johnson i Kotz, 1997; Statystycy Polscy, 2012). Wszyscy oni bazowali na fundamentalnym dorobku F. Galtona i K. Pearsona w zakresie statystyki i biometrii.

W 1912 roku Hall odszedł z pracy w Stacji Doświadczalnej w Rothamsted. Zastosowanie metod statystycznych w tej instytucji naukowej miało zostać wznowione dopiero po I wojnie światowej. Stacja, pod kierownictwem w latach 1912–1943 chemika rolnego Edwarda Johna Russella (1872–1965), zatrudniła w jesieni 1919 roku matematyka oraz dobrze zapowiadającego się statystyka i genetyka, Ronalda A. Fishera. Wcześniej, w latach 1912–1918, opublikował on już kilka znaczących publikacji, dotyczących podstaw statystyki matematycznej i jej zastosowań w genetyce. Na uwagę zasługuje pionierska, fundamentalna dla genetyki ilościowej, praca z 1918 roku (Fisher, 1918). Zawiera ona matematyczne podstawy genetyki cech ilościowych i model liniowy: $P = G + E$, określający wartość fenotypową cechy ilościowej osobnika w populacji, jako sumę efektu genotypowego i środowiskowego. Równanie to było rezultatem dorobku genetyki pierwszych 15 lat jej rozwoju oraz myślenia matematycznego. Jest ono matematycznym modelem genetyczno-środowiskowego uwarunkowania zmienności fenotypowej organizmów żywych, będącym podstawą współczesnej genetyki ilościowej i jej zastosowań. Stacja Doświadczalna w Rothamsted oczekiwała od Fishera przeprowadzenia naukowej analizy dużych zbiorów danych z doświadczeń polowych, wykonywanych od 1843 roku, których nikt przed nim opracować nie potrafił, a on uczynił to za pomocą nowoczesnych metod statystycznych. Późniejsze rezultaty pracy Fishera oraz jego uczniów i następców, uzyskane w Rothamsted, przerosły najśmielsze oczekiwania. Stanowią one doniosły udział w rozwoju teorii statystyki matematycznej i jej zastosowań w doświadczalnictwie rolniczym. Te osiągnięcia będą przedstawione w rozdziale 3.

3. Osiągnięcia w metodyce doświadczalnictwa w Rothamsted, na świecie i w Polsce w latach 1920–1945

Znaczący rozwój nowoczesnej teorii i zastosowań statystyki matematycznej, poczynając od teorii estymacji, zaczął się dopiero od prac Gosseta, dotyczących małych prób statystycznych, a zwłaszcza od pracy z 1908 roku o rozkładzie *t*-Studenta. Rozwój tych dyscyplin został gwałtownie

przyspieszony od 1920 roku za sprawą dwóch największych statystyków, Fishera oraz Neymana, kiedy Fisher podjął swoją pracę w końcu 1919 roku w Stacji Doświadczalnej w Rothamsted, a Neyman po przyjeździe z Rosji do Polski w 1921 roku zaczął pracować najpierw w Państwowym Naukowym Instytucie Rolniczym w Bydgoszczy, a później w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (od 1923 roku) i Instytucie im. Nęcickiego w Warszawie (od 1928 roku). Stacja w Rothamsted była pierwszą w świecie instytucją naukową, w której Zakład Statystyki, założony przez Fishera w 1920 roku, był włączony do regularnej współpracy z naukowcami doświadczalnymi. Przyjęto także słuszne założenie, że rozwój metodyki statystycznej doświadczeń może następować tylko na skutek stymulacji przez rosnące potrzeby badaczy doświadczalników. Taka strategia organizacji pracy naukowej w tej sławnej instytucji okazała się owocna zarówno dla stacji, jak i świata, dając przez to wszystkim nam współczesnym jak najlepszy wzór do naśladownictwa. Zatem, jest zrozumiałe, że najważniejszym stymulatorem historycznego rozwoju nowoczesnej teorii statystyki w latach 1920. i 1930. było właśnie doświadczalnictwo rolnicze (Statystycy Polscy, 2012).

Imponujący wpływ na proces rozwoju statystyki matematycznej i jej zastosowań, jaki wywarli najwięksi statystycy: Fisher i Neyman, a także charakter i znaczenie ich dorobku przedstawił Erich L. Lehmann (1917–2009) w swojej obszernej monografii (Lehman, 2011). Ten autor cenionych prac i monografii w zakresie dziejów teorii statystyki matematycznej i jej zastosowań, pracował w Uniwersytecie Kalifornijskim w Berkeley, USA, tym samym, w którym pracował także Neyman od 1938 roku. Lehmann, uczeń i współpracownik Neymana, wyczerpująco dokumentuje i wyjaśnia dokonania Fishera i Neymana oraz ich wkład w opracowanie klasycznej teorii testowania hipotez statystycznych oraz planowania doświadczeń i badań obserwacyjnych lub quasi-doświadczeń. Ich wkład czasami się uzupełniał, czasami wiódł równolegle, a szczególnie na późniejszych etapach ich pracy często znajdował się w silnym sprzeczności. Ta cała historia i rezultat ich naukowych zmagani i intelektualnych postaw, jako ludzi o wielkich umysłach i sile ducha, jest nieprzebranym bogactwem, stanowiącym fundament, na którym stoi obecna statystyka i nauki empiryczne, które przez statystykę są naukami, a nie tylko rodzajem sztuki.

Fisher w swojej pionierskiej pracy z 1922 roku przedstawił fundamenty matematyczne wnioskowania statystycznego, skupiając się na ówczesnych swoich i innych dokonaniach, a dotyczyły one podstaw filozoficznych statystyki

matematycznej oraz estymacji parametrów populacyjnych (Fisher, 1922). Autor pisze, że „przedmiotem metod statystycznych jest redukcja danych”, polegająca na tym, aby „...cała informacja w danych była wiarygodnie przedstawiona za pomocą niewielu wielkości”. Chcąc zrealizować ten cel, uczyony przypomina (po Galtonie i K. Pearsonie) lub wprowadza swoje podstawowe pojęcia statystyczne (znane dzisiaj każdemu statystykowi i stosującemu statystykę). Należą do nich: hipotetyczna nieskończona populacja zdarzeń (ang. *hypothetical infinite population*), próba losowa (ang. *random sample*) reprezentująca tę populację, rozkład prawdopodobieństw populacji pod względem pewnej zmiennej losowej (ang. *law of distribution of this hypothetical population*) oraz parametry populacji (ang. *population parameters*). Te parametry dobrze opisują rozkład prawdopodobieństw zmiennej w populacji. Autor podaje trzy rodzaje problemów we wnioskowaniu statystycznym: (1) określenie matematycznego modelu populacji, czyli rozkładu zmiennej losowej, (2) wybór metod estymowania parametrów populacji, (3) określenie rozkładu prawdopodobieństw estymatorów. Definiuje też własności estymatorów, tj. zgodność (ang. *consistency*) i efektywność (ang. *efficiency*). Wprowadza metodę wiarygodności w estymowaniu parametrów populacyjnych i dowodzi, że estymatory parametrów rozkładu normalnego w populacji są dokładniejsze niż te uzyskane metodą momentów K. Pearsona.

Przełomowym etapem współistnienia rozwoju teorii statystyki matematycznej oraz metod planowania i analizy doświadczeń w latach 1920. było tworzenie podstaw matematycznych (teorii) testowania hipotez statystycznych, które są domniemaniami o wartościach zmiennej losowej w zjawisku masowym (populacji zdarzeń). Metody oparte na tych teoriach, stosowane w badaniach doświadczalnych, pozwalają na wiarygodne odróżnienie rzeczywistych skutków badanych przyczyn (czynników) od takich skutków, które pojawiły się w wyniku błędu losowego próbkowania lub jakiegokolwiek niekontrolowanej zmienności. Dwie, do dzisiaj uważane za klasyczne, chociaż oparte na różnych zasadach logiki probabilistycznej, teorie testowania hipotez statystycznych opracowali Fisher oraz wspólnie Neyman i E. Pearson. Pierwsza teoria, opracowywana przez Fishera od roku 1921 (Fisher, 1921), obejmuje testy istotności (ang. *tests of significance*). Druga zaś, stworzona kilka lat później, przez Neymana i E. Pearsona pod koniec lat 1920. i początku lat 1930. (Neyman, Pearson, 1928), uwzględnia testy hipotez statystycznych (ang. *tests of statistical hypotheses*). Obie, dojrzałe już teorie, zostały przedstawione nieco później (Neyman, Pearson 1933; Fisher, 1935a).

Punktem wyjścia obu teorii testowania hipotez statystycznych jest założenie, że wnioskowanie statystyczne jest postępowaniem opartym na zasadzie naukowej indukcji, czyli wnioskowaniu „od szczegółu do ogółu lub, w języku statystycznym, od próby do populacji” (Okta, 2002; Lehmann, 2011). W podejściu Fishera formułuje się tylko jedną hipotezę — hipotezę zerową, H_0 , która odpowiada przyjętemu modelowi badawczemu. Wybierana jest statystyka testowa T o znanym rozkładzie prawdopodobieństwa, jeśli H_0 jest prawdziwa. Duża bezwzględna wartość T , obliczona na podstawie próby, a więc małe prawdopodobieństwo p ($p < \alpha$, gdzie α jest poziomem istotności, czyli prawdopodobieństwem błędu pierwszego rodzaju), dostarcza badaczowi dowodów przeciwko H_0 i upoważnia go do odrzucenia H_0 . Jeśli $p > \alpha$, hipoteza H_0 nie zostaje odrzucana, co stanowi poważny dalszy problem badawczy, ponieważ taki wniosek nie oznacza, że hipoteza H_0 jest prawie na pewno prawdziwa. W podejściu Neymana-Pearsona formułuje się dwie hipotezy, zarówno hipotezę zerową H_0 , jak i alternatywną H_1 . Sposób postępowania autorów podczas testowania hipotezy jest następujący: odrzucenie H_0 , jeśli $|T| \geq c$ i zaakceptowanie alternatywnej H_1 , albo przyjęcie H_0 , gdy $|T| < c$, gdzie c jest z góry ustaloną wartością krytyczną funkcji testowej, przy założonym prawdopodobieństwie błędu pierwszego rodzaju α i nieznanym prawdopodobieństwie błędu drugiego rodzaju β .

Obecnie, w praktyce zastosowań statystyki, teoria testowania hipotez Neymana-Pearsona z poziomem istotności α jest powszechnie uznawana jako norma w metodologii testowania hipotez statystycznych (Lehmann, 2011). Jednak metoda Fishera testowania istotności, gdzie wartość p jest tylko prawdopodobieństwem przeciwko prawdziwości hipotezy zerowej (nie zaś poziomem istotności α), zdominowała praktykę testowania. W obecnie stosowanym podejściu do testowania hipotez statystycznych zostały wykorzystane obydwie metody sprawdzania hipotez: Fishera oraz Neymana-Pearsona, tworząc swoistą, mieszańcową, procedurę użytkową (Greenland i in., 2016). Warto podkreślić, że w każdym komercyjnym pakiecie statystycznym wszędzie, gdzie testowane są hipotezy statystyczne, jest liczona wartość prawdopodobieństwa p . Patrząc uważnie na takie procedury statystyczne, widzimy, że ich stosowanie przez profesjonalnych badaczy nie musi być zagrożeniem dla wiarygodności wnioskowania statystycznego i naukowego — przecież badacz i tak nie jest w stanie określić w swoich badaniach prawdopodobieństwa błędu drugiego rodzaju β i mocy testu $1 - \beta$, chociaż może je wykorzystać jako źródło inspiracji w doskonaleniu teorii i praktyki metod

eksperymentalnych, zmierzających do redukcji wariancji błędów estymacji. Współcześnie w środowisku statystycznym i biometrycznym toczy się ożywiona dyskusja nad znaczeniem teorii Neymana, dotyczącej przedziałów ufności oraz teorii Fishera i Neymana-Pearsona, dotyczącej testowania hipotez, a także nad przydatnością naukową narzędzi wnioskowania statystycznego, opartych na tych teoriach (Hurlbert i Lombardi, 2009; Greenland i in., 2016).

Fisher, pracując bardzo twórczo i owocnie w okresie 14 lat w Stacji Doświadczalnej w Rothamsted w latach 1919–1933, zdominował historię rozwoju statystycznych metod planowania i analizy doświadczeń rolniczych między wojnami światowymi, 1918–1939. To były wspaniałe lata dokonywania przełomu i stawiania kroków milowych w doświadczalnictwie rolniczym. Jego rozwiązania metodyczne z tamtych czasów pozostają podstawą doświadczalnictwa rolniczego do obecnych dni (Speed, 1992). Fisher napisał dwie pionierskie monografie o statystycznej teorii doświadczalnictwa, wydane po raz pierwszy w roku 1925 (Fisher, 1925) i w roku 1935 (Fisher, 1935b) i mające wiele późniejszych wydań. Oryginalna terminologia metodyczno-statystyczna, zastosowana w tych monografiach i później utrwalona jako klasyczna, pochodzi z natury i metodyki doświadczeń rolniczych. W Rothamsted, poza opracowaniem teorii testowania hipotez statystycznych, Fisher wniósł wielki wkład do biometrii i doświadczalnictwa, tworząc podstawy estymacji parametrów za pomocą metody największej wiarygodności, procedurę analizy wariancji wraz z testem F (od nazwiska autora), idee wydzielania bloków i randomizacji w układach doświadczalnych, koncepcję nowych układów doświadczalnych: całkowicie losowego, losowanych bloków, split-plot i kwadratu łacińskiego oraz układów czynnikowych (ang. *factorial designs*). Nieograniczony dostęp do cennych retrospektywnych danych doświadczalnych w Stacji był bardzo pomocny w ocenie przydatności i skuteczności jego nowych, wymienionych wyżej, metod statystycznych. Stulecie rozpoczęcia pracy Fishera w Stacji w Rothamsted oraz wkład tamtejszych statystyków w rozwój nowoczesnych metod statystycznych zostały uczczone podczas międzynarodowej konferencji organizowanej pod auspicjami Biometric Society, która odbyła się w Rothamsted w lipcu 2019 roku.

W roku 1933 Fisher zakończył swoją chwalebą pracę w Rothamsted i przeniósł się do University College w Londynie, aby znów zajmować się głównie genetyką statystyczną i eugeniką. Godnym następcą Fishera w Rothamsted był Frank Yates (1902–1994), zatrudniony przez niego w 1931 roku. Chociaż razem pracowali tylko przez dwa lata do 1933 roku, Fisher i Yates

pozostali bliskimi współpracownikami i przyjaciółmi przez kolejne 29 lat. Yates pracował w latach 1930. w kooperacji z Fisherem, nad koncepcjami nowych układów doświadczalnych, tj. kwadratu łacińskiego, układów o blokach niekompletnych (bardzo przydatnych w badaniach biologicznych i rolniczych), układów kratowych i układów czynnikowych. Yates'owi zawdzięczamy też teorię uwikłania w doświadczeniach czynnikowych (ang. *the theory of confounding in factorial experiments*) i ułamkowych układów czynnikowych (ang. *fractional replications*), układów split-plot, układów zrównoważonych i częściowo zrównoważonych o blokach niekompletnych (ang. *balanced and partially balanced incomplete block designs*) oraz układów kratowych i kwadratów quasi-łacińskich (ang. *lattice squares* oraz *quasi-Latin squares*). Bez tych wszystkich nowych układów doświadczalnych, doświadczalnictwo rolnicze oraz przyrodnicze i techniczne nie byłoby tak rozwinięte, jak jest już od prawie 80 lat. Yates zasłużył się też bardzo w szerokim zastosowaniu swoich nietrywialnych rachunkowo pomysłów, dokonując przełomu w komputeryzacji Stacji w Rothamsted i wyznaczając wzorce dla innych. Fisher i Yates w 1936 roku wydali obszernie tablice statystyczne, z cennym źródłem informacji niezbędnych dla użytkowników statystyki (Fisher, Yates, 1936).

Bliskim współpracownikiem Yates'a w Rothamsted był William Cochran (1909–1980), który pracował tam w latach 1934–1939. W ciągu tych sześciu lat pracy w Stacji Cochran stał się pionierem, wspólnie z Yates'em, w opracowywaniu metod analizy wyników z długookresowych doświadczeń rolniczych (ang. *long-term agricultural experiments*), głównie z doświadczeń plodozmianowych (Cochran, 1939).

W latach 1930. dokonał się także, zainicjowany przez Harolda Hotellinga (1895–1973), postęp w statystyce wielowymiarowej, później mocno rozwijanej oraz współcześnie szeroko wykorzystywanej w doświadczalnictwie. Ten prekursor statystyki wielowymiarowej opracował w 1931 roku uogólniony (wielowymiarowy) rozkład *t*-Studenta, nazywany od jego nazwiska rozkładem T^2 -Hotellinga, który jest spokrewniony z rozkładem *F*-Fishera (Hotelling, 1931). Rozkład T^2 jest podstawą testu T^2 -Hotellinga do testowania hipotez o braku różnic wielowymiarowych średnich populacji, przy założeniu rozkładu normalnego. Rozkład ten jest powiązany z odległością Mahalanobisa (Mahalanobis, 1930, 1936), opracowaną przez Prasanta Chandra Mahalanobisa (1893–1972). Ta miara jest ceniona i stosowana szeroko w biometrii, obok odległości Euklidesowej, zwłaszcza w metodach dyskryminacyjnych, analizie zmiennych kanonicznych (ang. *canonical variate analysis*) i analizie skupień (Caliński i in., 1985). W 1933 roku Hotelling opracował metodę analizy składowych

głównych (ang. *principal component analysis*, PCA) (Hotelling, 1933), której podstawy matematyczne już w 1901 roku przedstawił K. Pearson. Metoda PCA jest często stosowana do eksploracyjnej analizy danych w biometrii, głównie do poszukiwania tzw. czynników wspólnych wielu zmiennych w badanym zjawisku oraz wizualizacji wielowymiarowego podobieństwa obiektów, określonego za pomocą odległości euklidesowej i przybliżonego w małej liczbie (2–3) wymiarów (Johnson i Kotz, 1997). W metodzie PCA stosuje się rozkład macierzy kowariancji lub korelacji według wartości własnych lub rozkład macierzy obserwacji według wartości osobliwych. Metoda analizy składowych głównych stała się podstawą wielu klasycznych i najnowszych metod użytkowych, dostosowanych do różnych specyficznych zastosowań. Wśród nich, w doświadczalnictwie rolniczym najbardziej użyteczne są metody analizy czynnikowej (ang. *factor analysis/exploratory factor analysis*, EFA), analizy korelacji kanonicznych (ang. *canonical correlation analysis*), także pomysłu Hotellinga z 1935 roku, metody analizy skupień metodą *k*-średnich (ang. *k-means clustering*), a także metody oparte na statystycznych modelach addytywno-multiplikatywnych dla danych w klasyfikacji dwukierunkowej, takich, jak model AMMI (ang. *additive main effects and multiplicative interaction model*) i model GGE (ang. *genotype and genotype × environment interaction model*). Te dwie metody zostały opracowane w końcu XX wieku i są stosowane w analizie danych z serii doświadczeń odmianowych, służącej pogłębionej ocenie i wizualizacji interakcji genotypowo-środowiskowej (Gauch i in., 2008).

W 1936 roku Fisher, już po pionierskich dokonaniach Hotellinga i Mahalanobisa, opublikował swoje kolejne przełomowe dzieło, mianowicie metodę liniowej analizy dyskryminacyjnej (Fisher 1936). Obecnie analizą dyskryminacyjną określaną jest zbiór wielowymiarowych metod, prowadzących do znalezienia reguły klasyfikacyjnej na podstawie danych wielozmiennych dla obiektów o znanej przynależności do klas. Koncepcja analizy dyskryminacyjnej Fishera jest wykorzystywana w wielu współczesnych metodach analitycznych, m.in. w metodach z grupy *data mining* oraz *gene microarray data analysis*.

Wielkie są także dokonania polskich prekursorów statystyków oraz naukowców doświadczalników (E. Załęski, J. Czekanowski, J. Neyman) w rozwijaniu metodyki statystycznej w doświadczalnictwie rolniczym i ich wkład do nauki światowej w tym zakresie. Spośród nich, największe zasługi wniósł Neyman, publikując prace z teorii doświadczalnictwa w latach 1923–1934. Jako pierwszy, przed Fisherem, zbudował adekwatny język probabilistyczny do opisu doświadczeń, w których posługiwano się

randomizacją. Dzięki temu możliwe stało się bardziej efektywne planowanie eksperymentów i — co ważniejsze — wiarygodne wnioskowanie. Swoje pierwsze przemyślenia na ten temat Neyman opublikował w języku polskim w roku 1923 (Spława-Neyman, 1923), gdy był zatrudniony w Państwowym Naukowym Instytucie Rolniczym w Bydgoszczy. Idea tej pracy dotarła do szerokiej społeczności statystycznej dopiero w roku 1990, dzięki jej tłumaczeniu przez D. M. Dąbrowską i T. P. Speeda dla czasopisma *Statistical Science*. Przełomowym nowatorstwem w tej pracy było przedstawienie idei eksperymentalnego układu całkowicie losowego oraz modelu probabilistycznego danych z takiego doświadczenia, jak również powiązanie planowania zrandomizowanych eksperymentów, z modelem probabilistycznym, pozwalającym na efektywne wnioskowanie statystyczne. Idea wspomnianego modelu jest podobna do tej, którą przedstawił Fisher w monografii z 1925 roku i znanej dzisiaj jako model liniowy analizy wariancji (model ANOVA). Można by więc uznać, że obaj luminarze teorii statystyki, biometrii i doświadczalnictwa, Neyman i Fisher, niezależnie od siebie są twórcami statystycznego modelowania i planowania ścisłych doświadczeń czynnikowych, nie tylko w rolnictwie. Podstawą takiego sądu jest przypuszczenie, a nawet założenie, że Fisher pracy Neymana w języku polskim nie czytał, a także wydanie w 1923 roku pierwszej pracy Fishera ze wstępnymi propozycjami analizy wariancji (ANOVA) w doświadczalnictwie (Fisher, Mackenzie, 1923) oraz wydanie wspomnianego wcześniej podręcznika Fishera w 1925 roku. W modelu Neymana pojawia się po raz pierwszy pojęcie prawdziwej wartości plonów, wiążące się z wartością oczekiwaną zmiennej losowej i prawdziwym efektem poziomu badanego czynnika. Z biegiem lat, na świecie powszechnie doceniono wkład Neymana w metodykę doświadczalnictwa rolniczego, uznając go, wspólnie z Fisherem, za ojca nie tylko teorii statystyki matematycznej, ale też statystycznej teorii eksperymentu. On sam (Neyman, 1979) wyjaśnia dominującą i inicjującą rolę Fishera w teorii eksperymentu, podając także swój udział w tworzeniu podstaw i roli randomizacji w planowaniu doświadczeń.

Należy wspomnieć, że także Gosset jest uważany, obok Fishera i Neymana, za pioniera metodyki statystycznej doświadczalnictwa rolniczego. Wykonywał i stale doskonalił statystyczne metody analizy danych z tych doświadczeń, zaś od 1920. lat współpracował efektywnie z Fisherem, który nazywał go „Faradayem statystyki”. Rezultaty ich współpracy były owocne dla obu uczonych. Na przykład, dyskusja statystyków w latach 1930., z dużym

udziałem Fishera, dotycząca znaczenia systematycznych i zrandomizowanych układów doświadczalnych, była rozpoczęta przez Gosseta w 1931 roku. Pomysły metodyczne w doświadczalnictwie polowym Gosseta, inspirowane też dyskusjami z Fisherem, były publikowane w latach 1923–1937 (Speed, 1992; Johnson i Kotz, 1997).

E. Załęski, który rozpoczął w końcu XIX wieku swoją pionierską działalność naukową w zakresie doświadczalnictwa rolniczego, swój ogromny i nowatorski dorobek zamknął w podręczniku *Metodyka doświadczeń rolniczych*, wydanym w 1927 roku, niespełna 2 lata po ukazaniu się w 1925 roku dwóch ważnych dzieł w Wielkiej Brytanii i Niemczech, tj. monografii *Statistical methods for research workers* autorstwa Fishera oraz *Der Feldversuch* autorstwa Theodora Roemera (1883–1951). E. Załęski w swym oryginalnym dziele, zupełnie nie nawiązującym do przełomowej monografii Fishera z 1925 roku, przedstawił zastosowanie w doświadczalnictwie rolniczym pierwszych procedur analizy statystycznej danych i wnioskowania, opracowanych na przełomie XIX i XX wieku przez przedstawicieli brytyjskiej wczesnej szkoły biometrii i doświadczalnictwa, tj. Galtona, K. Pearsona i Gosseta. Autor omówił tam zastosowanie teorii rozkładów prawdopodobieństw błędów doświadczalnych i estymacji parametrów, a także metodę korelacji i regresji liniowej. Przedstawił też logiczne i przyrodnicze przesłanki planowania wielopowtórzeniowych doświadczeń wazonowych, polowych oraz serii doświadczeń wielokrotnych (przez Autora nazywanych zbiorowymi) i wieloletnich, a także sposoby statystycznego analizowania danych. W planowaniu doświadczeń polowych naświetlił naturę i znaczenie zmienności fluktuacyjnej (nazwał ją doskonale losową) oraz zmienności systematycznej warunków doświadczalnych. Autor przedstawił także teorię i praktykę metod wzorcowych, praktykowanych we własnych badaniach polowych co najmniej od początku XX wieku, a także cenionych przez innych wspaniałych doświadczalników polskich o renomie światowej (m.in. Stefana Barbackiego oraz Józefa Przyborowskiego) i stosowanych aż do lat 1970. (Statystycy Polscy, 2012). Metoda wzorcowa, chociaż prosta w planowaniu doświadczeń i analizie danych oraz w tamtych czasach nowoczesna i bardzo pomocna w wiarygodnej ocenie roślinnych materiałów hodowlanych, przegrywała coraz bardziej konkurencję, najpierw z układami bloków niekompletnych Yates'a, poczynając od lat 1940., a potem, w latach 1980., z metodami analizy kowariancji danych z uwzględnieniem sąsiedztwa obiektów na polu doświadczalnym. Kolejna wartościowa praca E. Załęskiego *Regionalizacja, czyli dobór roślin uprawnych*,

wydana w 1929 roku jest oryginalną próbą oceny wyników z serii wielokrotnej i wieloletniej doświadczeń odmianowych, stanowiąc punkt wyjścia dla późniejszych prac z tego zakresu autorstwa polskich biometryków, tj. Jerzego Neymana, Stefana Barbackiego, Reginy Elandt, Tadeusza Calińskiego i innych.

E. Załęski i jego szkoła na Uniwersytecie Jagiellońskim mają też ogromne zasługi dla praktyki doświadczalnictwa rolniczego w Polsce i rekomendacji odmian oraz nawożenia roślin. Zakład Hodowli Roślin i Doświadczalnictwa na Wydziale Rolniczym Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, kierowany przez E. Załęskiego w latach 1919–1932, a po jego śmierci przez ucznia i godnego następcę Józefa Przyborowskiego (1895–1939) w latach 1933–1939, współpracował z Sekcją Nasienną prężnie działającego Małopolskiego Towarzystwa Rolniczego, a zwłaszcza z Ministerstwem Rolnictwa i Reform Rolnych. Komisja Współpracy w Doświadczalnictwie tego ministerstwa, kierowana przez Przyborowskiego, koordynowała działalność badawczodoświadczalną nad ważnymi roślinami uprawnymi. Doświadczenia te były zakładane w skali ogólnokrajowej według najnowszych jednolitych, opracowanych oraz publikowanych przez Przyborowskiego, zasad statystycznego planowania doświadczeń pojedynczych i wielokrotnych oraz opracowywania danych (np. *Zasady organizacji i wykonywania doświadczeń odmianowych ze zbożami i ziemniakami*, Kraków, 1925). Zalecenia statystycznych metod planowania doświadczeń i analizy danych oraz uzyskane wyniki wraz z ich interpretacją w skali ogólnokrajowej były publikowane regularnie przez Przyborowskiego i Wileńskiego w latach 1930. w postaci zwartych monografii naukowo-wdrożeniowych (np. *Metoda przeprowadzania doświadczeń z zastosowaniem poletek wzorcowych*, Kraków, 1937; *Analiza zmienności wyników doświadczeń wielokrotnych*, Kraków, 1938) oraz w *Przeglądzie doświadczalnictwa rolniczego*. Są one dostępne m.in. w Bibliotece Wydziału Ekonomiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, będącego spadkobiercą i kontynuatorem dawnego Wydziału Rolniczego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Przyborowski i Wileński z olbrzymim zaangażowaniem propagowali w ten koncepcyjny i praktyczny sposób zastosowanie nowoczesnej statystyki w doświadczalnictwie, głównie w zakresie hodowli i oceny odmian. Znaczące dokonania wybitnych przedwojennych doświadczalników teoretyków i praktyków: E. Załęskiego, Przyborowskiego, Wileńskiego oraz Barbackiego stworzyły odważny i śmiały pierwowzór powojennej oceny odmian i dzisiejszego, bardzo nowoczesnego w skali europejskiej, Porejestrowego Doświadczalnictwa Odmianowego, ale także były inspiracją

dla doświadczeń przedrejestrowych i rejestrowych. Wielce zasłużony w latach 1930. (i po II wojnie światowej) dla doświadczalnictwa polskiego był Stefan Barbacki (1902–1979), uczeń E. Załęskiego w Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie. Pracował on przez 20 lat (1926–1945) w Państwowym Instytucie Naukowym Gospodarstwa Wiejskiego w Puławach. W 1935 roku Barbacki wydał znakomity podręcznik *Ogólna metodyka doświadczeń polowych w zarysie*. Ukazał się on w tym samym roku, co podręcznik *The design of experiments* autorstwa Fishera oraz *Complex experiments* autorstwa Yates'a. W tej monografii, Barbacki wprowadził w Polsce swoje oraz opracowane przez Fishera i Yates'a metody planowania doświadczeń pojedynczych i wielokrotnych oraz statystycznego analizowania wyników. Można dziś z całym przekonaniem powiedzieć, że o ile podręcznik E. Załęskiego z 1927 roku dawał podstawy współczesnej metodyki doświadczalnictwa, o tyle podręcznik Barbackiego z 1935 roku wprowadził do polskiego doświadczalnictwa rolniczego najnowsze osiągnięcia teoretyczne i metodyczne tamtych lat. W 1939 roku Barbacki opublikował monografię *Analiza zmienności w zagadnieniach doświadczalnictwa rolniczego*, której nakład uległ całkowitemu zniszczeniu we wrześniu 1939 roku. Oto fragmenty z ocalałych cudem szpał korektorskich tej monografii: „Metody statystyczne ułatwiają nam badanie doświadczalne, ale nie mogą stworzyć nic nowego. Jeśli zagadnienie w doświadczeniu jest źle postawione, to metody statystyczne tego nie zmieniają. Dadzą może odpowiedź ścisłą, ale nie na to, czego właściwie chcielibyśmy się dowiedzieć” (Caliński, 2012). Jako jedyny Polak, Barbacki wydał wspólną pracę z Fisherem (Barbacki, Fisher, 1936).

4. Postęp w statystycznej metodyce doświadczalnictwa po II wojnie światowej

Ważnym osiągnięciem w teorii doświadczalnictwa było opracowanie wielokrotnych porównań średnich obiektowych za pomocą jednoczesnych procedur statystycznych (testów istotności i przedziałów ufności), wykorzystywanych po wykonaniu analizy wariancji. Podstawą tych procedur była praca D. Newmana (Newman, 1939), w której autor wychodząc z idei Gosseta, sformułował i zilustrował pierwszy wielokrotny test rozstępu. Ogólne zasady wielokrotnych porównań średnich obiektowych zostały określone w ich obecnej formie w latach 1947–1955 przez trzech głównych badaczy, tj. D.B. Duncana, Henry'ego Scheffego (1907–1977) i Johna Tukeya (1915–2000). Nie było i wciąż nie ma pełnej zgody statystyków co do tego, które z procedur są najlepsze. Procedury wielokrotnych porównań możemy podzielić na 3 grupy: (1) analiza kontrastów (test

Scheffego), (2) procedury oparte na studentyzowanym rozstępie, umożliwiające grupowanie średnich (NIR, metoda Newmana-Keulsa, Tukeya i Duncana) oraz (3) wnioskowanie na podstawie przedziałów ufności (test Scheffego, Benferrioniego i Dunnetta) — (Miller, 1981).

Innym przełomowym wydarzeniem było wprowadzenie przez Sheffego w 1956 roku, liniowego modelu mieszanego (ang. *linear mixed model*) do Fisherowskiej analizy wariancji (Scheffe, 1959). Ta idea, choć już wcześniej rozpatrywana przez Yates'a w latach 1940. w teorii niekompletnych układów blokowych, w wydaniu Scheffego stała się krokiem milowym w rozwoju współczesnej teorii planowania i analizy prostych i złożonych doświadczeń z czynnikami stałymi (ang. *fixed factors*) i losowymi (ang. *random factors*), z powtarzanymi obserwacjami na tych samych jednostkach oraz w metodyce kompletnych i niekompletnych serii doświadczeń rolniczych.

Rozwijano twórczo i efektywnie teorię blokowych układów niekompletnych, zarówno na świecie, jak i w Polsce przez Tadeusza Calińskiego (1928-) oraz Jego uczniów w Poznańskiej Szkole Biometrii i współpracowników zagranicznych. Zaproponowano analizę wewnątrzblokową układu blokowego. Określono spójność oraz niespójność układów blokowych, ortogonalność oraz nieortogonalność układów, zrównoważenie ze względu na wariancję i efektywność, układy blokowe rozkładalne oraz afinicznie μ -rozkładalne (szeroko stosowane w doświadczeniach odmianowych), a także układy zrównoważonych bloków niekompletnych (BIB) i układy częściowo zrównoważonych bloków niekompletnych (PBIB) z bardzo licznymi modyfikacjami i przypadkami szczególnymi. Nastąpił także burzliwy rozwój teorii i zastosowań metod wielowymiarowych, głównie takich, jak wielozmienna analiza wariancji (MANOVA) i analiza zmiennych kanonicznych. Kluczowy udział w tym dziele miał Calyampudi Radhakrishna Rao (1920-), doktorant Fishera z roku 1948, Caliński (doktorant Barbackiego z roku 1961) i Jego uczniowie oraz John Gower (1930–2019), współpracownik Yates'a w Rothamsted.

Należy podkreślić wielkie zasługi wielu polskich doświadczalników-statystyków i rolników w rozwoju metodyki doświadczalnictwa rolniczego w skali krajowej i międzynarodowej po II wojnie światowej. Wielki wkład naukowy, dydaktyczny i organizacyjny w postęp statystycznej metodyki doświadczalnictwa rolniczego w tym okresie wnieśli głównie (w kolejności chronologicznej rozpoczęcia działalności zawodowej) Stefan Barbacki, Zygmunt Nawrocki, Regina Elandt, Wiktor Oktaba i Tadeusz Caliński (Statystycy Polscy, 2012).

W 1945 roku, Stefan Barbacki przeniósł się z Puław do Poznania na Wydział Rolniczo-Leśny

Uniwersytetu Poznańskiego (współtworząc i prowadząc Katedrę Doświadczalnictwa Rolniczego i Biometrii), przemianowany w 1951 roku w samodzielną Wyższą Szkołę Rolniczą. W poznańskim środowisku naukowym i rolniczym (hodowli roślin i oceny odmian) w Wielkopolsce oraz całym kraju promował i rozwijał swoje przedwojenne osiągnięcia i prze-myślenia w zakresie planowania eksperymentów oraz ich analizy statystycznej, wcielając także do praktyki idee Załęskiego. Wydana w 1951 roku jego książka *Doświadczenia kombinowane* jest niedoścignionym wzorem pisania w sposób prosty o rzeczach złożonych. Barbacki w 1961 roku współtworzył Zakład Genetyki Roślin PAN, który w roku 1979 został przekształcony, z wielkim udziałem Profesora, w Instytut Genetyki Roślin PAN. Był on także jednym z inicjatorów utworzenia w 1966 roku Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU), a następnie przez wiele lat był przewodniczącym jego Rady Naukowej (Statystycy Polscy, 2012). Barbacki zasłużył się ogromnie polskiej nauce, zarówno w okresie przedwojennym, jak i powojennym, jako znakomity naukowiec-doświadczalnik w zakresie metod statystycznych i praktyki badawczej oraz genetyki i hodowli roślin, a także jako wspaniały organizator i mentor nauki. Swoją wpływ odcisnął i niezatarty ślad zostawił zarówno przez dorobek własny, jak i swoich licznych wspaniałych uczniów. Jego uczniami są luminarze polskiej i światowej biometrii oraz doświadczalnictwa rolniczego: Regina Elandt, Tadeusz Caliński, Eugeniusz Bilski i wielu innych.

Zygmunt Nawrocki (1910–1978) kształcił się w czasie swych studiów na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie pod kierunkiem J. Przyborowskiego. Pracując w praktycznej hodowli roślin w czasie wojny i po jej zakończeniu, w 1950 roku uzyskał stopień doktora nauk rolniczych na Wydziale Rolnym Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, na podstawie dysertacji *O metodzie dyskryminacji populacji hodowlanych, opartej na pomiarze wielu cech osobników do nich należących*. W 1951 rozpoczął pracę w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Nawrocki ma ogromne zasługi dla rozwoju kształtującego się po wojnie środowiska biometryków i doświadczalników polskich w latach pięćdziesiątych, sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX wieku. Jest on wskrzesicielem po wojnie i kontynuatorem szkoły statystyczno-biometrycznej, stworzonej przed II wojną światową przez Jerzego Splawę-Neymana w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Nawrocki jeszcze przed 1951 rokiem, jako jeden z pierwszych w Polsce, zastosował układ kratowy Yates'a w doświad-

zeniach polowych, a zwłaszcza hodowlanych, przy ocenie dużej liczby odmian. W latach 1960. był prekursorem odejścia w praktyce doświadczalnictwa rolniczego, zwłaszcza w hodowli roślin, od sztywnych schematów planowania doświadczeń. Wiele jego koncepcji (np. układ N, będący układem jednopowtórzeniowym dla dużej liczby obiektów hodowlanych oraz wielopowtórzeniowy dla odmiany wzorcowej) wprowadzono do praktyki doświadczalnictwa rolniczego w Polsce. Nawrocki zaadaptował i zastosował matematyczną teorię operatorów rzutowych zasłużonego biometryka holenderskiego Leo Corstena (1924–2013), do wykonywania analizy wariancji sklasyfikowanych danych nierównoważonych. Było to dużym krokiem naprzód w tamtych czasach, kiedy nie było jeszcze rozwiniętej teorii statystycznej modeli mieszanych oraz odpowiedniej technologii informatycznej (Statystycy Polscy, 2012). Nawrocki był od roku 1957 do swojej śmierci członkiem Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie oraz członkiem Rady Naukowej Instytutu Ziemiaka w Boninie. Uczniem (doktorantem) i współpracownikiem Zygmunta Nawrockiego był Zbigniew Laudański (1942–2017). Wniósł on bardzo duży wkład w dalszy rozwój metod Nawrockiego (pod względem teoretycznym przez wykorzystanie teorii operatorów rzutowych oraz informatycznym), stosowanych w hodowli roślin i naukach rolniczych.

Regina Elandt (1918–2011) ukształtowała swoje zainteresowania naukowe w poznańskiej szkole naukowej Barbackiego, uzyskując pod jego kierunkiem doktorat w 1955 roku na podstawie pracy *O pewnych testach interakcji w doświadczeniach wieloletnich i wielokrotnych. Zagadnienie rejonizacji*. Swoje liczne osiągnięcia naukowe nad metodami i zastosowaniami statystyki matematycznej w doświadczalnictwie rolniczym oraz genetyce i hodowli roślin zawarła m.in. w znakomitej monografii, wydanej w 1964 roku (Elandt, 1964). Jest to wielkie dzieło Autorki, znane i cenione przez Jej współczesnych, aż po dzień dzisiejszy, za nieprzemijającą nowoczesność i przystępność ujęcia ówczesnego dorobku biometrii i jej zastosowań. Inne osiągnięcia Elandt, wielce zasłużonej dla doświadczalnictwa w jej polskim okresie pracy (1946–1964), dotyczą zagadnień biometrycznych w zakresie genetyki człowieka oraz analizy przeżywalności i epidemiologii (Statystycy Polscy, 2012).

Szeroko znane, znaczące i oryginalne osiągnięcia naukowe Wiktora Oktaby (1920–2009) obejmują zróżnicowany zakres tematyczny i dotyczą następujących problemów: regresji, analizy wariancji jednej i wielu zmiennych, estymacji komponentów wariancyjnych, estymacji i weryfikacji hipotez dla jednozmiennych modeli

stałych niepełnego rzędu, teorii układów eksperymentalnych, wielozmiennej analizy ze szczególnym uwzględnieniem modeli Zyskinda-Martina, teorii brakujących obserwacji, algebry macierzy oraz historii statystyki. Oktaba stworzył Lubelską Szkołę Statystyki i Doświadczalnictwa. Wydał on wiele cennych podręczników akademickich (Statystycy Polscy, 2012). Był inicjatorem organizowania corocznych konferencji naukowych o nazwie Colloquium Biometryczne, od wielu lat, aż do chwili obecnej organizowane jako Międzynarodowe Colloquium Biometryczne. Drugim, wybitnym i zasłużonym statystykiem doświadczalnikiem w Lubelskiej Szkole był Tadeusz Przybysz (1929–2007). Do Jego najważniejszych osiągnięć naukowych należy rozwój metodyki bloków niekompletnych i doświadczeń płodozmianowych. Wprowadził uogólnienie metody Yates'a, metodę analizy i porównania płodozmianów z uwzględnieniem rośliny testowej. Sformułował kilka modeli dla doświadczeń płodozmianowych, takich jak hierarchiczny, kombinacji klasyfikacji krzyżowej z hierarchiczną oraz modelu wynikającego z połączenia układu z rozszczepionymi jednostkami z układem o blokach niekompletnych. Dla poszczególnych modeli Autor podał estymatory parametrów i właściwą postać analizy wariancji do testowania hipotez.

Tadeusz Caliński jest wśród Polaków najwybitniejszym po Jerzym Neymanie, statystykiem, biometrykiem i doświadczalnikiem, uznanym w Polsce i na świecie. Wniósł i stale wnosi dominujący wkład do statystyki, biometrii, w tym doświadczalnictwa rolniczego w skali światowej i krajowej. Rozwijając poznańską szkołę naukową Barbackiego, Caliński stworzył wspaniałą Poznańską Szkołę Biometrii. Dorobek Calińskiego i jego licznych znakomitych uczniów, który przyniósł im największą chwałę, mieści się w szerokim obszarze. Obejmuje on głównie: teorię niekompletnych układów blokowych, metody wielowymiarowe, jednoczesne procedury statystyczne, modele mieszane w zastosowaniu do oceny odmian w serii doświadczeń oraz analizę interakcji genotypowo-środowiskowej.

Znaczący wkład w rozwój metodyki statystycznej w doświadczalnictwie rolniczym w Polsce wnieśli: Leokadia Ubysz-Borucka (1919–1989), jej uczeń Jan Trętowski (1942–1993) oraz Ryszard Wójcik (1937–2003). Rozwinęli i znacząco wzbogacili oni (a także wspomniany wcześniej Z. Laudański) dorobek Nawrockiego, przyczyniając się do ukształtowania w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie trzeciego w Polsce, po II wojnie światowej, ośrodka naukowo-dydaktycznego w zakresie biometrii i doświadczalnictwa rolniczego. Ich dorobek obejmuje głównie wielostronne doskonalenie i zastosowania układów eksperymentalnych

oraz metod jedno- i wielowymiarowych w doświadczeniach agrotechnicznych i hodowlanych oraz w ocenie odmian wielu gatunków roślin uprawnych na podstawie danych niezrównoważonych z serii doświadczeń. Ośrodek ten rozwija się prężnie, pracując głównie w obszarach zarówno zarysowanych przez wspomnianych jego założycieli, jak i w nowych obszarach nauk rolniczych, głównie, takich jak geostatystyka, rolnictwo precyzyjne, interpretacja i wykorzystanie danych satelitarnych i modelowanie matematyczne zjawisk.

Należy podkreślić także znaczący wkład Wrocławskiej Szkoły Statystycznej zainicjowanej przez Hugona Steinhausa (1887–1972), a później rozwijanej i kierowanej przez Juliana Perkala (1913–1965) do rozwoju biometrii, w skali nie tylko krajowej, ale też międzynarodowej. Dokonania Szkoły odbywały się głównie w Uniwersytecie Wrocławskim i Wyższej Szkole Rolniczej (dzisiaj Uniwersytet Przyrodniczy) we Wrocławiu. Ważnym nurtem badań wrocławskiej szkoły zastosowań matematyki była analiza wielowymiarowa, zaś jej najważniejsze osiągnięcia dotyczą nowej metody graficznej taksonomii, a zwłaszcza teorii i zastosowań (algorytmów) grafów. Diagram optymalnego grafu został nazwany dendrytem wrocławskim (Statystycy Polscy, 2012).

5. Najnowsze kierunki rozwoju statystycznej metodyki doświadczalnictwa

W ostatnich latach obserwowany jest znaczny rozwój metod statystycznych w doświadczalnictwie, które są bardziej wymagające obliczeniowo. Wynika to przede wszystkim z upowszechnienia komputerów i oprogramowania statystycznego (SAS, GENSTAT, Statistica, R, ASReml, IBM SPSS i XLStat). W takich okolicznościach, od przełomu XX i XXI wieku zaczęto szeroko rozwijać i stosować modele mieszane i metody do analizy sklasyfikowanych danych zrównoważonych, czyli kompletnych (ang. *balanced data*), a zwłaszcza danych niezrównoważonych, czyli niekompletnych (ang. *unbalanced data*). Dane takie są otrzymywane głównie w toku prowadzenia serii odmianowych doświadczeń wielokrotnych i wieloletnich w celu rzetelnej i wszechstronnej oceny wartości gospodarczej nowych odmian roślin uprawnych, wyrażonej w kategoriach ich stabilności i adaptacyjności pod względem ważnych cech rolniczych (Caliński i in., 2005; Smith i in., 2005; Van Eeuwijk i in., 2016; Studnicki i in., 2017). Rozwijane są także efektywnie zastosowania metod wielowymiarowych, które były już znacznie wcześniej opracowane w zakresie podstaw. Należą do nich metody analizy skupień i PCA oraz ich liczne modyfikacje dla zmiennych ilościowych i skategoryzowanych w zastosowaniu do klasyfikacji obiektów genetycznych (Crossa i Franco, 2004). Klasycznymi już metodami użytkowymi

w doświadczalnictwie rolniczym, wywodzącymi się z PCA są procedury statystyczne AMMI i GGE, oparte na stałych lub mieszanych dwóch modelach addytywno-multiplikatywnych, tj. na modelu AMMI oraz modelu GGE. Metody AMMI i GGE służą do oceny, wizualizacji i interpretacji rolniczej interakcji genotypowo-środowiskowej, bardzo ważnej w hodowli, ocenie i rekomendacji odmian roślin uprawnych, na podstawie danych zrównoważonych lub niezrównoważonych, które pochodzą z serii doświadczeń odmianowych (Smith i in., 2005; Gauch i in., 2008; Van Eeuwijk i in., 2016; da Silva i in., 2019).

W ostatnich latach coraz większą rolę odgrywają metody z zakresu geostatystyki, których celem jest analiza danych geograficznych o różnym zasięgu przestrzennym. W odniesieniu do badań rolniczych dotyczy to m.in. rolnictwa precyzyjnego, w tym zaawansowanych metod interpolacji różnych właściwości gleby. Nowym pojęciem z tego zakresu jest m.in. pedometria (ang. *pedometrics*), które powstało głównie z inicjatywy badaczy z Uniwersytetu w Sydney (Australia) oraz Wageningen (Holandia). Celem pedometrii jest zastosowanie różnych metod ilościowych, w szczególności geostatystycznych, mających na celu mapowanie właściwości gleby w różnej skali przestrzennej.

W związku z tym, że ciągle rośnie ilość dostępnych wyników z różnych doświadczeń rolniczych, to podobnie jak w innych dziedzinach nauki, coraz większe znaczenie odgrywają meta-analizy wyników z doświadczeń rolniczych. Mają tu zastosowanie różne metody statystyczne dla danych zagregowanych, w tym stałe i mieszane modele liniowe i nieliniowe dla danych niekompletnych. Coraz częściej w analizie danych z doświadczeń rolniczych stosowane są metody uczenia maszynowego (ang. *machine learning*), w tym modele wykorzystujące sztuczne sieci neuronowe (ang. *artificial neural networks, ANN*), algorytmy drzew decyzyjnych (ang. *decision trees*), maszyny wektorów nośnych (ang. *support vector machine, SVM*) oraz sieci Bayesowskie (ang. *Bayesian network*) do predykcji zmiennych (np. plonu) lub wystąpienia określonych zjawisk (np. porażenia roślin przez choroby). W tej kategorii mieszczą się także zaawansowane komputerowe modele symulacyjne roślin uprawnych (ang. *crop simulation models*), szczególnie przydatne do predykcji wegetacji i plonu roślin uprawnych w badaniach nad rolniczymi efektami zmian klimatu.

W związku z dynamicznym rozwojem biologii molekularnej powstała potrzeba opracowania metod statystycznych do analizy danych dotyczących ekspresji genów, ich ewolucji oraz struktury. Metodami statystycznymi z tego zakresu są między innymi metody mapowania

QTL (ang. *quantitative trait locus mapping*), mające na celu wyjaśnienie związków między fenotypem, a genotypem organizmów żywych. Mają tu zastosowanie między innymi takie metody, jak analiza wariancji, metody złożonego mapowania odległości (ang. *composite interval mapping, CIM*), jak również profilowanie ekspresji genów z wykorzystaniem mikromacierzy DNA. Jedną z metod wykorzystywanych do oceny podobieństwa genetycznego jest analiza wariancji molekularnej (ang. *analysis of molecular variance, AMOVA*). W filogenetyce molekularnej, czyli klasyfikacji genotypów na podstawie danych molekularnych (np. sekwencji DNA) są wykorzystywane metody próbkowania Monte Carlo łańcuchami Markowa (ang. *Markov Chain Monte Carlo, MCMC*).

Podziękowanie

Autorzy serdecznie dziękują z wdzięcznością Panu Profesorowi dr hab., dr h.c. multi Tadeuszowi Calińskiemu za przyjęcie trudu zapoznania się z pierwotną wersją tej pracy oraz dostrzeżenie słabości i życzliwe zaproponowanie wielce uzasadnionych zmian na rzecz wzbogacenia i udoskonalenia treści.

Autorzy kierują także szczerze podziękowania do dwóch anonimowych Recenzentów, których zasadnicze i szczegółowe uwagi pomogły nadać pracy obecny kształt, lepszy od tego, który charakteryzował manuskrypt przed recenzją.

Literatura

- Barbaćki S., Fisher R. 1936. A test of the supposed precision of systematic arrangements. *Annals of Eugenics* 7: 189 — 193.
- Caliński T. 2012. Rozwój i osiągnięcia w biometrii polskiej. *Przegląd statystyczny, Numer specjalny I*: 47 — 52.
- Caliński T., Camussi A., Ottaviano E., Kaczmarek Z. 1985. Genetic distances based on quantitative traits. *Genetics*, 111:945 — 962.
- Caliński T., Czajka S., Kaczmarek Z., Krajewski P., Pilarczyk W. 2005. Analyzing multi-environment variety trials using randomization-derived mixed models. *Biometrics*, 61:448 — 455.
- Caliński T., Harabasz J. 1974. A dendrite method for cluster analysis. *Communications in Statistics* 3: 1 — 27.
- Cochran W. G. 1939. Long-term agricultural experiments. *J. Roy. Stat. Soc. (Suppl.)* 6: 104–148.
- Crossa J., Franco J. 2004. Statistical methods for classifying genotypes. *Euphytica* 137: 19 — 37.
- da Silva C. P., de Oliveira L. A., Nuvunga J. J., Pamplona A. K. A., Balestre M. 2019. Heterogeneity of variances in the Bayesian AMMI model for multi-environment trial studies. *Crop Sci.* 59: 2455 — 2472.
- Elandt R. 1964. *Statystyka matematyczna w zastosowaniu do doświadczeń rolniczych*. PWN, Warszawa
- Fisher R. A. 1925. Applications of "Student's" distribution. *Metron* 5: 90–104.
- Fisher R. A. 1918. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh* 52: 399 — 433.
- Fisher R. A. 1921. Studies in crop variation. I. An examination of the yield of dressed grain from Broadbalk. *The J. Agri. Sci.* 11: 107 — 135.
- Fisher R. A. 1922. On the mathematical foundations of theoretical statistics, *Philos. Trans. Roy. Soc., Lon. Ser. A*, 222: 309 — 368.
- Fisher R. A. 1925. *Statistical methods for research workers*, 1st ed. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Fisher R. A. 1935 a. The logic of inductive inference (with discussion). *J. Roy. Stat. Soc.* 98: 39 — 82.
- Fisher R. A. 1935 b. *The design of experiments*, 1st ed. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Fisher R. A. 1936. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of Eugenics* 7: 179 — 188.
- Fisher R. A., Mackenzie W. A. 1923. Studies in crop variation. II. The manual response of different potato varieties. *J. Agric. Sci.* 13: 311 — 320.
- Fisher R. A., Yates F. 1936. *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Gauch H.G., Jr., Piepho H.P., Annicchiarico P. 2008. Statistical analysis of yield trials by AMMI and GGE: Further considerations. *Crop Sci.* 48:866–889
- Greenland S., Senn S. J., Rothman K. J., Carlin J. B., Poole C., Goodman S. N., Altma D. G. 2016. Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. *Eur. J. Epidemiol.* 31:337 — 350.
- Hall A. D. 1909. The experimental error in field trials. *J. Board Agr.* 16: 365 — 370.
- Hotelling H. 1931. The generalization of Student's ratio. *Ann. Math. Stat.* 2: 360 — 378.
- Hotelling H. 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educ. Psychol.*, 24: 417 — 441.
- Hurlbert S. H., Lombardi C. M. 2009. Final collapse of the Neyman-Pearson decision theoretic framework and rise of the neoFisherian. *Ann. Zool. Fennici* 46: 311 — 349.
- Johnson N. L., Kotz S. 1997. *Leading personalities in statistical sciences*. John Wiley & Sons, New York.
- Lehman E. L. 2011. *Fisher, Neyman and the creation of classical statistics*. Springer, New York.
- Kozak M. 2004 a. Alokacja próby między warstwy w przypadku cechy wielowymiarowej. *Wiadomości statystyczne* Nr 7: 13 — 21.
- Kozak M. 2004b. Efektywność schematów losowania w badaniach gospodarstw rolnych. *Wiadomości statystyczne* Nr 9:20 — 26
- Mahalanobis P. 1930. On tests and measures of group divergence I. Theoretical formulae. *J. and Proc. Asiat. Soc. of Bengal*, 26: 541 — 588.
- Mahalanobis P. 1936. On the generalized distance in statistics. *Proc. Nat. Inst. Sci.* 2:49 — 55.
- Miller R.G. 1981. *Simultaneous statistical inference*. Springer-Verlag, New York.
- Newman D. 1939. The distribution of range in samples from a normal population, expressed in terms of an independent estimate of standard deviation. *Biometrika* 31: 20 — 30.
- Neyman J. 1934. On the two different aspects of the representative method: The method of stratified sampling and the method of purposive selection. *J. Roy. Stat. Soc.*, 97:558 — 625
- Neyman J. 1937. Outline of a theory of statistical estimation based on the classical theory of probability. *Philos. Trans. Roy. Soc. London, Series A*. 236: 333 — 380.
- Neyman J. 1979. Narodziny statystyki matematycznej. *Wiadomości Matematyczne*, 22: 91 — 106.
- Neyman J., Pearson E. S. 1928. On the use and interpretation of certain test criteria for purposes of statistical inference. *Biometrika* 20A, Pt. I: 175 — 240; Pt. II: 263 — 294.
- Neyman J., Pearson E. S. 1933. On the problem of the most efficient tests of statistical hypotheses. *Phil. Trans. Roy. Soc. London. Series A*, 231: 289 — 337.
- Oktaba W. 2002. *Historia teorii eksperymentu*. Lubelskie Towarzystwo Naukowe, Lublin.
- Ostasiewicz W. 2012. Rozwój myśli statystycznej w Polsce w XIX wieku. *Przegląd statystyczny, Numer specjalny I*: 34 — 46.

- Pearson K. 1901. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*, 2:559–572).
- Scheffe H. 1959. *The analysis of variance*. John Wiley & Sons, Inc., N. Y.
- Smith A. B., Cullis B. R., Thompson R. 2005. The analysis of crop cultivar breeding and evaluation trials: An overview of current mixed model approaches. *J. Agric. Sci.* 143: 449 — 462
- Speed T. P. 1992. Introduction to Fisher (1926) — The arrangement of field experiments. W: *Breakthroughs in statistics*, Vol. II. (Ed by Kotz S., Johnson N. L.), Springer-Verlag, New York: 71 — 82.
- Splawa-Neyman J. 1923. Próba uzasadnienia zastosowań rachunku prawdopodobieństwa do doświadczeń polowych. *Roczn. Nauk Roln. i Leśnych*, 10: 1 — 51.
- Statystycy Polscy. 2012. (Redakcja Adamczewski W. i in.) GUS i Polskie Towarzystwo Statystyczne, Warszawa
- Student [W.S. Gosset]. 1908. The probable error of a mean. *Biometrika* 6: 1 — 25.
- Studnicki M., Paderewski J., Piepho H.P., Wójcik-Gront E. 2017. Prediction accuracy and consistency in cultivar ranking for factor-analytic linear mixed models for winter wheat multienvironmental trials *Crop Sci.* 57: 2506 — 2516.
- Van Eeuwijk F. A., Bustos-Korts D. V., Malosetti M. 2016. What should students in plant breeding know about the statistical aspects of genotype × environment interactions? *Crop Sci.* 56: 2119 — 2140.
- Yates F. 1935. Complex experiments. *J. Roy. Stat. Soc. (Suppl.)* 2: 181 — 247.
- Romer E. 1989. *Pamiętnik paryski (1918–1919)*. Wyd. Zakład Narodowy Imienia Ossolińskich, Wrocław.
- Załęski E. 1927. *Metodyka doświadczeń rolniczych*. Wydawnictwo Rozpraw Biologicznych, Lwów.

Fusarium species and *Fusarium* mycotoxins in grain of barley in Poland in 2009 and 2010.

Short communication

Gatunki *Fusarium* oraz toksyny fuzaryjne w ziarnie jęczmienia w Polsce w 2009 i 2010r.
Komunikat

Tomasz Góral ¹✉, Piotr Ochodzki ¹, Linda Kærsgaard Nielsen ², Dorota Walentyn-Góral ¹

¹ Department of Plant Pathology, Plant Breeding and Acclimatization Institute – National Research Institute, Radzików, 05-870 Błonie, Poland

² Sejet Plant Breeding, Nørremarksvej 67, 8700 Horsens

✉ e-mail: t.goral@ihar.edu.pl

Próby ziarna jęczmienia jarego ze zbiorów w 2009 i 2010r. zostały przeanalizowane pod kątem zawartości DNA gatunków *Fusarium* i toksyn fuzaryjnych (trichotecenów B). Próbkę pochodziły z różnych pól z Radzikowa, w środkowej Polsce. Jakościowe i ilościowe oznaczanie gatunków *Fusarium* w ziarnie przeprowadzono techniką real-time PCR. Toksyny fuzaryjne w ziarnie analizowano metodą chromatografii gazowej. W ziarnie jęczmienia wykryto siedem gatunków *Fusarium*. Dominujące gatunki to *F. avenaceum*, *F. graminearum* i *F. poae*. Wykryto również występowanie *F. culmorum*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* i *F. tricinctum*. Stężenie trichotecenów B (deoksynivalenolu, nivalenolu) w ziarnie było niskie. Najwyższy współczynnik korelacji deoksynivalenol vs. DNA *Fusarium* stwierdzono dla *F. graminearum*. Jeśli chodzi o nivalenol, najwyższy był współczynnik korelacji z DNA *F. poae*.

Słowa kluczowe: DNA, *Fusarium*, jęczmień, real-time PCR, trichoteceny

Grain samples of spring barley from the 2009 and 2010 harvest were analysed for the content of DNA of *Fusarium* species and *Fusarium* toxins (type B trichothecenes). Samples originated from different fields in Radzików, Central Poland. Qualitative and quantitative determination of *Fusarium* species in the grain was performed using a real-time PCR. *Fusarium* toxins in the grain were analysed by gas chromatography. Seven *Fusarium* species were detected in barley grain. The dominating species were *F. avenaceum*, *F. graminearum* and *F. poae*. The presence of *F. culmorum*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* and *F. tricinctum* was also detected. The concentration of trichothecene toxins in grain (deoxynivalenol, nivalenol) was low. The highest correlation coefficient of deoxynivalenol vs. *Fusarium* DNA was found for *F. graminearum*. Regarding nivalenol, the highest correlation coefficient was with *F. poae* DNA.

Key words: barley, DNA, *Fusarium*, real-time PCR, trichothecenes

Introduction

Fusarium head blight (FHB) is a disease of cereals (including barley) caused by a complex of toxicogenic fungi of the genus *Fusarium* (Parry et al., 1995). The main species of this complex in Europe are *F. graminearum* and *F. culmorum*, identified as deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) and zearalenone (ZEN) producers. However, other *Fusarium* species producing mycotoxins are also prevalent: *F. avenaceum* - moniliformin, enniatins and beauvericin (BEA) producer; *F. poae* - NIV, BEA producer. *F. langsethiae* and *F. sporotrichioides* - T-2 and HT-2 toxin producers, are also prevalent (Bottalico, 1998; Bottalico and Perrone, 2002; Jestoi et al., 2008; Vogelgsang et al., 2008; Somma et al., 2010). Because of the diversity of *Fusarium* species causing *Fusarium* head blight, monitoring of changes in the *Fusarium* population on wheat is important. The frequency of species infecting wheat is not stable and changes depending on the weather in a particular year. Large differences are also observed between

different regions of wheat production in Europe. For example, other species are dominant in north-eastern Europe, as well as in the southwestern part of the continent (Bottalico, 1998; Bottalico and Perrone, 2002). Species compositions change over time, which is the results of global warming and changes in acreage of major cereal crops, i.e. an increase of maize area.

Barley is less infected by FHB compared to durum wheat or bread wheat (Langevin et al., 2009). However, its grain can also be contaminated with *Fusarium* toxins (Edwards, 2009; Malachova et al., 2010). Their presence (as well as the presence of *Fusarium* mycelium) is particularly important for malt barley, as it has a negative impact on beer quality (Havlova et al., 2006; Sarlin et al., 2007).

Data on barley contamination with *Fusarium* toxins or the frequency of *Fusarium* species infecting this cereal are much less available than for bread wheat. Hence, it would be interesting to find what the current situation in this field is. The aim of the present study was to determine the presence of *Fusarium* species and the content

of trichothecene type B mycotoxins in barley grain to compare species frequency with earlier reported data.

Material and methods

Five samples of spring barley grain from 2009 (2) and 2010 (3) were analysed. Samples were collected from two cultivars: 'Rufus' and 'Rubinek'. Barley was grown in five commercial fields near Radzików, Central Poland. Barley was harvested using a combine harvester. Ten sub-samples weighing 1 kg were taken from the harvested grain and mixed thoroughly. Afterwards, a 1 kg grain sample was taken for further analysis. The collected samples were stored at -20°C before DNA and mycotoxin extraction. Qualitative and quantitative determinations of eight *Fusarium* species in the grain were performed by real-time PCR. The primers used were based on fungal TEF-1 α gene sequences, designed by Nicolaisen et al. (2009), specific for the different *Fusarium* species: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* and *F. tricinctum*. The detailed methodology of DNA extraction and real-time PCR was described by Góral et. al (2019). The trichothecenes of group B - deoxynivalenol (DON), nivalenol

(NIV) were quantified using gas chromatography techniques. The detailed methodology was described by Góral et. al (2019).

The original *Fusarium* DNA amount and toxin concentrations were transformed to logarithmic values in order to obtain a normal distribution for the variables. The relationships between the results for *Fusarium* DNA and *Fusarium* toxins were investigated by Pearson correlation tests. The correlation analyses were performed using Microsoft® Excel 2010/ XLSTAT©-Pro (Version 2013.4.07, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA).

Results and discussion

Five samples of grain of spring barley collected from fields in Radzików, Central Poland, were analysed (Tab. 1). All samples contained DNA of *Fusarium* species at an average value of 11,287 pg of DNA per μg of wheat DNA (Tab. 1). The samples from 2010 were more contaminated with *Fusarium* than the samples from 2009 (17,669 pg/ μg vs. 1,713 pg/ μg), and the sample of cultivar 'Rubinek 10' contained the highest amount of *Fusarium* DNA (34,359 pg/ μg). The lowest amount of DNA was detected in the sample of 'Rufus 09' (907 pg/ μg).

Tabela 1
Table 1

Concentration of DNA of seven *Fusarium* species, and DON and NIV mycotoxins levels in grain of spring barley harvested in 2009 and 2010
Zawartość DNA siedmiu gatunków z rodzaju *Fusarium* oraz mykotoksyn DON i NIV w ziarnie jęczmienia jarego ze zbiorów w 2009 i 2010r.

No. Lp.	Sample Próba	<i>Fusarium</i> DNA DNA <i>Fusarium</i> [pg/ μg]							Mycotoxins Mykotoksyny [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	
		<i>F. a.</i>	<i>F. c.</i>	<i>F. g.</i>	<i>F. l.</i>	<i>F. p.</i>	<i>F. sp.</i>	<i>F. t.</i>	DON	NIV
1	Rubinek 09	607	31	1407	0	112	97	266	202.0	0.0
2	Rufus 09	372	0	362	0	88	85	0	71.0	0.0
3	Rubinek 10	8159	303	3774	0	1117	916	0	113.3	57.5
4	Rubinek 10	11967	539	10755	0	9107	1991	0	226.1	100.7
5	Rufus 10	573	0	1022	2444	341	0	0	109.3	70.2
	Mean Średnia	4336	174	3464	489	2153	618	53	144.3	45.7

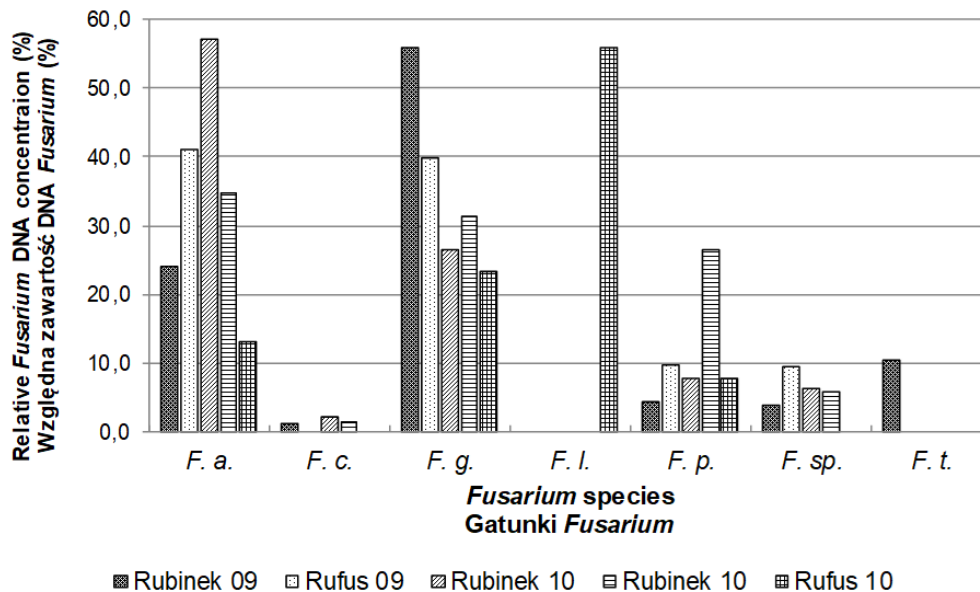
F. a. = *F. avenaceum*, *F. c.* = *F. culmorum*, *F. g.* = *F. graminearum*, *F. l.* = *F. langsethiae*, *F. p.* = *F. poae*, *F. sp.* = *F. sporotrichioides*, *F. t.* = *F. tricinctum*.

Seven *Fusarium* species were detected in the barley grain. Dominating species were *F. avenaceum* (4,336 pg/ μ g), *F. graminearum* (3,464 pg/ μ g) and *F. poae* (2,153 pg/ μ g) (Tab. 1, Fig. 1). These species were found in all samples. *Fusarium sporotrichioides* was found in four samples at an average DNA concentration of 618 pg/ μ g. *Fusarium culmorum* was present in three samples, but at a low concentration of 175 pg/ μ g. *Fusarium langsethiae* was found only in one sample ('Rufus' 10), but was the dominating species in this sample, and the DNA concentration amounted to 2,444 pg/ μ g. *Fusarium tricinctum* was also found in one sample ('Rubinek' 09) at 266 pg/ μ g.

The concentration of *Fusarium* DNA in barley grain in 2010 was higher than that in wheat grain in 2010 (Góral et al., 2019). The composition of *Fusarium* species infecting barley grain was similar to that of wheat, with *F. graminearum* prevailing over *F. culmorum* (Tomczak et al., 2002; Stępień and Chełkowski, 2010; Góral et al., 2019). According to Nielsen et al. (2014), in UK barley during the years 2007–2011, the dominating species were *F. poae*, *F. tricinctum* and *F. avenaceum*. *F. culmorum* and *F. graminearum*

were less frequent. In Denmark in barley, the most frequent species in the period 2005 to 2007 were *F. avenaceum*, *F. langsethiae*, *F. culmorum*, *F. poae*, and *F. graminearum*, which were found in >85% of the samples (Nielsen et al., 2011). *F. tricinctum* was found in 67% of the samples, *F. sporotrichioides* in 15%, and *F. equiseti* in 2%. In wheat, the most frequent were *F. avenaceum*, *F. graminearum* and *F. culmorum*. Species composition in the above three countries seems to be similar. More species were involved in *Fusarium* head blight in barley than in wheat. Several species were also found in barley grain in northern USA (Salas et al., 1999). However, other than in Europe, *Fusarium graminearum* was the primary pathogen causing FHB epidemics and comprised from 62% to 64% of all *Fusarium* species isolated from infected kernels from 1994 to 1996. The authors also isolated *F. sporotrichioides*, *F. poae*, and *F. avenaceum* and stated that these species were involved in FHB infection, but to a limited extent. The above results show the effect of climatic conditions between northern Europe and the continental USA on *Fusarium* species in barley.

Fusarium langsethiae was found primarily in northern Europe on oat and barley (Yli-Mattila



F. a. = *F. avenaceum*, *F. c.* = *F. culmorum*, *F. g.* = *F. graminearum*, *F. l.* = *F. langsethiae*, *F. p.* = *F. poae*, *F. sp.* = *F. sporotrichioides*, *F. t.* = *F. tricinctum*.

Fig. 1. Relative concentration of DNA of seven *Fusarium* species in five samples of spring barley collected in 2009 and 2010.

Rys. 1. Względna zawartość DNA siedmiu gatunków z rodzaju *Fusarium* w pięciu próbach ziarna jęczmienia jarego ze zbiorów w 2009 i 2010r.

Tabela 2
Table 2

Coefficients of correlation between DNA concentration of three *Fusarium* species and amount of DON and NIV in spring barley grain.
Współczynniki korelacji pomiędzy zawartością DNA trzech gatunków *Fusarium* i zawartością DON i NIV w ziarnie jęczmienia jarego.

Variables Zmienne	<i>F. c.</i>	<i>F. g.</i>	<i>F. p.</i>	<i>Fusarium</i>	<i>F. c.</i> + <i>F. g.</i>	<i>F. c.</i> + <i>F. g.</i> + <i>F. p.</i>	DON
<i>F. graminearum</i>	0,915						
<i>F. poae</i>	0,758	0,930					
<i>Fusarium</i>	0,832	0,972	0,963				
DON	0,690	0,746	—	0,610	0,740	0,715	
NIV	0,428	0,698	0,820	0,843	0,696	0,724	0,232

F. c. = *F. culmorum*, *F. g.* = *F. graminearum*, *F. p.* = *F. poae*, DON = deoxynivalenol, NIV = nivalenol.

et al., 2008; Edwards et al., 2012). The occurrence of *F. langsethiae* on wheat in Poland was confirmed in 2008 (Łukanowski et al., 2008). This species was found mainly in northern Poland; however, it was present in some samples of wheat grain from Central Poland (Łukanowski and Sadowski, 2008). In 2009, *F. langsethiae* was found on wheat grain in the Netherlands, but at a low level (8% of the samples) (van der Fels-Klerx et al., 2012). Czaban et al. (2015) detected the presence of *F. langsethiae* in the years 2008–2010 in south-eastern Poland. However, this is the first report on the presence of *F. langsethiae* on barley in Poland.

The concentration of trichothecene toxins (DON, NIV) was low (Tab. 1) and was similar to that detected in naturally infected barley grain samples in the United Kingdom in 2002–2005 (Edwards, 2009) and 2007–2011 (Nielsen et al. 2014). Edwards (2010) found only one sample, which exceeded the legal limit for DON. Mycotoxin levels were also similar to that detected in barley in Poland in 1997 (Perkowski et al., 2003) and in the Czech Republic in the years 2001 and 2005 (Hajslova et al., 2007), but higher than that detected in the years 2005–2008 (Malachova et al., 2010).

The highest amount of DON was found in the sample 'Rubinek 10', which was the most *Fusarium* contaminated sample. In addition, this sample contained the highest amount of NIV and *F. poae* DNA, which is a producer of NIV (Stenglein, 2009). The highest correlation coefficient for DON vs. *Fusarium* was found for *F. graminearum* (Tab. 2). Regarding NIV, the highest correlation coefficient was with *F. poae* DNA concentration.

CONCLUSIONS

1. The dominating species in barley grain were *F. avenaceum*, *F. graminearum* and *F. poae*.
2. The presence of *F. culmorum*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* and *F. tricinctum* was also detected.
3. The concentration of deoxynivalenol and nivalenol was low.
4. The highest concentration of mycotoxins was found in the sample with the highest concentration of *Fusarium* DNA.

REFERENCES

- Bottalico, A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. J. Plant Pathol. 80: 85–103.
- 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.
- Czaban, J., Wróblewska, B., Sułek, A., Mikos, M., Boguszewska, E., Podolska, G., Nieróbca, A. 2015. Colonisation of winter wheat grain by *Fusarium* spp. and mycotoxin content as dependent on a wheat variety, crop rotation, a crop management system and weather conditions. Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 32: 799–807.
- Edwards, S. G. 2009. *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional barley. Food. Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 26: 1185–1190
- Edwards, S. G., Imathiu, S. M., Ray, R. V., Back, M., Hare, M. C. 2012. Molecular studies to identify the *Fusarium* species responsible for HT-2 and T-2 mycotoxins in UK oats. Int. J. Food Microbiol. 156: 168–175.
- van der Fels-Klerx, H. J., de Rijk, T. C., Booij, C. J. H., Goedhart, P. W., Boers, E. A. M., Zhao, C., Waalwijk, C., Mol, H. G. J., van der Lee, T. A. J. 2012. Occurrence of *Fusarium* head blight species and *Fusarium* mycotoxins in winter wheat in the Netherlands in 2009. Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 29: 1716–1726.

- Góral, T., Ochodzki, P., Nielsen, L. K., Walentyn-Góral, D. 2019. *Fusarium* species and *Fusarium* mycotoxins in grain of wheat in Poland in 2009 and 2010. Preprints. 2019090108.
- Hajslova, J., Lancova, K., Sehnalova, M., Krplova, A., Zachariasova, M., Moravcova, H., Nedelnik, J., Markova, J., Ehrenbergerova, J. 2007. Occurrence of trichothecene mycotoxins in cereals harvested in the Czech Republic. *Czech. J. Food. Sci.* 25: 339–350.
- Havlova, P., Lancova, K., Vanova, M., Havel, J., Hajslova, J. 2006. The effect of fungicidal treatment on selected quality parameters of barley and malt. *J. Agric. Food. Chem.* 54: 1353–1360.
- Jestoi, M. N., Paavanan-Huhtala, S., Parikka, P., Yli-Mattila, T. 2008. In vitro and in vivo mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 41: 545–558.
- Langevin, F., Eudes, F., and Comeau, A. 2004. Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal species. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 735–746.
- Łacicowa, B., Kiecana, I. 1991. Fusariosis of spring barley cultivated in Lublin region. *Mycotox. Res.* 7(Suppl 2): 128.
- Łukanowski, A., Lenc, L., Sadowski, C. 2008. First report on the occurrence of *Fusarium langsethiae* isolated from wheat kernels in Poland. *Plant Dis.* 92: 488–488.
- Łukanowski, A., Sadowski, C. 2008. *Fusarium langsethiae* on kernels of winter wheat in Poland — Occurrence and mycotoxigenic abilities. *Cereal Res. Commun.* 36: 453–457.
- Malachova, A., Cerkal, R., Ehrenbergerova, J., Džuman, Z., Vaculova, K., and Hajslova, J. 2010. *Fusarium* mycotoxins in various barley cultivars and their transfer into malt. *J. Sci. Food Agric.* 90: 2495–2505.
- Nicolaisen, M., Suproniene, S., Nielsen, L. K., Lazzaro, I., Spliid, N. H., Justesen, A. F. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *J. Microbiol. Methods.* 76: 234–240.
- Nielsen, L. K., Cook, D. J., Edwards, S. G., Ray, R. V. 2014. The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. *Int. J. Food Microbiol.* 179: 38–49.
- 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: 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.
- Perkowski, J., Kiecana, I. & Kaczmarek, Z. 2003. Natural occurrence and distribution of *Fusarium* toxins in contaminated barley cultivars. *European J. Plant Pathol.* 109: 331–33
- Salas, B., Steffenson, B. J., Casper, H. H., Tacke, B., Prom, L. K., Fetch, T. G., Schwarz, P. B. 1999. *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Dis.* 83: 667–674.
- Sarlin, T., Vilpola, A., Kotaviita, E., Olkku, J., Haikara, A. 2007. Fungal hydrophobins in the barley-to-beer chain. *J. Inst. Brew.* 113: 147–153
- Somma, S., Alvarez, C., Ricci, V., Ferracane, L., Ritieni, A., Logrieco, A., Moretti, A. 2010. Trichothecene and beauvericin mycotoxin production and genetic variability in *Fusarium poae* isolated from wheat kernels from northern Italy. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 27: 729–737.
- Stenglein, S. A. 2009. *Fusarium poae*: A pathogen that needs more attention. *J. Plant Pathol.* 91: 25–36.
- Stępień, Ł., Chełkowski, J. 2010. *Fusarium* head blight of wheat: pathogenic species and their mycotoxins. *World Mycotoxin J.* 3: 107–119.
- Tomczak, M., Wiśniewska, H., Stępień, Ł., Kostecki, M., Chełkowski, J., Goliński, P. 2002. Deoxynivalenol, nivalenol and moniliformin in wheat samples with head blight (scab) symptoms in Poland (1998-2000). *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 625–630.
- Vogelgsang, S., Sulyok, M., Hecker, A., Jenny, E., Krska, R., Schuhmacher, R., Forrer, H. R. 2008. Toxicogenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 122: 265–276.
- Yli-Mattila, T., Paavanan-Huhtala, S., Jestoi, M., Parikka, P., Hietaniemi, V., Gagkaeva, T., Sarlin, T., Haikara, A., Laaksonen, S., Rizzo, A. 2008. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 41: 243–260.

Quantitative changes in DNA methylation induced by monochromatic light in barley regenerants obtained by androgenesis

Zmiany ilościowe metylacji DNA indukowane przez światło monochromatyczne u regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze androgenozy

Patrycja Siedlarz, Sławomir Bany, Krystyna Rybka ✉

Department of Plant Biochemistry and Physiology

Plant Breeding and Acclimatization Institute - National Research Institute, 05-870 Radzików, Poland

✉ k.rybka@ihar.edu.pl

Changes in DNA methylation are one of the best known mechanisms of epigenetic regulation of gene expression, which in the process of induced androgenesis is associated with reprogramming of haploid microspores development towards the formation of embryos, as a result of exposure of anthers in ears and then anthers culture *in vitro* to stress factors. The aim of the study was to test the hypothesis of whether the use of monochromatic light during induced androgenesis might be associated with epigenetic phenomena. The experiments were carried out on DH plants of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) obtained by androgenesis modified by monochromatic light: blue, green and red. A quantitative evaluation of the effect of light on the degree of DNA methylation was performed using RP-HPLC for the comparison of regenerants obtained under standard, control conditions (darkness) with those obtained with light usage. The differences in the amount of methylated cytidine in comparison to the control were: 0.40%, 0.16% and -0.55%, for blue, red and green light, respectively. The level of global genomic DNA methylation from control plants was in the range 21.32-21.52%. Methylation changes in response to monochromatic light used during callus formation in anthers culture, determined by RP-HPLC, are significant although small.

Key words: RP-HPLC, *Hordeum vulgare* L., LED, cytidine

Zmiany metylacji DNA to jeden z najlepiej poznanych mechanizmów epigenetycznej regulacji ekspresji genów, który w procesie indukowanej androgenozy związany jest z przeprogramowaniem rozwoju haploidalnych mikrospor w kierunku wytworzenia zarodków, w skutek ekspozycji pylników w kłosach a następnie kultur pylnikowych na czynniki stresowe. Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie hipotezy, czy zastosowanie światła monochromatycznego w trakcie indukowanej androgenozy może być związane ze zjawiskami epigenetycznymi. Badania przeprowadzono na roślinach DH jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) uzyskanych na drodze androgenozy modyfikowanej przez światło monochromatyczne: niebieskie, zielone i czerwone. Ilościową ocenę wpływu światła na stopień metylacji DNA wykonano za pomocą RP-HPLC porównując DNA regenerantów uzyskanych w standardowych, kontrolnych, warunkach (ciemność) z DNA regenerantów uzyskanych z wykorzystaniem światła. Stwierdzono, że różnice w ilości zmetylowanej cytydyny w porównaniu do kontroli wynoszą odpowiednio 0,40%, 0,16% i -0,55%, dla światła niebieskiego, czerwonego i zielonego, przy poziomie całkowitej metylacji genomu 21,32-21,52%. Zmiany całkowitej metylacji genomu jęczmienia zachodzące pod wpływem światła monochromatycznego zastosowanego na etapie formowania kalusa w procesie androgenozy w kulturach pylnikowych, oznaczone za pomocą RP-HPLC, są istotne aczkolwiek nieduże.

Słowa kluczowe: RP-HPLC, *Hordeum vulgare* L., LED, cytidine

Introduction

DNA methylation is a modification of deoxyribonucleic acid, which occurs during the S phase of the cell cycle, under the influence of DNA methyltransferases, specific against nitrogenous bases: cytosine or adenine, which are part of the nucleotides deoxycytidine (dC) and deoxyadenosine (dA). It involves the attachment of methyl groups (-CH₃) mainly to the 5th carbon

atom in the pyrimidine ring and less frequently on the methylation of NH₂⁺ groups located either at the 4th carbon atom of cytosine or at the 6th carbon atom of adenine (purine base). Methylation occurring in CpG dinucleotides and CpXpG trinucleotides, where X is A, T, C is defined as symmetrical methylation, while in CpXpX sequences, as unsymmetrical.

The methyl group donor is 5'-adenosine

methionine and the reaction products are: 5-methyl-2'-deoxycytidine (5mdC), the main product of DNA methylation as well as N₄-methyl-deoxycytidine and N₆-methyl-deoxyadenosine. The amount of 5mdC depends on both the enzymatically catalysed methylation as well as demethylation, which may be passive or active. Passive demethylation occurs during replication and is not accompanied by methyltransferase-1 (DNMT1), thus resulting in a lack of conservative methylation (Guz et al., 2010). In contrast, active demethylation is catalyzed by bifunctional DNA glycosylases from the DEMETER family during the repair of replication errors (Li et al. 2018). It is also associated with modifications of histones and, most likely, non-coding RNA (Parrilla-Doblas et al., 2019, Zhang et al., 2012). In mammals, the share of 5mdC in total dC content is 3-4%, which is 0.75-1% in relation to all nucleosides (Guz et al., 2010). It is estimated that 70-80% of CpG dinucleotides in the entire mammal genome are methylated (Law and Jacobsen, 2010).

On the other hand, the amount of methylated cytidine in the plant genome is 20-30% (Finnegan et al., 1998). In the *Arabidopsis thaliana* genome CpG, CpXpG and CpXpX are methylated approximately at 24%, 6.7% and 1.7%, respectively (Law and Jacobsen, 2010). The degree of DNA methylation changes with tissue age, wherein the methylation non-related to CpG islands is characteristic for differentiating cells (Peredo et al., 2006).

The androgenesis *in vitro* of haploid microspores allows for reprogramming their development from the gametophyte, leading to the formation of functional pollen grains, to sporophyte, leading to embryo formation. This process is accompanied by changes in genomic DNA methylation. Although in mammals most aspects of epigenetic regulation of both embryo as well as cancer cell development are quite well understood (Guz et al., 2010), the mechanisms of plant DNA methylation patterns reset remains predominantly unexplored. Changes in patterns of genomic DNA methylation in plant tissues may appear as a response to environmental stresses, associated with the redox signalling system (Bednarek and Orłowska, 2020). It has been shown that these changes are not only specific to individual species, but also differ within genotypes (Karan et al., 2012). Among others, plant regeneration by tissue culture *in vitro* also induces variation in the level of DNA methylation, depending on plant regeneration system, genotype of donor plants, explant, nutrient medium, as well as time duration of the culture. Among factors likely affecting changes in DNA methylation is also light. It

was found that the total amount of methylated cytidine increased in DNA of barley DH regenerants obtained *via* androgenesis or somatic embryogenesis in comparison with the donor plant, whereas in triticale it decreased (Machczyńska et al., 2014; Orłowska et al., 2016). However, if one or more subsequent generative propagation cycles are carried out, the amount of 5mdC stabilizes in successive plants thus obtained. Quantitative changes of methylated DNA are accompanied by changes in methylation patterns (Bednarek i Orłowska, 2020; Machczyńska et al., 2014; Niedziela, 2018; Orłowska et al., 2016).

Quantitative determination of genomic DNA methylation can be carried out by RP-HPLC (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography). This method was used for analyses of genomic DNA of cereal plants in response to abiotic stress (Niedziela, 2018), as well as in studies of barley and triticale *in vitro* regeneration (Orłowska et al., 2016; Machczyńska et al., 2014). The purpose of the present work was to evaluate whether modifications of the androgenesis process in anther cultures *in vitro*, consisting of the use of monochromatic light at the callus induction stage, affects changes in the level of methylation of genomic DNA in regenerants.

Materials and Methods

DNA from leaves of spring barley regenerants (*Hordeum vulgare* L.), genotype 2dh/8, were used for the experiment. Regenerants were obtained in anther culture *in vitro*, proceeded according to a modified protocol by using different monochromatic lighting at the stage of callus formation on induction medium (usually run in darkness). Regenerant plants were grown in dedicated trays with wells for single plants, in a phytotron at 18/14° C and in a 16/8 h day/night photoperiod. Leaves for DNA isolation were taken from plants in the tillering stage. The ploidy of regenerants genome was determined using a CyFlow Ploidy Analyzer flow cytometer (Sysmex Polska Sp. Z o.o.). This stage of the experiment and its detailed results are the subject of a separate publication (Siedlarz et al., 2020). Here, the subject of research was the DNA of regenerants obtained as a result of androgenesis *in vitro* modified at the time of callus induction by monochromatic LED light: blue 454.63 nm, green 525.95 nm and red 630.84 nm. The control group consisted DNA of regenerants obtained under standard conditions, *i.e.* in the dark during callus induction (Orłowska et al., 2016, Bednarek and Orłowska, 2020, Siedlarz et al., 2020). DNA was isolated from pairs of regenerates

obtained from the anther of the same ear: 10 in control conditions and 10 in light modified conditions. A total of 60 DNA samples were isolated from leaves of plants in the tillering phase using the DNasy Mini Preplit kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's methodology. DNA concentration and purity were determined using a UV-Vis NanoDrop 2000c/2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). The quality of the samples was verified electrophoretically in 1.4% agarose gel.

Quantitative analysis of DNA methylation was performed using RP-HPLC (Waters 625 LC system with a Waters 996 PDA detector) (Johnston et al., 2005, Orłowska et al., 2016). DNA samples denatured at 100° C were digested with P1 nuclease prior to dC and 5mdC determination after separation under isocratic conditions on a Max-RP C12 column, 4 µm, 150x4.6 mm (Phenomenex, USA) connected with a 4 µm pre-column Max-RP C12, eluted with a linear gradient: 0-55% buffer B within 0-10 minutes, 55-100% B within 10.1-20 minutes, and then with 100% buffer A for 5 min, flow 1 ml/min, where buffer A is: 0.5% methanol in 10 mM KH₂PO₄ pH 3.7 and buffer B is: 10% methanol in 10 mM KH₂PO₄ pH 3.7. Detection was carried out spectrophotometrically at λ = 280 nm and concentration [%] of 5-methyl-2'-deoxycytidine (5mdC) was evaluated using Millennium 32 v. 4.0 software. For each sample, the percentage of total genomic DNA methylation was determined from the quotient of the content of 5-methyl-2'-deoxycytidine (5mdC) in relation to the sum of 5-methyl-2'-deoxycytidine and 2'-deoxycytidine (dC): 5mdC [%] = [5mdC / (5mdC + dC)] x 100. The results were subjected to ANOVA variance analysis and homogeneous groups were determined based on the Tukey test.

Results and Discussion

The experiment was conducted to check whether modifications of the *in vitro* androgenesis by the usage of monochromatic light at the callus induction stage affects changes in the level of genomic DNA methylation of regenerants. DNA which was isolated from 60 plants, more specifically 30 pairs of plants, obtained under control and light-modified conditions, were subjected to quantitative RP-HPLC analysis. Since the donor plants were characterized by a constant level of DNA methylation, as they came from generative reproduction (Orłowska et al., 2016), we assume that the modifications of methylation observed in this experiment were induced by light.

There is no information available on how many

generative cycles are needed to stabilize/eliminate (if possible at all) the effects of tissue cultures on DNA methylation. Nevertheless, it has been shown that in both the barley and triticale genome the level of methylation stabilizes after one/two cycles (Machczyńska et al., 2014; Orłowska et al., 2016). Thus, to stabilize DNA methylation changes induced in regenerants genome DNA during *in vitro* tissue culture, the use of regenerants should be considered as donor plants. The total range of methylation changes in the barley genome determined in the present experiment was small and ranged from 21.12 to 21.87%. Also, Orłowska et al. (2016) showed 17.86% of methylation of the donor plant genome of the barley cultivar Scarlett, while the range of total DNA methylation of regenerants and the next two generative generations were in the range 19.88-20.09%. Machczyńska et al. (2014) for triticale (Bogo cultivar) showed a similar trend. Regardless of the method used for *in vitro* cultures (androgenesis in anther culture vs embryogenesis), total DNA methylation, determined by RP-HPLC, was 25.4% in the case of donor plants. In the generatively obtained first generation it decreased to 23.6% and then slightly raised, differentiating P2 from P1, but no longer differentiating future generations. It should be noted that the level of total DNA methylation as well as the change in the level of methylation due to *in vitro* reproduction depend on the genome; e.g. the DNA methylation degree of pannonian gentian donor plants (*Gentiana pannonica* Scop) was 22.3%, while regenerants ranged from 28.1-30.9% (Fiuk et al., 2010). In the present experiment, the total amount of 5mdC in the DNA of control plants averaged 21.4% and did not differentiate the tested regenerants obtained under unmodified light conditions (Table 1). However, in the group of regenerants obtained using light at the callus induction stage, differences were observed: for blue light conditions the amount of 5mdC was the smallest, significantly different from the value registered for parallel control plants, while for green light it was the largest and also different from the control group (Table 1). The results obtained for the group exposed to red light were ambiguous. They did not differ significantly from the value obtained for the group of plants under blue light. However, they did not differ from the control plants either. The difference in the amount of methylated cytidine between control plants and plants regenerated using light was on average: + 0.40%, + 0.16% and -0.55% for blue, red and green light (Fig. 1). In regenerants obtained in conditions modified by red light, differences from control ranged from

-0.86% to + 0.92%. Those results were ambiguous and require further investigation.

The changes in the global level of cytidine methylation in cereal plants described in the literature, induced by generative reproduction, mainly concerned comparisons between donor plants and regenerants under standard conditions for particular laboratories, or between the applied plant regeneration systems. It is interesting that within the *Hordeum vulgare* L. species, *in vitro* cultivation of wild forms caused changes in cytosine methylation in both level and patterns of methylation in comparison to the donor plant, in which higher level of DNA methylation were found (Li et al., 2007). An inverse relationship was observed for the barley cultivar Scarlett, since the lowest average value of global methylation was observed in donor plants, while the average value of DNA methylation and their offspring was 20% and 20.13%, respectively (Orłowska et al., 2016). Higher levels of methylation were observed in triticale

DNA for plants obtained in cultures of spontaneously released microspores, compared to regenerants from the culture of immature zygotic embryos. Differences between donor plants and regenerants have been shown. The average methylation of the genome of a donor plant was 25.4%, whereas regenerants 24.1%. The first generative progeny was characterized by 23.6% DNA methylation, the second 23.8%, and the third generative progeny-23.9%. (Machczyńska et al., 2014). Changes in the level of genomic DNA methylation are specific for each species, and also depend on the *in vitro* culture conditions. Exposure to UV-B light of an annual plant, big sagebrush seedlings obtained from apical meristem shoots induced a significant reduction in the total level of DNA methylation (Pandey and Pandey-Rai, 2015). The presented results also indicate that the type of monochromatic light used during callus induction in anthers *in vitro* culture causes changes in the level of methylation of genomic DNA, in a manner depending on the wavelength of light used, *i.e.* the color of the monochromatic light.

Tabela 1
Table 1

Średnia ilość zmetylowanej cytydyny [%] w DNA genomowym regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze androgenyzy w warunkach standardowych (kontrola) oraz w warunkach modyfikowanych przez światło monochromatyczne o barwie niebieskiej, zielonej bądź czerwonej.

The average amount of methylated cytidine [%] in the genomic DNA of barley regenerants obtained by androgenesis under standard conditions (control) and conditions modified by blue, green or red monochromatic light.

5dmC [%]		
warunki androgenyzy androgenesis condition		
światło light	kontrola control	światło light
niebieskie blue	21.52 a	21.12 b **
zielone green	21.32 a	21.87 a **
czerwone red	21.45 a	21.29 b nd

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie w grupie regenerantów kontrolnych (kontrola) i grupie regenerantów uzyskanych w warunkach modyfikowanych światłem (światło) (liczby w kolumnie)

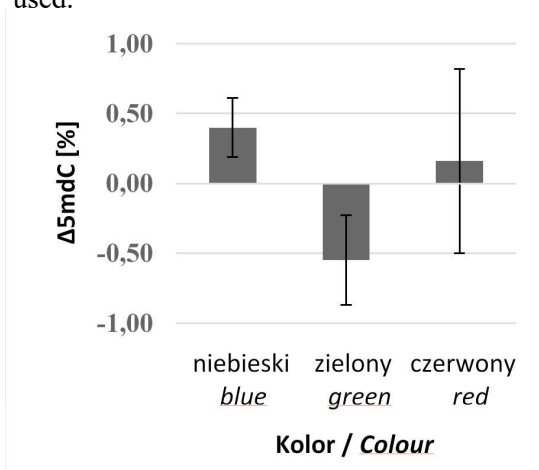
** istotna różnica z $P \geq 95\%$ (nd – brak różnic) pomiędzy stopniem metylacji regenerantów uzyskanych w warunkach kontrolnych a stopniem metylacji regenerantów uzyskanych w warunkach modyfikowanych światłem (liczby w wierszach)

Values marked with the same letter do not differ significantly in the group of control regenerants (control) and the group of regenerants obtained under conditions modified by light (light) (numbers in a column)

** significant difference with $P \geq 95\%$ (nd - no differences) between the level of methylation of regenerants obtained under control conditions and the level of methylation of regenerants obtained under conditions modified by light (numbers in rows)

Conclusions

The use of monochromatic light in androgenesis *in vitro* during the incubation of anthers on the induction medium affects small but significant changes in genomic DNA methylation. The level of methylation depends on the wavelength of the light used.



Rys. 1. Średnie różnice [%] w ilości zmetylowanej cytydyny w DNA regenerantów uzyskanych na drodze androgenyzy prowadzonej w warunkach kontrolnych i warunkach modyfikowanych światłem niebieskim, zielonym i czerwonym z zaznaczoną wartością odchylenia standardowego, na podstawie wyników uzyskanych dla 10 par regenerantów z każdego warunków świetlnych.

Fig. 1. Average differences [%] in the amount of methylated cytidine in the DNA of regenerants obtained by androgenesis under control conditions and conditions modified by blue, green and red lights, with marked standard deviation, based on the results obtained for 10 pairs of regenerants from each light condition.

Some of the results were presented at the Young Scientist Days Conference 2019 in Radzików

Literature

- Bednarek P. T., Orłowska R. 2020. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 140: 245 – 257.
- Finnegan E. J., Genger R. K., Peacock W. J., Dennis E. S. 1998. DNA methylation in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49(1): 223 – 247.
- Fiuk A., Bednarek P. T., Rybczyński J. J. 2010. Flow Cytometry, HPLC-RP, and metAFLP Analyses to Assess Genetic Variability in Somatic Embryo-Derived Plantlets of *Gentiana pannonica* Scop. *Plant Mol. Biol. Rep.* 28: 413 – 420.
- Guz J., Foksiński M., Oliński R. 2010. Mechanizm metylacji i demetylacji DNA – znaczenie w kontroli ekspresji genów [Eng.: Mechanism of DNA methylation and demethylation – its role in control of genes expression]. *Post. Bioch.* 56(1): 7 – 15.
- Johnston J. W., Harding K., Bremner D. H., Souch G., Green J., Lynch P. T., Grout B., Benson E. E. 2005. HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors. *Plant Physiol. Biochem.* 43(9): 844 – 853.
- Karan R., DeLeon T., Biradar H., Subudhi P. K. 2012. Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. *PLoS One* 7(6): e40203.
- Law J. A., Jacobsen S. E. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Gen.* 11(3): 204 – 220.
- Li X., Yu X., Wang N., Feng Q., Dong Z., Liu L., Liu B. 2007. Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* Trin.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 90(2): 153 – 168.
- Machczyńska J., Orłowska R., Zimny J., Bednarek P. T. 2014. Extended metAFLP approach in studies of the tissue culture induced variation (TCIV) in case of triticale. *Mol. Breed.* 34(3): 845 – 854.
- Niedziela A. 2018. The influence of Al³⁺ on DNA methylation and sequence changes in the triticale (*Triticosecale* Wittmack) genome. *J. Appl. Gen.* 59(4): 405 – 417.
- Orłowska R., Machczyńska J., Oleszczuk S., Zimny J., Bednarek P. T. 2016. DNA methylation changes and TE activity induced in tissue cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Biol. Res.-Thessalonike* 23(1): 19.
- Pandey N., Pandey-Rai S. 2015. Deciphering UV-B-induced variation in DNA methylation pattern and its influence on regulation of DBR2 expression in *Artemisia annua* L. *Planta* 242(4): 869 – 879.
- Parrilla-Doblas J. T., Roldan-Arjona T., Ariza R. R., Cordoba-Canero D. 2019. Active DNA Demethylation in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 20(19): 4683.
- Peredo E. L., Revilla M. Á., Arroyo-García R. 2006. Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. *J. Plant Physiol.* 163(10): 1071 – 1079.
- Siedlarz et al. 2020 (w przygotowaniu).
- Zhang H., Zhu J. K. 2012. Active DNA demethylation in plants and animals. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 77: 161 – 173.

The influence of homoeologous D(A) and D(B) substitutions on plant dry matter, nitrogen and phosphorus accumulation and utilization efficiency in hexaploid triticale young plants grown in hydroponics

Wpływ homeologicznych substytucji D(A) i D(B) w siewkach heksaploidalnego pszenżyta na gromadzenie suchej masy, akumulację oraz wykorzystanie azotu i fosforu w kulturze hydroponicznej

Teresa Oracka, Zbigniew Rybka ✉, Bogusław Łapiński

Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzików, 05-870 Błonie
✉ e-mail: z.rybka@ihar.edu.pl

The accumulation and utilization efficiency of nitrogen and phosphorus were studied using hydroponic cultures of seedlings of the ‘Presto’ and ‘Rhino’ D(A) and D(B) substitution lines of hexaploid triticale. The results were significantly affected by homoeology group of chromosomes participating in a substitution, the A or B genome origin of replaced chromosome and genetic background of triticale cultivar. The substitutions 4D(4B) and 5D(5B) resulted in an increase of plant dry matter in relation to the non-substituted cultivars. The significant increase of N accumulation was found in 3D(3A) and 4D(4B) of ‘Rhino’, and 5D(5B) and 4D(4B) of ‘Presto’. The improvement of N utilization efficiency was recorded for 2D(2A) and 1D(1B) of ‘Presto’, and 5D(5B), 7D(7A) and 5D(5A) of ‘Rhino’. The P accumulation was distinctly improved in ‘Presto’ 5D(5B) substitution. The P utilization efficiency was improved in all substitutions containing 4D or 6D as well as in ‘Presto’ 2D(2B) and 5D(5B).

Key words: breeding, D-genome, N accumulation, N utilization efficiency (NUE), P accumulation, P utilization efficiency (PUE), substitution lines, triticale

Badano akumulację i efektywność wykorzystania azotu i fosforu w warunkach kultury hydroponicznej w siewkach linii substytucyjnych D(A) i D(B) heksaploidalnego pszenżyta odmian Rhino i Presto. Obecność substytucji chromosomów grupy D przy zachowaniu w całości genomu żytniego (R) istotnie zmieniała gospodarkę mineralną siewek. Obecność substytucji 4D(4B) i 5D(5B) powodowała zwiększenie suchej masy siewek w porównaniu do siewek bez substytucji. Obserwowano zwiększenie akumulacji azotu w siewkach odmiany Rhino z substytucjami 3D(3A) i 4D(4B) oraz odmiany Presto z substytucjami 5D(5B) and 4D(4B). Zwiększenie wykorzystania azotu zaobserwowano w substytucjach 2D(2A) and 1D(1B) odmiany Presto i w substytucjach 5D(5B), 7D(7A) i 5D(5A) odmiany Rhino. Akumulacja fosforu była istotnie zwiększona w siewkach odmiany Presto z substytucją 5D(5B). Wykorzystanie fosforu było znacznie wyższe w siewkach obu odmian zawierających substytucje chromosomów 4D i 6D oraz w siewkach odmiany Presto z substytucjami 2D(2B) i 5D(5B).

Słowa kluczowe: akumulacja azotu, akumulacja fosforu, genom D, hodowla, linie substytucyjne, pszenżyto, wykorzystanie azotu (NUE), wykorzystanie fosforu (PUE)

Introduction

Breeding of plants efficient in absorption and utilization of nutrients is an undervalued tool to improve efficiency of applied fertilizers, to reduce input costs and to prevent leaks of nutrients to the ecosystem. Large differences among species and cultivars in absorption, translocation and utilization of mineral nutrients are known (Baligar et al. 2001). Due to multigenic character of nutrient metabolism the control or manipulation of genes involved is difficult and results are unpredictable.

A simpler way to improve nutrient metabolism in allopolyploid cereals is manipulation on the chromosomal level using substitutions or translocations, which can result in efficiency of mineral fertilization (Górny 2000).

The hexaploid triticale (*xTriticosecale* Wittmack, genome formula AABBRR), due to presence of rye genome (R), is a species showing remarkable improvement in accumulation of nitrogen and phosphorus as compared to wheat (*Triticum aestivum* L. - AABBDD)

(Cieply and Oracka 2001, Paponov et al. 1999). On the other hand, according to Huang et al. (2007), the D-genome of common wheat, which has not been included to hexaploid triticale, also contains valuable genes controlling utilization of mineral nutrients. Our earlier studies (Oracka, Łapiński, 2006) on two sets of D(R) substitution lines of hexaploid triticale revealed a positive influence of almost all substituting D genome chromosome pairs on the efficiency of use of the absorbed nitrogen and phosphorus. Therefore a question appears on a possibility to combine the positive effects of R- and D- genomes' chromosomes in a single hexaploid triticale karyotype. Among the existing cytogenetic stocks, the D(A) and D(B) substitution lines of triticale give opportunity to investigate effects of particular D-genome chromosomes on traits of plants containing whole rye genome. We assessed the influence of these substitutions on dry matter, nitrogen and phosphorus accumulation and utilization efficiency in young triticale plants grown in hydroponic medium with reduced concentration of nutrients.

Material and Methods

The material consisted of two sets of disomic D(A) and D(B) substitution lines, derived from the hexaploid triticale cultivars 'Presto' (winter) and 'Rhino' (spring) (Lukaszewski, 1990). Both sets contained all possible homoeological substitutions of wheat D genome chromosomes for their A or B genome counterparts, except for the 7D(7B) in 'Rhino'. The non-substituted cultivars 'Presto' and 'Rhino' were used as controls.

The procedures of seed germination and planting, growth chamber parameters and the medium composition had been described in our earlier paper (Oracka and Łapiński, 2005). Seedlings were kept in 4°C for 30 days and then planted on plastic tanks containing 40 l of the modified Hoagland no. 2 solution (Hoagland, and Arnon, 1950) at 50% reduced level of mineral elements. The plants were grown in a growth chamber supplied with the fluorescent lamps (MASTER TLD 58W/865, PHILIPS), at irradiance of 350 mmol m⁻² s⁻¹ and 16h day length. The nutrient solution was aerated for 10 minutes every hour and renewed every 4 days. The temperatures were 18°C (day) and 13°C (night), air humidity was 70%.

The experiment was designed as four replicates of four plants for each line. The plants were harvested after 41 days of growth (shooting stage) and plant dry matter was determined (after drying overnight at 105°C). Standard procedures (Kjeldahl

digestion, ammonium molybdate photometry) were used to determine N and P content in dry matter. The N and P accumulation was calculated from the dry matter and N, P concentrations, and the utilization efficiencies (NUE, PUE) were calculated as ratios of plant dry matter to total content of N or P in plants.

Analysis of variance (ANOVA) was performed to test the differences between objects for all parameters studied. Significant effects ($P < 0.05$) were explored using Tukey's LSD procedure.

Results

The D(A) and D(B) chromosome substitutions caused a significant variability of the examined parameters, as shown in Table 1. The differences were dependent on cultivar, chromosome homoeology group and whether A or B genome chromosomes were substituted.

Plant dry matter of the 16 substitution lines was significantly lower than that of the cultivar standards, 9 lines showed a similar level and two ones exceeded significantly the original cultivar. The 'Presto' substitutions were generally more variable than those of 'Rhino'. The lowest 'Presto' group results were recorded for the substitutions 4D(4A) and 1D(1A) and the highest ones for the substitutions 4D(4B) and 5D(5B). The 1D(1B), 2D(2A), 3D(3B), 4D(4A) and 6D(6B) substitutions negatively affected plant vigor, regardless the acceptor cultivar. The lacking 7D(7B) substitution would also be included to the abovementioned group, as the karyotype inviability on the 'Rhino' genetic background may be considered an extreme case of negative influence. Considering the relation of the substitution lines to their standard cultivars, the 2D(2B) and 5D(5A) on the 'Presto' background performed significantly better than in context of the 'Rhino' chromosomes. On the other hand, the 1D(1A), 3D(3A) and 7D(7A) performed better on the 'Rhino' genetic background. The 4D(4B), 5D(5B) and 6D(6A) did not cause significant decrease of plant dry matter in both cultivars.

Nitrogen accumulation: The amount of nitrogen absorbed was usually proportional to the plant dry matter content. The group of lines containing the 4D(4B) and 5D(5B) substitutions of 'Presto' and 3D(3A) 4D(4B) substitutions of 'Rhino' performed significantly better than standards. In relation to dry matter, the 7D(7A) 'Presto' substitution and 'Rhino' 3D(3B) showed increase of N accumulation.

Nitrogen utilization efficiency (NUE): The variability of NUE was much lower among the studied lines than in dry matter or N accumulation. However, significant superiority over the standard

The influence of homoeologous D(A) and D(B) substitutions on plant dry matter...

cultivars was noted for the 1D(1B) and 2D(2A) of 'Presto' and 5D(5A), 5D(5B), 7D(7A) of 'Rhino'. The lines 6D(6A) and 7D(7A) of both cultivars and 1D(1A) of 'Rhino' showed relatively high levels of nitrogen accumulation and efficiency of use, in spite of a negative correlation of these parameters in majority of the lines.

Phosphorus accumulation was highly variable, depending on cultivar and chromosome homoeology group. In majority of the 'Presto' substitution

lines the P accumulation was distinctly lower than in the standard cultivar. The 5D(5B) line was the only positive exception, showing significant increase of P content, in relation to the standard cultivar. No significant decrease has been observed for the 4D(4B) 'Presto' substitution. In the 'Rhino' cultivar the negative effect of the substitutions on P accumulation was less pronounced and only half of the lines showed significant decrease in P accumulation, but no line was significantly better.

Table 1
Tabela 1

Effects of D-genome chromosomes' substitutions in the 'Presto' and 'Rhino' triticale cultivars on plant dry matter and on uptake and utilization efficiency of nitrogen and phosphorus (NUE and PUE, respectively), LSD – lowest significant difference, (+) – significantly higher than control.

Wpływ substytucji chromosomów genu D pszenicy na gromadzenie suchej masy oraz pobieranie i wykorzystanie azotu i fosforu (NUE i PUE) w siewkach pszenżyta odmian Presto i Rhino. LSD – najmniejsza istotna różnica, (+) – wartość istotnie wyższa od kontroli.

'Presto' substitution	Dry matter [mg]	Nitrogen content [mg per plant]	NUE	Phosphorus content [mg per plant]	PUE
'Presto' non-substituted	748.1	24.94	30.0	7.03	102.3
1D(1B)	544.6	17.83	30.6(+)	5.16	101.8
2D(2A)	459.0	16.33	31.2(+)	4.53	100.6
2D(2B)	802.5	25.65	28.1	5.72	115.5(+)
3D(3A)	502.0	16.61	30.2	4.70	103.5
3D(3B)	525.0	17.84	29.4	5.16	101.1
4D(4A)	351.5	11.65	30.2	3.26	104.6(+)
4D(4B)	831.8(+)	28.14(+)	29.6	6.72	115.8(+)
5D(5A)	743.6	26.40	28.2	6.01	107.3(+)
5D(5B)	887.4(+)	30.69(+)	28.9	8.03(+)	103.3
6D(6A)	699.3	23.21	30.1	5.74	109.3(+)
6D(6B)	445.5	15.84	28.1	3.89	109.5(+)
7D(7A)	687.1	23.78	28.9	6.07	101.8
7D(7B)	540.9	18.06	29.9	4.69	101.1
LSD	55.2	1.90	0.3	0.50	1.3
'Rhino' substitution	Dry matter [mg]	Nitrogen content [mg per plant]	NUE	Phosphorus content [mg per plant]	PUE
'Rhino' non-substituted	1391.8	47.61	29.2	14.86	93.3
1D(1A)	1399.6	47.99	29.2	15.76	81.0
1D(1B)	1181.7	40.41	29.2	13.81	82.8
2D(2A)	934.5	33.03	28.3	9.66	89.9
2D(2B)	1215.8	41.98	29.0	13.04	91.7
3D(3A)	1475.0	52.94(+)	27.9	15.79	88.9
3D(3B)	1253.4	43.41	28.9	13.71	84.2
4D(4A)	958.4	33.37	28.7	8.38	103.7(+)
4D(4B)	1488.4	52.15(+)	28.5	13.35	103.8(+)
5D(5A)	1070.8	36.42	29.4(+)	11.12	93.5
5D(5B)	1387.3	44.23	31.4	15.04	91.9
6D(6A)	1457.9	50.29	29.0	14.51	94.9(+)
6D(6B)	807.5	29.96	27.0	8.20	96.4(+)
7D(7A)	1396.2	46.12	30.3(+)	14.83	90.1
LSD	126.2	4.30	0.1	1.20	0.8

Phosphorus utilization efficiency (PUE): Variability of the parameter was noticeably higher than for NUE and number of lines with positive reaction was higher than for the other analyzed indices. Only two lines of ‘Presto’, namely 1D(1A) and 2D(2A), showed significantly lower PUE than the cultivar standard, while six ones: 2D(2B), 4D(4A), 4D(4B), 5D(5A), 6D(6A) and 6D(6B) were significantly more effective. The majority of substitutions in ‘Rhino’ showed a significant negative effect, while 4D(4A), 4D(4B), 6D(6A) and 6D(6B) substitutions caused a significant PUE increase. The PUE for 5D(5A) line was on the level of the ‘Rhino’ standard.

Discussion

The most interesting substitutions which result in improvement of N and P management in the triticale seedlings proved to be 5D(5B) and 4D(4B). The plant vigor was not reduced, in contrast to majority of other chromosome replacements. In ‘Presto’ the increases of dry matter, in relation to that of standard cultivar, were significant (by ca. 19% and 11%, respectively). Accumulation of nitrogen and phosphorus was mainly a function of plant dry matter (the correlation coefficients $r = 0.996$ and $r = 0.977$, respectively). The NUE and PUE parameters were correlated negatively with the dry matter ($r = -0.183$ and $r = -0.634$, respectively), however more variation was left for the more specific effects. The highest increase of NUE has been noted in the ‘Rhino’ 5D(5B) – by about 7%. The comparison of performance of 5D(5B) and 5D(5A) lines suggests importance of the 5D *per se* in ‘Rhino’ cultivar, while in ‘Presto’ cv. significance of replaced A or B chromosome can be seen. The PUE values for 4D(4B) in both ‘Presto’ and ‘Rhino’ substitutions were significantly higher than in the standards (by ca. 13% and 11%, respectively). The lowest level of plant vigor and N and P accumulation in the 4D(4A) substitutions of both sets can be attributed to large structural differences between the 4D substituting and the 4A substituted chromosomes due to the known 4AL-5AL and 4A-7B heterologous translocations (Naranjo et al., 1987, Cao et al., 1989, Nelson et al., 1995). Thus, the high usefulness of 4D could be expressed only in the 4D(4B) substitutions. Probably the same cause makes production of the ‘Rhino’ 7D(7B) line difficult. The highest PUE seems to be correlated with presence of the 4D rather than with absence of 4A or 4B. Our previous investigation on the D(R) substitutions (Oracka, Łapiński, 2006) indicated extremely positive effects of the 4D”(4R’) incomplete substitution (with one

rye chromosome maintained) in ‘Rhino’ on the parameters studied, which confirms high value of the 4D chromosome in engineering of environment friendly triticale. In the research of Budzianowski and Woś (2004) the chromosomes 4D, in the same 4D(4A) and 4D(4B) substitution lines, were among the most efficient in rising tolerance to high concentration of aluminium ions.

The highest accumulation of the nutrients has been found in the 3D(3A) line of ‘Rhino’, together with high scores for plant dry matter. It is inconsistent with the results in our paper mentioned above, which shows that the ‘Presto’, not the ‘Rhino’ gene background contributes to the 3D chromosome superiority in the N and P accumulation when substituted for the 3R. The difference cannot be attributed to different allelic composition of the 3D chromosome, which was introduced from the wheat cultivar ‘Grana’ (Lukaszewski 1990, Budak et al. 2004). The 6D(6A) substitution of ‘Rhino’ did not show as significant and complex effect on nutrients management as the 5D(5B) and 4D(4B), however the PUE level was slightly increased without negative side effects on plant dry matter and other parameters studied. The PUE parameter also increased in 6D(6B), but the plant vigor was much lower. The results for both 6D(6A) and 6D(6B) substitutions indicate that presence of the 6D chromosome rather than absence of the 6A or 6B is responsible for PUE increase. The 6D(6R) substitution of rye chromosome (from our earlier studies) also exerted positive effect on the PUE and NUE parameters (Oracka, Łapiński, 2006). The PUE and plant dry matter were remarkably high also in the 2D(2B) substitution of ‘Presto’. The low values in ‘Rhino’ 2D(2B) show importance of differences in varietal background. The possible influence of different 2D allelic composition has to be excluded here, because in production of the ‘Presto’ set the substitutions of ‘Rhino’ served as donors and the same variants of D-chromosomes are present in the respective lines of both sets (Lukaszewski, 1990). High importance of the 2D chromosome in determination of all parameters studied is confirmed by our earlier results on the D(R) substitutions in triticale, where the NUE and PUE reach the highest levels in the 2D(2R) line (Oracka, Łapiński 2006). The highest 2D(2A) value for NUE in ‘Presto’ in the present paper is in agreement with those results.

The 1D(1A) and 7D(7A) ‘Rhino’ substitutions are also worth of mention as representing relatively high levels of all studied parameters, except for PUE. The respective ‘Presto’ substitutions performed much worse, suggesting that some

reserves may exist in recombination between the studied cultivars, even without the D-genome manipulation.

The results presented above show the importance of cultivar genetic background for effective substitution. Comparison of respective 'Presto' and 'Rhino' substitution lines suggests that much more variation is to be discovered in triticale after creation of substitution lines from different sources of A, B and D genomes. A reduction of viability is a rule in substitutions, even on the 6x ploidy level, well buffered by genetic redundancy. The increases of dry matter in 'Presto' 5D(5B) and 4D(4B) seem to contradict this tendency.

However, the field trials performed by Budak et al. (2004) with the same 'Presto' substitution set did not show yield increase in any lines, including those deduced as promising from the presented lab experiment. The discrepancy may be attributed to the environmental circumstances, much different in field than in phytotron hydroponic culture. Another source of differences may be the growth phase difference, the N and P metabolism in young plants studied here is not necessarily the same as in the more advanced growth stages. Nevertheless, the results confirm the main idea on the potential for improvement of nutrient management in the D(A) and D(B) substitution lines of hexaploid triticale. The identification of most promising substitutions seems also worth of attention, because in our earlier studies the interspecific differences between wheat and triticale, concerning the same parameters studied in the same way on seedlings in phytotron hydroponic, were in agreement with those observed in field practice.

We do not agree with the final suggestion of Budak et al. (2004), that no major benefit can be expected from the D-genome substitutions. Such conclusion cannot be valid as based on the unbalanced cytogenetic stocks where no effort has been put in breeding adjustment of a proper gene background to a particular substitution. Thus, only the bred forms of substituted 2D(2R) spring triticales of Mexican origin show high yield potential, particularly on alkaline soils, where they outyielded the non-substituted forms with complete rye genome (Royo et al. 1993). Considering that evolutionary distance between the D genome and its A or B relatives is lower than between the D and R genomes, one could expect less difficulties in breeding adjustment and development of a D(A) or D(B) whole chromosome substitution cultivar.

As known from wheat breeding, chromosome arms have more chances for successful assimila-

tion into breeding populations than whole alien chromosomes. The 1RS.BL and 1RS.AL translocations in bread wheat are the examples of such chromosome arm replacement resulting from the frequently made triticale-wheat crosses. The 1RS arm was spontaneously and widely included into the breeding populations because of its effect on adaptation to adverse environmental conditions (Lukaszewski 1990b, Hoffmann 2008). Crosses between whole chromosome substituted and non-substituted forms produce relatively frequent centromeric translocations (Friebe et al. 2005). The same could be expected for the chromosome arms of D-genome positively affecting management of mineral nutrients.

Introduction of the D-genome chromosomes into hexaploid triticale is worth of effort considering other possible advantages detected by other authors. The 5D chromosome in triticale controls better frost tolerance (Sutka and Snape, 1989) and increases grain hardness (Campbell et al. 1999). In the research of Budzianowski and Woś (2004) the chromosomes 4D and 6D, from the same sets of substitution lines, were among the most efficient in rising tolerance to high concentration of aluminium ions. Another advantage of the 6D incorporation into triticale may be improvement of baking quality (Payne, 1987). Additionally, the presence of D-genome chromosomes in triticale could enable access, via the *Triticum aestivum* bridge, to wide variation of the wild D-genome progenitor – *Triticum tauschii*, which is being recently extensively explored as a source of biotic and abiotic stress resistance for bread wheat (Mujeb-Kazi 2008). The *T. tauschii* is mentioned also by Huang et al. (2007) as a species containing genes responsible for high nutrient utilization efficiency.

Conclusions

The results confirm usefulness of homeologous substitution of whole chromosomes as a tool for improvement of multigenic traits in allopolyploid species.

The 4D(4B) substitution proved to be most effective in improvement of nitrogen and phosphorus management in Rhino (spring) and Presto (winter) cultivars of hexaploid triticale, whereas 3D(3A) and 5D(5B) positive effects were observed in Rhino and Presto, respectively.

The effects of particular chromosome substitutions were frequently specific to the cultivar sets in which they were present.

Literature

- Alam, S. M., 2001. Genetic variations in nutrient contents by wheat and its substitution lines. *Pakistan Journ. of Biol. Sci.* 4, 642-644.
- Baligar, V. C., N. K. Fageria, and Z. L. He, 2001. Nutrient use efficiency in plants. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 32 (7), 921-950.
- Budak, H., P. S. Baenzinger, B. S. Beecher, R. A. Graybosch, T. Campell, J. Shipman., M. Erayman., K. M Eskridge, 2004. The effect of introgressions of wheat D-genome chromosomes into 'Presto' triticale. 2004. *Euphytica* 137, 261-270.
- Budzianowski, G. and H. Woś, 2004. The effect of single D-genome chromosomes on aluminium tolerance of triticale. *Euphytica* 137, 165-172.
- Campbell, K. G., B. C. Bergman, D. C. Gualberto, J. A. Anderson, M. J. Giroux, G. Hareland, R. G. Fulger, M. E. Sorrels and P. L. Finney, 1999. Quantitative trait loci associated with kernel traits in a soft and hard wheat cross. *Crop. Sci.* 39, 1184-1195.
- Cao, S., P.J. Sharp, A. J. Worland, E. J. Warham, R. M. D. Koebner and M.D. Gale, 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78, 495-504.
- Cieply, J., and T. Oracka, 2001. Genetic Differences for Nutrients Utilization Efficiencies in Winter Triticale and Spring wheat. W.J. Horst (Ed.), *Plant nutrition – Food security and sustainability of agro-ecosystems.* 96-97, Kluwer Academic Publishers.
- Friebe, B., P. Zhang, G. Linc, and B. S. Gill, 2005. Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. *Cytogenet. Genome Res.* 109 (1-3), 293-297.
- Górny, A. G. 2000. Effects of the substituted A and B chromosomes of *Triticum dicoccoides* on the nitrogen, phosphorus and water use efficiencies in the 'Langdon' durum wheat (*T. turgidum* L. var. *durum*). *Cereal Research Communications* Vol. 28 No. 3 pp. 293-298
- Hoagland D.R., and D.I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. Circular 347.
- Hoffmann, B., 2008. Alteration of drought tolerance of winter wheat caused by translocation of rye chromosome segment 1RS. *Cereal Res. Comm.* 36(2), 269-278.
- Huang, M .L., X . P. Deng, Y. Z. Zhao, S. L. Zhou, S. Inanaga, S. Yamada, and K. Tanaka, 2007. Water and nutrient use efficiency in diploid, tetraploid and hexaploid wheat. *J. Integr. Plant Biol.* 49(5), 706-715.
- Lukaszewski, A. J., 1990a. Development of aneuploid series in hexaploid triticale. *Proc. 2nd Int. Triticale Symp.* 1-5 October, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil, 397-400.
- Lukaszewski A. J., 1990b. Frequency of 1RS.AL and 1RS. BL translocations in United States wheats. *Crop Sci.* 30, 1151-1153.
- Mujeeb-Kazi, A., A. Gul, M. Forooq, S. Rizwan, I. Ahmad, 2008. Rebirth of synthetic hexaploids with global implications for wheat improvement. *Austr. J. Agric. Res.* 59(5): 391-398.
- Naranjo, T., A. Roca, P. G. Goicoechea, and R. Giraldez, 1987. Arm homology of wheat and rye chromosomes. *Genome* 29, 873-882.
- Nelson, J. C., M. E. Sorrels, A. E. van Deynze, Y. H. Lu, M. Atkinson, M. Bernard, P. Leroy, J. D. Faris, and J. A. Anderson, 1995. Molecular mapping of wheat: Major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5 and 7. *Genetics* 141, 721-731.
- Oracka, T., and B. Łapiński, 2005. Plant dry matter and root size in D(R)substitutions lines of hexaploid triticale. *Plant Breed. Seed Sci.* 52, 17-30.
- Oracka, T., and B. Łapiński, 2006. Nitrogen and phosphorus uptake and utilization efficiency in D(R) substitution lines of hexaploid triticale. *Plant Breeding* 125, 221-224.
- Paponov, I. A., S. Lebedinska, and E. I. Koshkin, 1999. Growth analysis of solution culture-grown winter rye, wheat and triticale at different relative rates of nitrogen supply. *Annals of Botany* 84, 467-473.
- Payne, P. I., 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on breadmaking quality. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 141-153.
- Royo, C., A. Rodriguez, and I. Romagosa, 1993. Differential adaptation of complete and substituted triticale. *Plant Breeding* 111 (2), 113-119.

Wpływ intensywności uprawy na produktywność mieszańcowych i populacyjnych odmian pszenicy ozimej

The impact of cultivation intensity for productivity on hybrid and population cultivars of winter wheat

Marta Jańczak-Pieniążek ✉, Jan Buczek, Renata Tobiasz-Salach, Dorota Bobrecka-Jamro

Uniwersytet Rzeszowski, Kolegium Nauk Przyrodniczych,
Instytut Nauk Rolniczych, Ochrony i Kształtowania Środowiska, Zakład Produkcji Roślinnej,
ul. Zelwerowicza 4, 35–601 Rzeszów,
✉ e-mail: mjanczak@ur.edu.pl

Ścisłe doświadczenie polowe z pszenicą ozimą zostało przeprowadzone w latach 2016–2019 w Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Przecławiu. Czynnikiem doświadczenia były: I – technologie uprawy o zróżnicowanym poziomie intensywności (średniointensywna -A1, wysokointensywna – A2), II – odmiany mieszańcowe i populacyjne pszenicy ozimej. Układ warunków pogodowych wywarł znaczący wpływ na większość badanych parametrów, w tym wielkość i jakość plonu pszenicy ozimej. Plon ziarna był wyższy na obiektach z technologią A2 w porównaniu do A1. Największym potencjałem plonotwórczym charakteryzowała się odmiana mieszańcowa Hybery, natomiast najniższym populacyjna odmiana Belissa i mieszańcowa Hyfi. Uprawa pszenicy w technologii wysokointensywnej (A2) sprzyjała uzyskaniu korzystniejszych wskaźników zawartości chlorofilu w liściu flagowym oraz wskaźników technologicznych ziarna (zawartości białka i glutenu oraz gęstości ziarna w stanie zsypanym).

Słowa kluczowe: pszenica ozima, technologia uprawy, odmiany mieszańcowe, odmiany populacyjne

The field experiment with winter wheat was conducted in the years 2016–2019 at the Experimental Station of Cultivar Assessment in Przecław. The experimental factors were: I – cultivation technologies with different intensity levels (medium-intensive A1 and high-intensive A2), II – hybrid cultivars and population cultivars of winter wheat. Arrangement of weather conditions had a significant impact on most of the studied parameters, including the quantity and quality of winter wheat yield. Grain yield was higher where technology A2 was applied, as compared to technology A1. Hybrid cv. Hybery had the highest yield-forming potential, while population cv. Belissa and hybrid cv. Hyfi – the lowest. The cultivation of wheat via technology A2 was conducive to obtaining more favourable chlorophyll content in the flag leaf and better grain technological parameters (protein and gluten content and bulk density).

Key words: winter wheat, cultivation technology, hybrid cultivars, population cultivars

Wstęp

Pszenica zwyczajna ma istotne znaczenie zarówno w Polsce i na świecie ze względu na wysoki potencjał plonowania, właściwości technologiczne i korzystny skład chemiczny ziarna, decydujące o przydatności pszenicy do celów spożywczych. Roślina ta jest najważniejszym zbożem sprzedawanym na rynkach międzynarodowych, natomiast jej ozima forma stanowi około 80% światowej produkcji pszenicy (Franch i in. 2015). Plon i wartość technologiczna ziarna pszenicy uwarunkowana jest genetycznie i zależy od właściwości odmiany. Istotne znaczenie modyfikujące mają również czynniki środowiskowe (temperatura, opady, gleba) oraz technologie uprawy o zmiennej intensywności nawożenia

mineralnego i stosowanych zabiegów ochrony roślin (Horvat i in. 2015). Wzrost intensywności technologii uprawy przy właściwej dawce i aplikacji nawożenia mineralnego, w szczególności azotowego, nie tylko wpływa na wysokość plonu ziarna, lecz również na wzrost jego jakości, w tym ilości białka i glutenu oraz zawartość niektórych makro- i mikroelementów w ziarnie (García-Molina i Barro 2017, Wojtkowiak i in. 2018).

Obecnie zarówno w kraju, jak i za granicą poszukuje się odmian pszenicy odznaczających się stabilnością plonowania niezależnie od niekorzystnych warunków środowiskowych czy nawet agrotechnicznych. Pomimo, że bardziej popularne są pszenica zwyczajna i twarda czy starsze formy jak pszenica orkiszowa i samopsza,

wzrasta w niektórych krajach europejskich (m.in. Francja, Niemcy, Węgry) zainteresowanie uprawą i wykorzystaniem pszenicy mieszańcowej (Whitford i in. 2013). Odmiany pszenic mieszańcowych wyróżniają się wyższym potencjałem rolniczym spowodowanym większą stabilnością plonu oraz produktywnością ziarna i słomy w porównaniu do odmian populacyjnych (Reynolds i in. 1996, Whitford i in. 2013). Szacuje się, że powierzchnia zajmowana przez pszenicę mieszańcową stanowi mniej niż 1,0% całkowitej światowej uprawy pszenicy (Singh i in. 2015). Odmiany pszenicy mieszańcowej dają wyższe plony od 3,5 do 15,0% od odmian populacyjnych. U pszenic mieszańcowych wigor osiągnięty jest w wyniku krzyżowania odpowiednio dobranych linii dających wysoki efekt heterozji oraz cechy oczekiwane w produkcji roślinnej takie jak: szybsze tempo wzrostu i różnicowania się rośliny, większy przyrost biomasy, wyższą odporność na stres, stabilność plonów (Singh i in. 2010, Ogihara i in. 2015) i większą konkurencyjność w stosunku do chwastów (Longin i in. 2012, Buczek i in. 2016). Kluczowym czynnikiem wykorzystywanym w produkcji mieszańców w uprawach samopylnych jest precyzyjna kontrola płodności pyłku (Okada i Whitford 2019). Pszenica mieszańcowa uprawiana jest w Europie na powierzchni wynoszącej ponad 560 tys. ha, w tym głównie we Francji oraz w Niemczech, Węgrzech, Włoszech, Czechach, Słowacji, Rumunii i Portugalii (Gupta i in. 2019). Przykładem kraju spoza Europy w którym uprawia się na szeroką skalę pszenicę mieszańcową są Indie, gdzie cieszy się ona powodzeniem szczególnie wśród rolników posiadających niewielkie gospodarstwa (Matuschke i in. 2007). W Polsce odmiany mieszańcowe pszenicy wchodzi dopiero do uprawy, dowodem czego jest przetestowanie przez COBORU i wpisanie w 2016 roku do krajowego rejestru pierwszej mieszańcowej odmiany Hybery oraz trwające obecnie prace rejestrowe nad kolejnymi odmianami (COBORU 2016). Odmiany mieszańcowe popularyzowane są głównie przez francuski koncern hodowlano-nasienny Saaten-Union Recherche, jednak wysoki koszt produkcji materiału siewnego sprawia, że nie są konkurencyjne pod tym względem z odmianami populacyjnymi (<https://www.saaten-union.pl>).

Celem prowadzonych badań było określenie wpływu poziomu intensywności technologii uprawy (A1 – średniointensywnej i A2 – wysokointensywnej) na produktywność oraz jakość ziarna mieszańcowych i populacyjnych odmian pszenicy ozimej.

Material i Metody

Doświadczenie polowe z pszenicą ozimą przeprowadzone zostało w trzech sezonach wegetacyjnych 2016/2017, 2017/2018 oraz 2018/2019 w Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Przecławiu (50°11'N, 21°29'E) koło Mielca, podkarpackie. Doświadczenie prowadzone było w układzie równoważnych podbloków, w czterech powtórzeniach.

Czynnikami doświadczenia były:

- I – technologie uprawy o zróżnicowanym poziomie intensywności: średniointensywna (A1) oraz wysokointensywna (A2).
- II – cztery odmiany pszenicy ozimej należące do odmian chlebowych (B):
 - mieszańcowe: Hybery i Hyfi (hodowca: Saaten Union Recherche SAS),
 - populacyjne: Belissa (hodowca: HR Smolice) i Mulan (hodowca: Saaten-Union Polska).

Doświadczenie założono na madach brunatnych o składzie granulometrycznym pyłu ilastego (w sezonie 2016/2017 i 2018/2019) i o składzie granulometrycznym glin ilastych (w sezonie 2017/2018). Według Working Group WRB (2015) glebę zaliczano do Fluvic Cambisols (*CMfv*). Analizę próbek gleby przeprowadzono w akredytowanym laboratorium Okręgowej Stacji Chemiczno-Rolniczej w Rzeszowie, zgodnie z polskimi normami. Właściwości fizyczne i chemiczne gleby przedstawiono w tab. 1. Przedplonem dla pszenicy ozimej był w latach badań rzepak ozimy. Nawożenie mineralne fosforowo-potasowe w dawkach wynoszących odpowiednio 70 kg·ha⁻¹ P₂O₅ i 105 kg·ha⁻¹ K₂O zastosowano jednorazowo jesienią. Przedsięwzięte nawożenie azotowe dla obu technologii wynosiło

Tabela 1

Podstawowe właściwości gleby przed eksperymentem (0-30 cm)

Parametr	Lata		
	2016/2017	2017/2018	2018/2019
	Wartości		
pH w KCl	7.42	6.10	6.00
Próchnica (g·kg ⁻¹)	21.6	20.5	19.8
N _{min} (kg·ha ⁻¹)	60.1	53.4	65.0
	mg·kg ⁻¹		
P ₂ O ₅	204	129	73
K ₂ O	270	180	250
Mg	127	140	229
Fe	2289.0	2523.0	2222.0
Zn	14.2	13.3	12.8
Mn	389.0	251.4	265.1
Cu	6.0	6.2	6.4
B	1.1	1.3	1.5

21 kg·ha⁻¹. Na wiosnę nawożenie azotem w formie saletry amonowej (34%) wykonano po ruszeniu wegetacji w dawce 50 kg·ha⁻¹ (A1) oraz 60 kg·ha⁻¹ (A2). W okresie wegetacji pszenicy w technologii średniointensywnej azot stosowano w dawce 40 kg·ha⁻¹ w fazie strzelania w źdźbło (BBCH 32–33), natomiast w technologii wysokointensywnej w dawce 50 kg·ha⁻¹ w fazie strzelania w źdźbło (BBCH 32–33) oraz w dawce 20 kg·ha⁻¹ w fazie kłoszenia (BBCH 54–56).

Zastosowano (technologia A2) także dwukrotne nawożenie dolistne preparatem Plonvit Z w dawce 1 dm³·ha⁻¹ w fazach BBCH 31 i BBCH 39. Ochrona roślin przeprowadzona została zgodnie z zaleceniami producenta (tab. 2). W każdym roku trwania doświadczenia siew przeprowadzony został w trzeciej dekadzie września. Ilość wysianych ziaren wynosiła dla odmian populacyjnych 400 szt·m⁻², natomiast dla mieszańcowych 220 szt·m⁻². Powierzchnia poletka do siewu wynosiła 19,5 m², natomiast do zbioru 15,0 m².

Pomiary polowe

Pomiary zawartości chlorofilu w liściu flagowym przeprowadzone zostały w godzinach porannych, 3 – krotnie w fazach: strzelania w źdźbło (BBCH 37–39), kłoszenia (BBCH 52–55) oraz dojrzałości mlecznej (BBCH 73–75). Pomiary te wyznaczane zostały w środkowej części blaszki liściowej na w pełni wykształconych liściach aparatem Chlorophyll Content Meter CCM-200plus

Opti-Sciences, Hudson, NH, (USA). Przed zbiorem policzono na 1 m² obsadę kłosów oraz losowo pobrano 20 kłosów do obliczenia liczby ziaren w kłosie. Zbiór pszenicy przeprowadzony został kombajnem poletkowym w fazie dojrzałości pełnej ziarna (BBCH 89–92). Zebrany plon ziarna przeliczono na 1 ha z uwzględnieniem 15% wilgotności.

Badania laboratoryjne

Zawartość białka surowego w ziarnie oznaczona została metodą Kjeldahla (PN-EN ISO 20483), zawartość glutenu mokrego za pomocą systemu Glutomatic 2200 (PN-A-74042). Gęstość ziarna w stanie zsypanym oznaczono za pomocą gęstościomierza wyposażonego w cylinder 1000 ml (PN-EN ISO 7971–3), a masę 1000 ziaren przy 15% wilgotności (PN-68/R-74017).

Analiza statystyczna

Wyniki uzyskane w doświadczeniach polowych i analizach laboratoryjnych opracowano statystycznie, zgodnie z układem doświadczenia. Do analizy statystycznej wyników badań zastosowano metodę analizy wariancji (ANOVA). Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi określono przy użyciu testu Tukey'a przy poziomie istotności $p \leq 0,05$. Obliczenia wykonano przy pomocy programu statystycznego TIBCO Statistica 13.3.

Warunki meteorologiczne

Warunki pogodowe podano według danych Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Przeclawiu (tab. 3). Najwyższą sumę opadów odnotowano w sezonie 2016/2017 (616,8 mm), która była wyższa o 13,1% w porównaniu do sumy opadów wieloletnich. Sezony 2017/2018 i 2018/2019 charakteryzowały się występowaniem wyższych od wartości wieloletnich średnich dobowych temperatur powietrza. W sezonie 2016/2017 średnia dobowa temperatura powietrza wynosiła 6,6°C i była niższa o 9,6% w porównaniu do wielolecia. W badanym okresie najwyższa średnia temperatura powietrza wynosząca 20,8°C wystąpiła w czerwcu 2019 roku i była o 18,5% wyższa w porównaniu do średnich temperatur z wielolecia.

Wyniki i Dyskusja

W przeprowadzonym doświadczeniu wzrost intensywności technologii uprawy spowodował istotne zmniejszenie wysokości roślin o 5,6 cm w wyniku zastosowania regulatora wzrostu (tab. 4). Odmiana mieszańcowa Hybery wykształciła najwyższe rośliny w porównaniu do pozostałych odmian. Borusiewicz i Załuski (2009) także

Tabela 2

Zabiegi ochrony roślin stosowane w pszenicy ozimej

Pestycyd	Rodzaj preparatu (nazwa handlowa, substancja aktywna)	Dawka (dm ³ ·ha ⁻¹)		Termin aplikacji faza BBCH
		A1	A2	
Herbicydy	Maraton 375 SC (pendimetalina +izoproturon)	4,0		23-27
	Huzar Activ 387 OD (jodosulfuron metylosodowy +2,4-D)	1,0		30-32
Insektycydy	Karate Zeon 050 CS (lambda-cyhalotryna)	0,1		55-59
Fungicydy	Soligor 425 EC (protriokonazol +spiroksamina +tebukonazol)	-	1,0	31
	Artea 330 EC (propikonazol +cyprokonazol)	-	0,5	39
Regulator wzrostu	Moddus 250 EC (trineksapak etylu)	-	0,4	29-39

Tabela 3

Warunki pogodowe w badanych sezonach wegetacyjnych

Rok	Miesiąc											Okres
	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	VII	IX-VII
Opady (mm)												suma
2016/2017	44,7	91,4	98,1	33,2	13,8	21,0	38,4	78,3	111,9	41,6	44,4	616,8
2017/2018	110,6	79,0	41,8	32,3	18,3	24,7	40,9	15,7	68,8	47,4	108,3	587,8
2018/2019	33,5	50,4	9,6	38,6	38,9	10,7	24,3	62,1	182,0	19,2	45,1	514,4
1956-2015	55,2	41,8	39,8	36,4	34,1	33,5	35,2	49,8	38,1	82,1	99,2	545,2
Temperatura (°C)												średnia
2016/2017	12,9	6,5	2,2	-0,2	-6,9	-1,6	4,9	7,1	12,5	17,4	17,9	6,6
2017/2018	12,5	8,7	3,1	1,9	0,6	-4,8	-2,4	12,2	15,4	16,9	18,5	7,5
2018/2019	13,4	9,1	3,4	0,6	-2,9	1,3	3,2	7,8	12,6	20,8	17,7	7,9
1956-2015	13,1	8,0	3,5	-0,5	-3,2	-1,5	3,3	7,9	13,9	16,9	18,9	7,3

Tabela 4

Cechy morfologiczne roślin pszenicy w zależności od technologii uprawy, odmiany oraz lat badań

Czynnik		Wysokość roślin (cm)	Długość kłosa (cm)	Liczba kłosek w kłosie (szt.)
Technologia	A1	95,9 ^b	9,14 ^a	18,2 ^a
	A2	90,3 ^a	9,61 ^b	18,8 ^b
Odmiana	Belissa	88,7 ^a	9,33 ^b	17,4 ^a
	Mulan	91,7 ^b	9,06 ^a	18,4 ^b
	Hybery	100,8 ^c	9,27 ^b	19,5 ^c
	Hyfi	91,2 ^b	9,85 ^c	18,7 ^b
Rok	2016/2017	95,9 ^b	8,74 ^a	18,0 ^b
	2017/2018	86,8 ^a	8,63 ^a	17,0 ^a
	2018/2019	96,5 ^b	10,76 ^b	20,4 ^c
Średnio		93,1	9,38	18,5
Technologia (T)		*	*	*
Odmiana (C)		*	*	*
Rok (Y)		*	*	*
T x C		*	ni	ni
T x Y		*	ni	ni
C x Y		*	*	*
T x C x Y		ni	ni	ni

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie, $p \leq 0.05$,

* średnie różnią się istotnie $p \leq 0.05$, ni – różnice są nieistotne

wykazali wpływ retardanta w pszenicy uprawianej przy wyższym poziomie nawożenia azotowego, który spowodował zmniejszenie wysokości roślin. Wzrastająca intensywność technologii uprawy wpływał na przyrost długości kłosek średnio o 0,47 cm oraz liczby kłosek w kłosie o 0,6 szt. Istotnie najdłuższe kłosa wykształciła odmiana mieszańcowa Hyfi, natomiast najwięcej kłosek w kłosie odmiana mieszańcowa Hybery. W badaniach Franta i Bujaka (2007) długość kłosa zróżnicowana był zarówno w poszczególnych sezonach wegetacyjnych, jak i po zastosowaniu różnych dawek nawożenia azotem.

Wielkość plonu ziarna pszenicy w istotny sposób uzależniona była od intensywności technologii, zastosowanej odmiany oraz roku uprawy (tab. 5). Plon ziarna był istotnie wyższy na obiektach z technologią wysokointensywną w porównaniu do technologii średniointensywnej, a uzyskana zwyżka plonu wyniosła średnio 1,15 t·ha⁻¹. Bleharczyk i in. (2006) potwierdzają, że pszenica ozima należy do grupy roślin silnie reagujących przyrostami plonów na wzrost intensywności uprawy. Spośród badanych odmian pszenicy istotnie najwyższym potencjałem plonotwórczym charakteryzowała się odmiana mieszańcowa Hybery (9,35 t·ha⁻¹),

Tabela 5

Elementy plonowania i plon ziarna w zależności od technologii uprawy, odmiany oraz lat badań

Czynnik		Obsada kłosów (szt. · m ²)	Liczba ziaren w kłosie (szt.)	MTZ (g)	Plon (t · ha ⁻¹)
Technologia	A1	484,7 ^a	39,4 ^a	39,94 ^a	8,37 ^a
	A2	526,8 ^b	43,9 ^b	41,68 ^b	9,52 ^b
Odmiana	Belissa	501,6 ^b	40,8 ^a	40,16 ^a	8,63 ^a
	Mulan	522,5 ^c	41,6 ^a	40,54 ^{ab}	9,05 ^b
	Hybery	544,5 ^d	43,8 ^b	39,71 ^a	9,35 ^c
	Hyfi	454,3 ^a	40,5 ^a	42,83 ^b	8,74 ^a
Rok	2016/2017	558,6 ^c	42,1 ^b	41,00 ^{ab}	9,32 ^b
	2017/2018	493,1 ^b	43,7 ^c	41,94 ^b	9,80 ^c
	2018/2019	465,5 ^a	39,3 ^a	39,49 ^a	7,71 ^a
Średnio		505,7	41,7	40,81	8,94
Technologia (T)		*	*	*	*
Odmiana (C)		*	*	*	*
Rok (Y)		*	*	*	*
T x C		*	*	ni	*
T x Y		*	ni	ni	*
C x Y		*	ni	*	*
T x C x Y		*	ni	ni	ni

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie, $p \leq 0.05$,

* średnie różnią się istotnie $p \leq 0.05$, ni – różnice są nieistotne

natomiast najniższym odmiany: mieszańcowa Hyfi (8,74 t·ha⁻¹) i populacyjna Belissa (8,63 t·ha⁻¹). Wraz z intensywnością technologii wzrastała obsada kłosów, liczba i masa ziaren w kłosie oraz masa 1000 ziaren. Również w badaniach Czarnockiego i in. (2009) oraz Podolskiej i Sułek (2012) zastosowanie wyższego poziomu intensywności uprawy skutkowało istotnym wzrostem takich elementów struktury plonu jak liczba kłosów i liczba ziaren z kłosa. Układ warunków pogodowych wywarł znaczący wpływ na większość badanych parametrów, w tym wielkość plonu pszenicy ozimej. W przeprowadzonych badaniach najkorzystniejsze warunki pogodowe panujące w drugim roku badań wpłynęły na uzyskanie najwyższego plonu ziarna w porównaniu do pozostałych lat badań.

Cechy technologiczne ziarna zależały od odmiany, technologii uprawy i lat badań (tab. 6). Uprawa pszenicy w technologii wysokointensywnej wpływała na uzyskanie ziarna o lepszych cechach jakościowych, w szczególności zawartości białka ogólnego i glutenu. Odmiana mieszańcowa Hyfi wyróżniała się istotnie najwyższą zawartością tych parametrów. Zawartość białka ogólnego i glutenu w ziarnie odmiany Hyfi były wyższe odpowiednio o 13,4% i 15,2% w porównaniu do odmiany populacyjnej Mulan. Nowak i in. (2004) oraz Gąsiorowska i Makarewicz (2007) wykazali, że odmiany pszenicy w indywidualny sposób reagują na poziom

nawożenia azotowego, co objawia się zmianami zawartości białka w suchej masie ziarna. Gęstość ziarna w stanie zsympnym charakteryzuje zarówno dorodność, jak i stopień wykształcenia ziarniaków, ich strukturę oraz grubość okrywy, a także decyduje o wartości przemiałowej ziarna (Cacak-Pietrzak i in. 2005). Gęstość ziarna w stanie zsympnym była determinowana technologią produkcji w zakresie od 73,9 (A1) do 76,3 kg·hl⁻¹ (A2). Ziarno odmiany populacyjnej Belissa (74,2 kg·hl⁻¹) cechowała istotnie najniższa gęstość ziarna w stanie zsympnym w porównaniu do pozostałych odmian.

Zawartość chlorofilu w liściu flagowym pszenicy była uzależniona od poziomu technologii i osiągała istotnie większą wartość w przypadku technologii wysokointensywnej (tab. 7). W przeprowadzonym doświadczeniu wystąpiły różnice w zawartości chlorofilu pomiędzy badanymi odmianami. Spośród odmian najlepszy indeks zazielenienia we wszystkich analizowanych fazach wykazywała odmiana mieszańcowa Hybery, natomiast najmniejszą zawartością chlorofilu charakteryzowała się odmiana populacyjna Belissa. Kara i Mujdeci (2010) w swoich badaniach wykazali różnice w zawartości chlorofilu pomiędzy badanymi odmianami pszenicy, co wskazuje że jest to cecha uwarunkowana genetycznie. Kluczowym czynnikiem istotnie wpływającym na wzrost zawartości chlorofilu jest wyższy poziom nawożenia

Tabela 6

Parametry jakościowe ziarna pszenicy w zależności od technologii uprawy, odmiany oraz lat badań

Czynnik		Białko ogólne (g·kg ⁻¹)	Gluten (%)	Gęstość ziarna w stanie zsypanym (kg·hl ⁻¹)
Technologia	A1	119,9 ^a	24,4 ^a	73,9 ^a
	A2	131,8 ^b	27,5 ^b	76,3 ^b
Odmiana	Belissa	128,7 ^c	26,4 ^c	74,2 ^a
	Mulan	117,3 ^a	23,9 ^a	75,1 ^b
	Hybery	121,9 ^b	25,3 ^b	75,7 ^b
	Hyfi	135,4 ^d	28,2 ^d	75,2 ^b
Rok	2016/2017	116,5 ^a	23,7 ^a	74,7 ^a
	2017/2018	123,7 ^b	25,8 ^b	76,1 ^b
	2018/2019	137,3 ^c	28,3 ^c	74,5 ^a
Średnio		125,8	25,9	75,1
Technologia (T)		*	*	*
Odmiana (C)		*	*	*
Rok (Y)		*	*	*
T x C		ni	ni	*
T x Y		ni	ni	*
C x Y		*	*	*
T x C x Y		*	ni	*

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie, $p \leq 0.05$,

* średnie różnią się istotnie $p \leq 0.05$, ni – różnice są nieistotne

Tabela 7

Zawartość chlorofilu w liściu flagowym pszenicy (CCI) w zależności od technologii uprawy, odmiany oraz lat badań

Czynnik		Faza rozwojowa		
		strzelanie w źdźbło (BBCH 37-39)	kłoszenie (BBCH 52-55)	dojrzałość mleczna (BBCH 73-75)
Technologia	A1	33,3 ^a	30,3 ^a	24,3 ^a
	A2	36,4 ^b	33,2 ^b	27,5 ^b
Odmiana	Belissa	31,7 ^a	31,3 ^{ab}	24,1 ^a
	Mulan	35,0 ^b	30,3 ^a	26,5 ^{bc}
	Hybery	37,4 ^c	33,6 ^c	27,4 ^c
	Hyfi	35,3 ^b	32,0 ^b	25,5 ^{ab}
Rok	2016/2017	33,4 ^a	31,8 ^{ab}	24,1 ^a
	2017/2018	35,5 ^b	32,5 ^b	28,0 ^c
	2018/2019	35,6 ^b	31,0 ^a	25,6 ^b
Średnio		34,9	31,8	25,9
Technologia (T)		*	*	*
Odmiana (C)		*	*	*
Rok (Y)		*	*	*
T x C		*	ni	ni
T x Y		*	*	*
C x Y		*	*	ni
T x C x Y		*	ni	ni

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie, $p \leq 0.05$,

* średnie różnią się istotnie $p \leq 0.05$, ni – różnice są nieistotne

azotowego w technologii wysokointensywnej. Živčák i in. (2014) w doświadczeniu wazonowym z pszenicą ozimą, w którym zastosowali różne dawki nawożenia azotowego uzyskali większą wartość wskaźnika zieloności liścia w wariancie z najwyższą dawką azotu.

Wnioski

1. Plon ziarna był istotnie wyższy (o 12,1%) na obiektach z technologią wysokointensywną w porównaniu do średniointensywnej. Największym potencjałem plonotwórczym charakteryzowała się odmiana mieszańcowa Hybery a najniższym populacyjna Belissa i mieszańcowa Hyfi.
2. Wraz z intensywnością technologii uprawy wzrastała obsada kłosów, liczba ziaren z kłosa, MTZ, długość kłosa i liczba kłosków w kłosie, a malała wysokość roślin.
3. Technologia wysokointensywna sprzyjała uzyskaniu korzystniejszych wskaźników zawartości chlorofilu w liściu flagowym. Odmianą charakteryzującą się najwyższą wartością tego parametru we wszystkich analizowanych fazach rozwojowych była odmiana mieszańcowa Hybery.
4. Uprawa pszenicy w technologii wysokointensywnej gwarantowała uzyskanie ziarna o lepszych cechach jakościowych: wyższej zawartości białka ogólnego i glutenu oraz gęstości ziarna w stanie zsypanym. Odmiana mieszańcowa Hyfi cechowała się istotnie najwyższą zawartością białka ogólnego i glutenu.

Literatura

- Blecharczyk A., Śpitalniak J., Małecka I. 2006. Wpływ doboru przedplonów oraz systemów uprawy roli i nawożenia azotem na plonowanie pszenicy ozimej. *Fragm. Agron.* 23 (2): 273 — 28
- Borusiewicz A., Załuski D. 2009. Wpływ nawożenia NPK i antywylegacza na strukturalne elementy plonu płaskurki i pszenicy jarej Nawra. *Pam. Puław.* 151: 21 — 27
- Buczek J., Jarecki W., Bobrecka-Jamro D. 2016. Zmiany zachwaszczenia pszenicy ozimej populacyjnej i mieszańcowej w zależności od technologii produkcji i czynników środowiskowych. *Fragm. Agron.* 33 (2): 23 — 34
- Cacak-Pietrzak G., Ceglińska A., Torba J., 2005. Wartość przemiałowa wybranych odmian pszenicy z hodowli „Nasiona Kobierzyc”. *Pam. Puław.* 139: 27 — 38
- COBORU 2016. Lista odmian roślin rolniczych wpisanych do krajowego rejestru w Polsce. Słupia Wielka
- Czarnecki Sz., Turska E., Wielogórska G., Garwacka A. 2009. Wpływ technologii uprawy na architekturę łanu trzech odmian pszenicy ozimej. *Ann. UMCS, Sec. E Agricultura.* 64 (4): 54 — 61
- Franch B., Vermote E. F., Becker-Reshef I., Claverie M., Huang J., Zhang J., Justice C., Sobrino J. A. 2015. Improving the timeliness of winter wheat production forecast in the United States of America, Ukraine and China using MODIS data and NCAR Growing Degree Day information. *Remote Sens. Environ.* 161: 131 — 148
- Frant M., Bujak K. 2007. Wpływ uproszczeń w uprawie roli i poziomu nawożenia mineralnego na plonowanie pszenicy ozimej. *Fragm. Agron.* 22 (2): 46 — 51
- García-Molina D.M., Barro F. 2017. Characterization of changes in gluten proteins in low-gliadin transgenic wheat lines in response to application of different nitrogen regimes. *Front. Plant Sci.* 8 (257): 1 — 13
- Gąsiorowska B., Makarewicz A. 2007. Wpływ różnych sposobów nawożenia azotem na jakość ziarna odmian pszenicy jarej. *Fragm. Agron.* 2 (94): 102 — 109
- Gupta P. K., Balyan H. S., Gahlaut V., Saripalli G., Pal B., Basnet B. R., Josh A. K. 2019. Hybrid wheat: past, present and future. *Theor. Appl. Genet.* 132: 2463 — 2483
- Horvat D., Drezner G., Sudar R., Šimić G., Dvojković K., Španić V., Magdić D. 2015. Distribution of wheat protein components under different genetic backgrounds and environments. *Turk J Field Crops.* 20 (2): 150 — 154
<https://www.saaten-union.pl>
- Iuss Working Group WRB., 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. Word Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015. Word Soil Resources Reports No. 106
- Kara B., Mujdeci M. 2010. Influence of late-season nitrogen application on chlorophyll content and leaf area index in wheat. *Sci. Res. Essays.* 5 (16): 2299 — 2303
- Longin C. F. H., Mühleisen J., Maurer H. P., Zhang H., Gowda M., Reif J. C. 2012. Hybrid breeding in autogamous cereals. *Theor Appl Genet.* 125: 1087 — 1096
- Matuschke I., Mishra R. R., Qaim M. 2007. Adoption and impact of hybrid wheat in India. *World Dev.* 35 (8): 1422 — 1435
- Nowak W., Zbroszczyk T., Kotowicz L. 2004. Wpływ intensywności uprawy na niektóre cechy jakościowe ziarna odmian pszenicy. *Pam. Puław.* 135: 199 — 212
- Ogihara Y., Takumi S., Handa H. (ed). 2015. Advances in wheat genetics: From genome to field. Proceedings of the 12th International Wheat Genetics Symposium. Chapter 24. Hybrid breeding in wheat
- Okada Y., Whitford R. 2019. Hybrid wheat and abiotic stress. Rajpal V. R., Sehgal D., Kumar A., Raina S. N. (red.) *Genomics assisted breeding of crops for abiotic stress tolerance, Vol. 2, Sustainable Development and Biodiversity* 21

- Podolska G., Sułek A., 2012. Wpływ intensywności uprawy na plon i cechy struktury plonu odmian pszenicy ozimej. *Polish J Agron.* 11: 41 — 46
- Reynolds M. P., Rajaram S., McNab A. 1996. Increasing yield. Potential in wheat: Breaking the barriers. Chapter 2. Hybrid wheat: Advances and challenges. CIMMYT. Proceedings of a Workshop Held in Ciudad Obregon, Sonora, Mexico
- Singh S. K., Chatrath R., Mishra B. 2010. Perspective of hybrid wheat research: A review. *Indian J. Agric. Sci.* 80 (12): 1013 — 1027
- Singh S. P., Srivastava R., Kumar J. 2015. Male sterility systems in wheat and opportunities for hybrid wheat development. *Acta Physiol. Plant.* 37: 1713
- Whitford R., Fleury D., Reif J. C., Garcia M., Okada T., Korzun V., Langridge P. 2013. Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production. *J. Exp. Bot.* 64 (18): 5411 — 5428
- Wojtkowiak K., Stępień A., Orzech K. 2018. Wpływ nawożenia azotem na elementy składowe plonów, zawartość makroskładników oraz wskaźniki technologiczne w ziarnie czterech odmian pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*). *Fragm. Agron.* 35 (2): 146 — 155
- Živčák M., Olšovská K., Slamka P., Galambošová J., Rataj V., Shao H. B., Kalaji H. M., Brestič M. 2014b. Measurements of chlorophyll fluorescence in different leaf positions may detect nitrogen deficiency in wheat. *Zemdirbyste.* 101 (4): 437 — 444

Sztuczne sieci neuronowe i teledetekcja w ocenie porażenia pszenicy jarej fuzariozą kłosów

Artificial neural networks and remote sensing in the assessment of spring wheat infection by *Fusarium* head blight

Wiesław Golka¹, Edward Arseniuk², Adrian Golka³, Tomasz Góral⁴

¹ Instytut Technologiczno – Przyrodniczy, Falenty, Al. Hrabstwa 3, 05–090 Raszyn,

^{2,4} Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05–870 Błonie,

³ Relayonit sp. z o.o., ul. Cietrzewia 23, 02–492 Warszawa,

Celem prac badawczych było wykorzystanie teledetekcji oraz sztucznych sieci neuronowych w ocenie pszenicy jarej pod względem reakcji na fuzariozę kłosów wywoływaną przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. Prace badawcze wykonano na roślinach 4 odmian pszenicy jarej. Były to: KWS Torridon i Izera – o wyższej odporności, Radocha i Nawra – o odporności niższej na ww. patogena. Wykonano zdjęcia zdrowych oraz porażonych kłosów wszystkich odmian, które następnie przetworzono przy użyciu programu Crops Vegetation Control Lab (CVC Lab.). Na podstawie uzyskanych obrazów utworzono ich reprezentacje w postaci sieci neuronowych Growing Neural Gas (GNG). W wyniku analizy zdjęć uzyskano 240 wzorców, z których wybrano po 6 bazowych wzorców choroby dla każdej odmiany. Następnie dokonano porównania próbek porażonych kłosów danej odmiany z bazowymi wzorcami chorobowymi tej samej odmiany pszenicy. W wyniku porównania wzorców roślin zdrowych i porażonych ze zdjęciami poletek roślin zdrowych i porażonych uzyskano zróżnicowanie wartości liczbowych dającej podstawę do konstrukcji mapy zdrowotności plantacji pszenicy z wyszczególnieniem ognisk choroby.

Słowa kluczowe: fuzarioza kłosów, pszenica, sztuczne sieci neuronowe, teledetekcja

The aim of the research was to use remote sensing and artificial neural networks in the assessment of spring wheat in terms of response to infection of ears caused by fungi of the genus *Fusarium* spp. The research was carried out on plants of 4 varieties of spring wheat. They were: KWS Torridon and Izera - with higher resistance, Radocha and Nawra - with lower resistance to the pathogen. Pictures of healthy and infected ears of all varieties were taken, and then processed using the Crops Vegetation Control Lab (CVC Lab.) Program. Based on the obtained images, their representations in the form of Growing Neural Gas (GNG) neural networks were created. As a result of photo analysis, 240 patterns were obtained, out of which 6 basic disease patterns were selected for each variety. Next, a comparison of samples of infected ears of a given variety with baseline disease patterns of the same wheat variety was made. As a result of comparing healthy and diseased plant patterns with pictures of healthy and infested plant plots, a diversity of numerical values was obtained that gave rise to the construction of a wheat plantation map detailing spots with diseased plants.

Key words: *Fusarium* head blight, wheat, artificial neural networks, teledetection

Wstęp

W ostatnim 20-leciu nastąpił znaczny wzrost zainteresowania komputerową cyfrową analizą obrazu (DIA) oraz sztuczną inteligencją (AI). Zapewne ma to związek z olbrzymim postępem technicznym, jaki nastąpił w obszarach jakości i rozdzielczości sprzętu elektroniczno – optycznego, szybkości przesyłania danych, pojemności i mocy komputerów wykonujących obliczenia, oraz sztucznych sieci neuronowych mających m.in. zastosowanie w procesach identyfikacji obiektów. Wyniki badań jakie prowadzono w tych obszarach, zaczęto wdrażać do praktyki gospodarczej (Skulska i in. 2003). Początkowo obrazy z badanych obiektów

przesyłano do urządzeń analogowych i przetwarzano do postaci cyfrowej. Następnie obraz przesyłano do komputera i dokonywano jego analizy (Frączek 2005). Podobną metodą prowadzono badania bryły glebowej odkształcanej wąskim narzędziem (Piotrowska 2003), a także badania dotyczące identyfikacji efektów mieszania gleby w procesie powierzchniowej uprawy (Łukawski i Golka 2011). Zważywszy, że termin „sztuczne sieci neuronowe„ i model matematyczny neuronu pojawiły się w roku 1943 (Osowski 2000), a praca powodująca rozwój neuronowych sieci wielowarstwowych w roku 1986 (Rumelhart i McClelland 1986), czas „od pomysłu do przemysłu” był dość długi i był spowodowany oczekiwaniami

na dalszy postęp techniczny. Sztuczne sieci neuronowe (SSN) posiadają zdolność do aproksymacji wartości funkcji wielu zmiennych, w odróżnieniu od interpolacji możliwej przy przetwarzaniu algorytmicznym. Czyni to je niezastąpionymi przy wielu nierozwiązywalnych dotychczas zadaniach a obszar ich zastosowań jest bardzo rozległy, w tym również w rolnictwie. Około 2000 roku na rynku zaczęły się pojawiać aplikacje technik neuronowych dla rolnictwa. Wykorzystując neuronową technikę rozpoznawania obrazu, maszyny mogły wykonywać pracę bez ingerencji człowieka. Oto kilka przykładów: maszyna do wrywania chwastów, robot do monitoringu stanu pola i plonu, neurorobot do wykrywania oraz usuwania ślimaków, neurorobot czyszczący w budynkach inwentarskich (Boniecki 2005, Łuczycka 2016). W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił na tym obszarze znaczący postęp. Większość dużych firm produkujących dla rolnictwa, oferuje wraz ze swoimi maszynami, zaawansowane technicznie aplikacje technik neuronowych. Do mapowania pól uprawnych zatrudniono już obecnie różne konstrukcje dronów. Zwiększenie jakości optyki przy jednoczesnej obniżce cen rynkowych w najbliższym czasie pozwoli na uzyskanie zdjęć o rozdzielczości 1mm na punkt. Zdjęcia takie mają oczywiście olbrzymie rozmiary jako pliki, które muszą zostać poddane analizie. Z kolei, zdobywający popularność szybki internet mobilny LTE (Long Term Evolution) pozwala na ich transfer, a dyski SSD (solid-state drive) zapewniają miejsce dla danych i szybki do nich dostęp. Wszystko to wskazuje, że prognozy dotyczące zmian w rolnictwie precyzyjnym mają silne podstawy i w najbliższych latach możemy się spodziewać wielu ciekawych rozwiązań. Nastąpił zatem sprzyjający rozwojowi rolnictwa precyzyjnego czas robotyzacji rolnictwa. W ostatnich latach podjęto liczne prace nad zastosowaniem sztucznej inteligencji do planowania oprysków roślin środkami chemicznymi. Prace takie prowadzą m.in. John Deere, Bosch, Bayer, Blue River Technology. Celem badań jest prowadzenie oprysków ochronnych jedynie na fragmentach pól z porażonymi roślinami. Wykorzystanie sztucznych sieci neuronowych pozwala bowiem na identyfikację rozproszonych ognisk chorób na monitorowanych plantacjach. (Qiu i in. 2019, Jin i in. 2018, Yuan i in. 2014). Do obrazowania chorób roślin wykorzystywane są różne techniki takie jak obrazowanie hiperspektralne, obrazowanie fluorescencyjne, w podczerwieni i świetle widzialnym (Sankaran i in. 2010).

Występowanie i szkodliwość chorób pszenicy i pszenżyta

Najczęściej występującymi chorobami pszenicy w ostatnich latach były: rdza brunatna, mączniak prawdziwy, septorioza liści i plew, a także łamliwość źdźbła (Arseniuk i Góral 2015, Figueroa i in. 2018). W ostatnich latach wzrasta także znaczenie fuzariozy kłosów powodowanej przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp., co jest powiązane ze wzrostem powierzchni uprawy kukurydzy oraz monokulturą zbożową (72,1% w ogólnej powierzchni zasiewów w 2018 r.). Resztki poźniwe kukurydzy, która podatna jest na fuzariozę kłob są rezerwuarem inokulum grzybów *Fusarium* spp. porażającym pszenicę (Góral i in. 2015). Wzrasta również zagrożenie pszenżyta rdzą żółtą, dotychczas obserwowaną sporadycznie w uprawach pszenicy w Polsce. Przyczyną może być pojawienie się nowych agresywnych ras *Puccinia striiformis*, sprawcy tej choroby, oraz adaptacja patogena do wyższych temperatur występujących wiosną w Polsce (Hovmöller i in. 2015). Objawy rdzy żółtej obserwowane są przede wszystkim na liściach, ale występują również na plewach i ziarnie, szczególnie u pszenżyta. Do znacznych spadków plonu ziarna może prowadzić porażenie liścia flagowego u pszenicy lub kłosów u pszenżyta. Charakterystyczne dla rdzy żółtej jest występowanie w łanie pszenicy rozproszonych ognisk tej choroby, rozszerzających się w miarę postępu epifitozy.

Wzrasta znaczenie chorób wywoływanych przez patogeny nekrotroficzne do których należą grzyby z kompleksu *Parastagonospora* spp., *Zymoseptoria tritici* i inne grzyby porażające zielone organy roślin zbożowych. Gatunki te powodują chlorozy i nekrozy liści pszenicy i pszenżyta co na skutek degradacji chlorofilu prowadzi do ich przedwczesnego starzenia i zamierania. Powoduje to zmniejszenie powierzchni asymilacyjnej łanu skutkujące obniżeniem plonu. W sprzyjających warunkach grzyb *Parastagonospora nodorum* poraża kłosa prowadząc do spadku wartości siewnej ziarna. Znaczenie wywoływanej przez ten grzyb septoriozy liści i plew w uprawie pszenicy i pszenżyta wynika z niskiej lub średniej odporności na te choroby większości odmian uprawianych w Polsce (Arseniuk i in. 1991, Arseniuk i Góral 2015). Innym ujemnym efektem obserwowanym w ostatnich latach jest uodparnianie się grzyba *Zymoseptoria tritici* na niektóre substancje aktywne fungicydów np. fungicydów z grupy azoli (Dafne 250 EC) (Yang i in. 2013). Porażenie kłosów zbóż przez *Fusarium* spp. prowadzi do ilościowych i jakościowych strat

w plonie ziarna. Efektem fuzariozy kłosa może być uszkodzenie zarodka (wstrzymanie rozwoju ziarniaka) lub obniżenie masy ziarniaków, pomarszczenie, osłabienie siły kiełkowania, zasiedlenie ziarniaków przez *Fusarium* spp. oraz zakażenie miktotoksynami fuzaryjnymi. Grzyby z rodzaju *Fusarium* porażające zboża posiadają zdolność do wytwarzania trichotecenów (deoksyniwalenol= DON, niwalenol), moniliforminy, zearalenonu oraz fumonizyn. Trichoteceny nie są obojętne dla zdrowia ludzi i zwierząt. Odporne na procesy przetworcze mogą występować w artykułach żywnościowych i paszach produkowanych na bazie zbóż. Związki te mają silne działanie toksyczne objawiające się w postaci podrażnienia skóry, wymiotów, biegunki, osłabienia łaknienia, krwotoków. W przypadku silnych zatruc mogą występować zaburzenia neurologiczne, mogą prowadzić do poronień a nawet śmierci. Długotrwałe spożywanie przez ludzi DON-u i związków pochodnych zmniejsza odporność na choroby i osłabia system immunologiczny. Charakterystyczne dla fuzariozy kłosów jest występowanie w łanie pszenicy rozproszonych ognisk tej choroby w miejscach o sprzyjającym mikroklimacie np. obniżeniach terenu o większej wilgotności gleby (Niedbała i in. 2020, Arseniuk i Góral 2015, Góral i in. 2015, Prandini i in. 2009).

Charakterystyka metod stosowanych w cyfrowej analizie obrazu badanych obiektów

Uzyskane zdjęcia łanów roślin są podstawą do analizy histogramów długości fal, jak również do wyliczania na ich podstawie wskaźników pozwalających na ocenę zdrowotności upraw (Nieróbca i in. 2009, Pudełko i in. 2008, Alchanatis i in. 2005). Analiza spektrum światła widzialnego może służyć między innymi do wykrywania chwastów, np. w uprawach buraka cukrowego, ze skutecznością sięgającą 97% (Kazmi i in. 2014, Perez i in. 2000). W naszych badaniach zostały wykorzystane zarówno zdjęcia wykonywane w zakresie bliskiej podczerwieni jak i w zakresie światła widzialnego.

Proponowana metoda zakłada zastosowanie algorytmów grupowania danych (analiza skupień) w celu identyfikacji i oznaczenia próbek. Anomalie występujące w zbiorach wejściowych pozwalają na wytworzenie map wzorcowych, charakterystycznych dla badanych obiektów. W dalszej kolejności metoda pozwoli na ocenę zbioru testowego dzięki zastosowaniu algorytmów porównywania wielowymiarowych map wektorowych. Celem działania przyjętej metody jest rozpoznawanie zmian zdrowotnych roślin na podstawie wykonanych zdjęć. Najprostszym podejściem jest określenie

wskaźników opartych na obecności określonej długości fal w badanych próbkach. Metody identyfikacji roślin mogą również polegać na analizie ilościowej histogramów interpretowanych zdjęć w poszczególnych kanałach R, G, B dla światła widzialnego (Kazmi i in. 2014). W naszym podejściu, interpretacji poddane są dane ze zdjęć, przedstawione jako wielowymiarowe zbiory punktów opisanych w skali HSL (Hue, Saturation, Luminance). Pozwoliło to na precyzyjną identyfikację skupień danych charakterystycznych dla badanych defektów.

Skuteczna analiza danych wymaga zastosowania takiego sposobu klasyfikacji, który będzie jednocześnie wydajny i będzie pozwalał na porównywanie uzyskiwanych wyników z dużym zbiorem danych wzorcowych. Wśród metod klasyfikacji dużych zbiorów danych mamy do dyspozycji wiele nowoczesnych podejść, takich jak k-means, class method, SOM (Self – Organizing Map) czy GNG (Growing Neural Gas). O ile metoda k-means zakłada określenie liczby klas, na które dzielimy zbiór, który to parametr nie jest w badanym przypadku znany, to metody SOM i GNG nie determinują tej liczby. Ponadto w przypadku wybranego podejścia można interpretować zidentyfikowane klasy jako wielowymiarowe zbiory wektorów identyfikujące skupienia. Metoda GNG jest wydajniejsza i bardziej dokładna od metody SOM (Clary 2013). Istnieje wiele odmian i adaptacji metody GNG stosowanych w zależności od charakterystyki danych wejściowych lub będących udoskonaleniem metody, m.in. FGNG (Fast Growing Neural Gas) (Mendes i in. 2014), AING, AGiNG. Do naszych badań wybraliśmy implementację metody GNG.

Polska firma Relayonit, we współpracy z Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie, prowadzi od pewnego czasu prace nad zadaniem pod nazwą „SSN i teledetekcja w diagnostyce zdrowotności plantacji zbóż”. Celem pracy jest opracowanie innowacyjnego oprogramowania do wykrywania chorób pszenicy, pszenżyta i żyta w skali makro (łan), poprzez: utworzenie bazy danych wzorców chorób na podstawie wykonywanych zdjęć, utworzenie mapy przestrzennej upraw, określającej lokalizację oraz identyfikację chorób na podstawie bazy wzorców, wreszcie stworzenie systemu eksportowania wyników analizy pola w formatach używanych przez zautomatyzowane maszyny stosowane do precyzyjnego opryskiwania. Ponadto, celem prezentowanych badań było przetestowanie możliwości wykorzystania oprogramowania do analizy obrazu oraz sztucznych sieci neuronowych do detekcji oraz oceny nasilenia fuzariozy kłosów pszenicy.

Material i Metody

W badaniach założono poletka pszenicy i pszenżyta porażone następującymi chorobami: rdza żółta, rdza brunatna, mączniak prawdziwy, fuzarioza kłosów, septoriozy liści i plew, w stopniu umożliwiającym pozyskanie danych obrazowych o jakości umożliwiającej analizę obrazu i utworzenie bazy wzorców badanych chorób pszenicy i pszenżyta. W artykule ograniczono się do przedstawienia wyników badań polowych 4 odmian pszenicy jarej porażonych i nieporażonych fuzariozą kłosów. Odmiany różniły się poziomem odporności na fuzariozę kłosów (Góral i Walentyn-Góral 2018), a mianowicie odmiany Nawra i Radocha charakteryzowały się niższą odpornością na porażenie fuzariozą kłosów niż Izera i KWS Torridon. Zakres badań obejmował:

1. opracowanie metodyki wykonywania map porażenia z wykorzystaniem założenia bazy wzorców odmian bez objawów i z objawami porażenia.
2. opracowanie oprogramowania składającego się z modułów: przygotowywania i oznaczania wzorców; analizy zbioru testowego; zbierania i udostępniania danych poprzez ekstrakcję obszaru zidentyfikowanego, jako roślina z obrazu badanego (określenie m. in. parametrów obrazu), przygotowanie wzorców chorób reprezentowanych przez sieć neuronową (określenie liczby neuronów niezbędnej do zaobserwowania artefaktów występujących w zbiorach wejściowym i reprezentującym chorobę), parametryzację sieci neuronowej z zastosowaniem algorytmu genetycznego (uzyskania m.in. odchylenia sieci od badanego wzorca), ocenę zgodności sfotografowanej próbki z wzorcem choroby (określenie choroby rośliny), określenie formatu danych i stopnia ich kompresji pozwalającego na skuteczne działanie algorytmu.

Badania wykonano stosując następujące kroki:

1. pozyskanie obrazów RGB,
2. transformacja obrazów do skali HSL,
3. obliczenie wzorców w postaci sieci GNG (Growing Neural Gas),
4. obliczenie zgodności wzajemnej zbioru próbek w postaci sieci neuronowych GnG.

Ad 1.

Metoda polega na identyfikacji artefaktów występujących na roślinach, obserwowanych w spektrum światła widzialnego. Część objawów kwalifikowała się do rozpoznawania tą metodą,

część była trudniej rozpoznawalna. Skuteczność metody była wyższa jeżeli stosowana rozdzielczość zdjęć pozwalała na odróżnienie w pojedynczych pikselach artefaktów wyróżniających objawy chorobowe. Do robienia zdjęć użyto aparatu fotograficznego Canon EOS 60D.

Zdjęcia zostały wykonane w rozdzielczości 4000/3000 px z wysokości 2 metrów a następnie przetworzone w celu obniżenia rozdzielczości do 1mm powierzchni fotografowanej na piksel oraz oznaczone odmianą i oznaczeniem poletka doświadczalnego.

Ad. 2

Obrazy zapisane bez kompresji stratnej w formacie BMP, zostały przekonwertowane do formatu z ośmiobitową reprezentacją koloru (8 bitów/kolor). Przy pomocy oprogramowania dostarczonego nieodpłatnie przez firmę Andromeda CVC Lab (Crops Vegetation Control Lab), dokonano konwersji obrazów do skali HSL (Hue, Saturation, Luminance). Parametry H i S transponowano na skalę liczb naturalnych w zakresie 0–320. Parametr L – jasność, przekonwertowano na skalę 0–32, aby zmniejszyć znaczenie jasności punktów w przeprowadzonej analizie.

Ad. 3

Dla uzyskanych w kroku 2 próbek wytworzono reprezentacje w postaci sieci neuronowych GNG. Jako przestrzeń zbioru wejściowego zostały określone przestrzenie liczb rzeczywistych odpowiadające wcześniej przygotowanym parametrom HSL. Punktami próbkowania były pełne zbiory obrazów przekonwertowanych do skali HSL, a w trakcie treningu próbkowanie obrazu było dokonywane metodą losową z eliminacją powtórzeń dla punktów zbioru wejściowego, przy 40 iteracjach całego zbioru.

W wyniku klasyfikacji próbek uzyskano 240 wzorców, z których wyliczono wzorce bazowe dla każdego poletka na podstawie serii 10 zdjęć. W efekcie uzyskano 6 wzorców dla każdej odmiany (tabele 1–4).

Ad. 4

Wszystkie próbki dla których wytworzono reprezentację GNG w kroku 3, zostały potraktowane jako zbiór testowy. Dokonano dwóch analiz; porównania klasyfikacji w odniesieniu do wzorców tej samej odmiany pszenicy (tabele 1–4). Wyniki obliczane były metodą wyliczenia średniej dla sum odległości każdego kolejnego punktu zbioru badanego względem najbliższego punktu zbioru

wzorcowego, gdzie jako odległość rozumiemy odległość sferyczną w trójwymiarowej przestrzeni liczb rzeczywistych (dla zbiorów przygotowanych jak w pkt 2).

Wyniki i Dyskusja

W tabelach 1–4 przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych dla 4 odmian pszenicy jarej. Wartości w tabelach, to rzeczywiste dane wynikowe

z analizy z wykorzystaniem oprogramowania CVC Lab. Są to sumy odchyleń wektorowych pomiędzy najbliższymi neuronami w przestrzeni 3 wymiarów. Każdy wzorec i próbka reprezentowane są przez 1000 neuronów sieci. Wszystkie zdjęcia były robione w tym samym okresie wegetacyjnym, na wykłoszonych odmianach pszenicy. Mniejsze wartości liczb wskazują na większą zgodność próbek z przyjętymi wzorcami.

Tabela 1.
Table 1

Wyniki badań zgodności próbek z wzorcami dla pszenicy jarej "Izera".
Results of tests for compliance of samples with standards for spring wheat variety "Izera".

L.p.	Wzorce Izera Próbka K			L.p.	Wzorce Izera Próbka P		
	K	P1	P2		K	P1	P2
1.	3583	4429	4550	11.	3778	3513	3498
2.	3727	4209	4425	12.	4301	3698	3434
3.	3443	3840	3959	13.	3832	3336	3318
4.	3420	3931	4200	14.	3715	3103	3241
5.	3390	4034	4240	15.	3902	3439	3392
6.	3532	4771	4809	16.	4202	3632	3689
7.	3419	4500	4588	17.	4490	3702	3899
8.	3533	4623	4693	18.	3990	3514	3353
9.	3442	3994	4311	19.	4302	3366	3464
10.	3407	4021	4593	20.	4655	3523	3478
\bar{x}	3490	4235	4437	\bar{x}	4117	3480	3477
σ	100	306	246	σ	304	176	181

\bar{x} - średnia arytmetyczna;
 σ - odchylenie standardowe

Oznaczenia:

W kolumnach poletka wzorcowe: K-roślin zdrowych, P1 i P2 – roślin porażonych fuzariozą,
w wierszach – próbki porównywane: roślin zdrowych (próbka K) i roślin porażonych (próbka P).

Tabela 2
Table 2

Wyniki badań zgodności próbek z wzorcami dla pszenicy jarej „Nawra”.
Results of tests for compliance of samples with standards for spring wheat variety “Nawra”.

L.p.	Wzorce Nawra Próbka K			L.p.	Wzorce Nawra Próbka P		
	K	P1	P2		K	P1	P2
1.	3530	8801	9206	11.	8576	3738	3545
2.	3619	9112	10893	12.	8950	3851	3389
3.	3610	9179	9548	13.	10668	3584	3586
4.	3417	8923	10201	14.	11404	3939	3684
5.	3418	8826	9978	15.	9289	3554	3246
6.	3351	10216	10458	16.	10148	3614	3653
7.	3572	9282	10168	17.	9109	3723	3702
8.	3624	8781	10662	18.	9065	3769	3290
9.	3549	9039	9644	19.	10142	3625	3346
10.	3433	8885	9744	20.	9282	3775	3254
\bar{x}	3512	9104	10050	\bar{x}	9663	3717	3469
σ	94	404	502	σ	845	117	174

Tabela 3
Table 3

Wyniki badań zgodności próbek z wzorcami dla pszenicy jarej "Radocha".
Results of tests for compliance of samples with standards for spring wheat variety "Radocha".

L.p.	Wzorce Radocha			L.p.	Wzorce Radocha		
	Próbka K				Próbka P		
	K	P1	P2		K	P1	P2
1.	3399	9988	9203	11.	8576	3738	3409
2.	3689	10933	10807	12.	8950	3851	3589
3.	3489	9633	9477	13.	10668	3940	3468
4.	3523	9684	10237	14.	11404	3799	3333
5.	3254	10602	9705	15.	10465	3626	3652
6.	3595	10113	10634	16.	9989	3830	3557
7.	3307	10060	10282	17.	9237	3869	3651
8.	3306	9818	9531	18.	9301	3787	3658
9.	3652	10087	10060	19.	9318	3606	3403
10.	3293	10568	9813	20.	10548	3885	3648
\bar{x}	3485	10149	9975	\bar{x}	9846	3793	3537
σ	152	403	494	σ	858	103	117

Tabela 4
Table 4

Wyniki badań zgodności próbek z wzorcami dla pszenicy jarej „KWS Torridon”.
Results of tests for compliance of samples with standards for spring wheat variety “KWS Torridon”.

L.p.	Wzorce KWS Torridon			L.p.	Wzorce KWS Torridon		
	Próbka K				Próbka P		
	K	P1	P2		K	P1	P2
1.	3338	4826	3866	11.	6727	3796	4059
2.	3317	4711	4441	12.	7317	4059	3757
3.	3892	5229	4811	13.	5218	4218	4181
4.	3629	5049	4766	14.	6136	3962	3998
5.	3406	5064	4503	15.	6370	3848	3833
6.	3456	5015	4688	16.	5826	4218	3994
7.	3523	5075	4434	17.	6082	4223	4023
8.	3362	4956	4464	18.	6272	4212	3738
9.	3383	5134	4780	19.	6337	3859	4045
10.	3637	5038	4243	20.	5907	3868	3979
\bar{x}	3494	5100	4500	\bar{x}	6219	4026	3961
σ	171	320	275	σ	528	170	134

W tabeli 1, porównując z wzorcami roślin zdrowych (próbka K) zdjęcia roślin porażonych, uzyskujemy wyraźnie wyższe wartości liczb dla poletek wzorcowych P1 i P2 od liczb uzyskanych dla poletka wzorcowego K. W pierwszym przypadku są to średnie 4235 oraz 4437 w drugim średnia 3490 przy odchyleniach standardowych od wartości średniej w granicach 2 – 5%. Porównując z wzorcami roślin porażonych (próbka P) zdjęcia roślin porażonych, uzyskano niższe wartości liczb (średnie 3480 i 3477) niż dla zdjęć roślin zdrowych (średnia 4117 przy odchyleniu standardowym 5 – 7%). Wyniki

zbliżone uzyskano dla pszenicy KWS Torridon. Przy porównaniu zdjęć roślin zdrowych z wzorcami roślin porażonych oraz roślin porażonych z wzorcami roślin zdrowych, znacznie większe wartości uzyskano dla odmian Nawra i Radocha. Wynika to ze zróżnicowanej odporności badanych odmian pszenicy na porażenie i jest zgodne z oczekiwaniami. Znaczone różnice są widoczne na zdjęciach zdrowych i porażonych roślin odmiany Nawra (Rys. 1–2). Z kolei, nieznaczne różnice są zauważalne na zdrowych i porażonych roślinach odmiany Izera (Rys. 3–4).



Rys. 1. Pszenica jara odmiana 'Nawra' zdrowa
Fig. 1. Spring wheat variety 'Nawra' healthy



Rys. 2. 'Nawra' porażona
Fig. 2. 'Nawra' FHB infected



Rys. 3. Pszenica jara odmiana 'Izera' zdrowa
Fig. 3. Spring wheat variety 'Izera' healthy



Rys. 4. Izera porażona
Fig. 4. 'Izera' FHB infected

Zdjęcia były wykonywane na polkach o różnym stopniu porażenia fuzariozą kłosów. Rośliny porażone, nie były usytuowane na polkach równomiernie i różna była ich liczba. Wyniki badań dla poszczególnych wzorców były zbliżone. Zmienność badanych populacji była niska i wahała się w granicach od 3 do 10%.

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykrywania w łanach pszenicy obszarów roślin porażonych fuzariozą kłosów, przy pomocy użytego w badaniach programu CVC Lab. Można przypuszczać, że podobne wyniki zostaną otrzymane w badaniach pszenicy i żyta. Wymaga to jednak

przeprowadzenia rozszerzonych badań z zachowaniem przyjętej metodyki. Należałoby również przeprowadzić badania uwzględniając inne dość powszechnie występujące choroby pszenicy takie jak: rdza żółta, rdza brunatna, mączniak prawdziwy, septorioza liści i plew. Pozytywne wyniki badań pozwolą na sporządzanie map zdrowotności plantacji pszenicy i ewentualnie innych zbóż. Umożliwi to wprowadzenie precyzyjnych oprysków plantacji fungicydami, a co za tym idzie, ograniczenie ich zużycia ze wszystkimi wynikającymi stąd pozytywnymi następstwami opisanymi w pracach Moshou i in., (2011) oraz Song i in. (2015).

Wprowadzenie opisanej w tych badaniach technologii ochrony zbóż przed chorobami, wymaga też specjalistycznego sprzętu do robienia odpowiedniej jakości zdjęć badanych plantacji (Kurkute 2018). Mowa tutaj o specjalistycznym dronie wiatrakowcu, wyposażonym w nowoczesne urządzenia techniczne do badań teledetekcyjnych, bardzo wydajne i spełniające wymagania przedstawionej technologii. Uzyskane mapy zdrowotności plantacji zbóż, mogą być wykorzystywane przez aktualnie produkowane supernowoczesne opryskiwacze naziemne, jak też wysokiej jakości drony – multikoptery nadziemne. Potrzebne są też prace nad wykorzystaniem inteligentnej wymiany informacji przez drony w ramach tzw. „roju” dronów do lepszej analizy obszarów o dużej powierzchni. Należy nadmienić, że obecnie demonstrację „roju” dronów przeprowadziły dwa państwa – Chiny oraz USA (Wei i in. 2013). Wykorzystanie „roju” dronów umożliwia jednoczesne skrócenie czasu wykonania zabiegu na tym samym lub większym obszarze, co w przypadku oblotu pól uprawnych zmniejszy czas wykonywania zabiegów ochronnych.

W podsumowaniu należy podkreślić konieczność prowadzenia badań i prac rozwojowych od monitoringu stopnia porażenia plantacji roślin uprawnych, w tym zbóż, chorobami do wykonania zabiegów ochronnych. Wyniki takich prac wniosą wkład w opracowanie kompleksowej technologii ochrony zdrowotności plantacji zbóż z udziałem sztucznych sieci neuronowych i teledetekcji, łącznie z analizą ekonomiczną przedsięwzięcia.

Wnioski

1. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykrywania w łanach pszenicy obszarów roślin porażonych fuzariozą kłosów, przy pomocy użytego w badaniach programu CVC Lab.
2. Przy porównaniu zdjęć roślin zdrowych z wzorcami roślin porażonych oraz roślin porażonych z wzorcami roślin zdrowych, znacznie większe wartości uzyskano dla odmian Nawra i Radocha.
3. Zróżnicowanie wartości liczbowych uzyskanych z porównania wzorców roślin zdrowych i porażonych ze zdjęciami poletek roślin zdrowych i porażonych, pozwala na tworzenie map zdrowotności plantacji roślin zbożowych.
4. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania sztucznych sieci neuronowych i teledetekcji w precyzyjnej i tańszej ochronie plantacji zbóż środkami chemicznymi.
5. Zastosowane w niniejszej pracy technologie bliskiej teledetekcji i sztucznych sieci neuronowych mogą być wykorzystane do tworzenia map zdrowotności zbóż porażonych innymi chorobami, takimi jak: rdza brunatna, rdza żółta, mączniak prawdziwy, septorioza liści i plew, a także łamliwość źdźbła.

Literatura

- Alchanatis V., Ridet L., Hetzroni A., Yaroslavsky L. 2005. Weed detection in multi-spectral images of cotton fields. *Computers and Electronics in Agriculture* 47: 243 — 260.
- Arseniuk E., Góral T. 2015. Triticale Biotic Stresses – Known and Novel Foes, In *Triticale*, pp. 83 — 108. Ed F. Eudes. Cham: Springer International Publishing.
- Arseniuk E., Fried P.M., Winzeler H., Czembor H.J. 1991. Comparison of resistance of triticale, wheat and spelt to septoria nodorum blotch at the seedling and adult plant stages. *Euphytica* 55: 43 — 48.
- Boniecki P. 2005. Wykorzystanie technik neuronowych w praktyce rolniczej. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 50: 10 — 14.
- Clary K., 2013. A Comparison of the Self-Organizing Map and Growing Neural Gas Network in the Context of Optical Character Recognition. Department of Computer Science and Mathematics, Hendrix College, AR, USA: 3 pp.
- Figuroa M., Hammond-Kosack K.E. Solomon P.S. 2018. A review of wheat diseases — a field perspective. *Mol. Plant Pathol.* 19: 1523 — 1536.
- Frączek J. 2005. Cyfrowa analiza obrazu w technice rolniczej, *Inżynieria Rolnicza* 6, 149 — 157.
- Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral, D., Belter J., Majka M., Kwiatek M., Wiśniewska H. 2015. Odporność genotypów pszenicy ozimej na fuzariozę kłosów i akumulację toksyn fuzaryjnych w ziarnie scharakteryzowana za pomocą różnych typów odporności. *Biuletyn IHAR* 276: 19 — 37.
- Góral T., D. Walentyn-Góral 2018. Zróżnicowanie podatności odmian pszenicy ozimej i jarej na fuzariozę kłosów badanych w latach 2009–2016. *Komunikat. Biuletyn IHAR* 284: 3 — 11.
- Hovmöller M.S., Walter S., Bayles R.A., Hubbard A., Flath K., Sommerfeldt N., Leconte M., Czembor P., Rodriguez-Algaba J., Thach T., Hansen J.G., Lassen P., Justesen A.F., Ali S., de Vallavieille-Pope C. 2015. Replacement of the European wheat yellow rust population by new races from the centre of diversity in the near-Himalayan region. *Plant Pathology* 65: 402 — 411.
- Jin X., Jie L., Wang S., Qi H.J., Li S.W. 2018. Classifying wheat hyperspectral pixels of healthy heads and Fusarium head blight disease using a deep neural network in the wild field. *Remote Sensing* 10: 395.

- Kazmi W., Foix S., Alenyà G., Andersen H.J. 2014. Indoor and outdoor depth imaging of leaves with time-of-flight and stereo vision sensors: Analysis and comparison. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* 88: 128 — 146.
- Kurkute S.R. 2018. Drones for Smart Agriculture: A Technical Report. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, 6: 341 — 346.
- Łuczycza D. 2016. Rolnictwo XXI wieku – problemy i wyzwania. ISBN 978–83–945311–0–2: 378
- Łukawski R., Golka W., 2011. Identyfikacja efektu mieszania gleby w procesie powierzchniowej uprawy z wykorzystaniem dynamicznej analizy obrazu 3D. *Problemy Inżynierii Rolniczej* 2: 55 — 64.
- Mendes C.A.T., Gattass M., Lopes H., 2014. FGNG: A fast multi-dimensional growing neural gas implementation. *Neurocomputing* 128: 328 — 340.
- Moshou D., Bravo C., Oberti R., West J.S., Ramon H., Vougioukas S., Bochtis D. 2011. Intelligent multi-sensor system for the detection and treatment of fungal diseases in arable crops. *Biosystems Engineering* 108: 311 — 321.
- Niedbała G., Kurasiak-Popowska D., Kinga Stuper-Szablewska K. and Jerzy Nawracała, 2020. Application of Artificial Neural Networks to Analyze the Concentration of Ferulic Acid, Deoxynivalenol, and Nivalenol in Winter Wheat Grain. *Agriculture* 10: 127; doi: 10.3390/agriculture10040127.
- Nieróbca A., Pudełko R., Kozyra J. 2009. Zastosowanie zdalnych metod w analizie zachwaszczenia pól testowych. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 49: 1622 — 1629.
- Osowski S. 2000. Sieci neuronowe do przetwarzania informacji. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- Perez A.J., Lopez F., Benlloch J.V., Christensen S. 2000. Colour and shape analysis techniques for weed detection in cereal fields. *Computers and Electronics in Agriculture* 25: 197 — 212.
- Piotrowska E. 2003. Badania filmowe bryły glebowej odkształcanej przez wąskie narzędzie uprawowe. *Inżynieria Rolnicza* 11: 173 — 178.
- Prandini A., Sigolo S., Filippi L., Battilani P., Piva G. 2009. Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food Chem Toxicol.* 47: 927 — 31.
- Pudełko R., Kozyra J., Nieróbca A. 2008. Identification of the intensity of weeds in maize plantations based on aerial photographs. *Zemdirbyste-Agriculture*, 95: 130 — 134.
- Qiu R., Yang C., Moghimi A., Zhang M., Steffenson B. 2019. Detection of Fusarium Head Blight in Wheat Using a Deep Neural Network and Color Imaging. *Remote Sensing* 11: 2685.
- Rumelhart D., J.L. McClelland, the PDP Research Group. 1986. *Parallel Distributed Processing: explorations in the microstructure of cognition*. MIT Press, Cambridge.
- Sankaran S., Mishra A., Ehsani R., Davis C. 2010. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computers and Electronics in Agriculture* 72 1 — 13.
- Skulska M., Skulska M., Makowski Ł. 2003. Zastosowanie sieci neuronowych. Wydawca: Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Tarnobrzegu: 8 str.
- Song Y., Sun H., Li M., Zhang Q. 2015. Technology Application of Smart Spray in Agriculture: A Review. *Intelligent Automation and Soft Computing* 21: 319 — 333.
- Wei Y., Blake M.B., Madey G.R. 2013. An operation-time simulation framework for UAV swarm configuration and mission planning. In: *Proceedings of the International Conference on Computational Science, ICCS 2013, Barcelona, Spain, 5 — 7 June, 2013*, pp. 1949 — 1958.
- Yuan L., Zhang J., Shi Y., Nie C., Wei L., Wang J. 2014. Damage mapping of powdery mildew in winter wheat with high-resolution satellite image. *Remote Sensing*, 6: 3611 — 3623.
- Yang L., Gao F., Shang L., Zhan J., McDonald B. A. 2013. Association between virulence and triazole tolerance in the phytopathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE* 8(3): e59568. doi:10.1371/journal.pone.00595.

Ocena przydatności loci barkodowych do identyfikacji gatunków roślin łąk i muraw kserotermicznych. Komunikat

Barcoding loci usefulness for the identification of Polish meadow and xerothermophilous sward plant species. Short communication

Maja Boczkowska^{1,2}, Anna Rucińska¹, Marcin Olszak¹, Arkadiusz Nowak^{1,3}

¹ Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – Centrum Różnorodności Biologicznej w Powsinie, 02-976 Warszawa, Polska,

² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, Polska,

³ Instytut Biologii, Uniwersytet Opolski, 45-052 Opole, Polska,

✉ e-mail: m.boczkowska@ihar.edu.pl

Analiza sekwencji kilku *loci* nosząca nazwę barkodingu, została wykorzystana do identyfikacji gatunków roślin występujących w środkowoeuropejskich zbiorowisk traworoślowych. W toku analizy przebadano użyteczność 14 regionów chloroplastowych i jednego jądrowego do identyfikacji gatunków. Osiem spośród nich (*matK*, *rbcl*, *rpoCl*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *trnL*, *psbI-psbK* i *ITS*) wykorzystano do stworzenia kombinacji barkodów, które umożliwiają określenie tożsamości próbki tkanki roślinnej o pochodzeniu łąkowym, bez konieczności porównania z kluczem do oznaczania roślin.

Słowa kluczowe: barkoding, *matK*, *rbcl*, *rpoCl*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *trnL*, *psbI-psbK*, *ITS*, traworośla

Barcoding analysis of the sequence of several loci was used to identify plant species that compose the Central European graminoid communities. During the analysis, the usefulness of 14 chloroplast regions and one nuclear region for species identification was investigated. Eight of these (*matK*, *rbcl*, *rpoCl*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *trnL*, *psbI-psbK* and *ITS*) were used to construct a combination of barcodes that will allow a determination of the taxonomic identity of a sample of plant tissue of meadow origin, without the need of utilising standard determination keys based on morphological characters.

Key words: barkoding, *matK*, *rbcl*, *rpoCl*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *trnL*, *psbI-psbK*, *ITS*

Wstęp

Poprawna identyfikacja gatunków jest problemem, z którym naukowcy borykają się od wieków. Ustalenie tożsamości taksonomicznej na podstawie plastycznego fenotypu, który może ulegać zmianom m. in. w toku ontogenezy czy pod wpływem środowiska, wymaga szerokiej wiedzy, doświadczenia i czasu. W dzisiejszym świecie, niejednokrotnie to właśnie czas jest czynnikiem, który najbardziej limituje prace naukowe. Na początku XXI wieku opracowana została metoda oznaczania gatunku na podstawie sekwencji jednego lub kilku *loci* (Hebert i in., 2003). Metoda ta została nazwana barkodingiem (ang. *barcoding*) przez analogię do wszechobecnych kodów paskowych identyfikujących rozmaite obiekty (ang. *bar code*). Sekwencje wykorzystywane w tej metodzie muszą spełniać kilka warunków. Efektywność ich amplifikacji w reakcji PCR

(ang. *polymerase chain reaction*) musi być na tyle wysoka, aby dało się ją przeprowadzić z niewielkiej ilości tkanki. W związku z tym powinny być obecne w genomie w wielu kopiach. Ponadto *loci* diagnostyczne muszą być oflankowane silnie konserwatywnymi sekwencjami, tak aby możliwe było wykorzystanie uniwersalnych starterów w reakcji PCR niezależnie od badanego gatunku. *Locus* wykorzystywane w barkodingu musi jednocześnie wykazywać wysoką zmienność na poziomie międzygatunkowym i niską zmienność wśród osobników reprezentujących ten sam gatunek (Mirek i in., 2007).

Grupa robocza działająca w ramach Consortium for the Barcode of Life (CBOL, 2009), które zajmuje się opracowaniem standardu dla identyfikacji molekularnej w świecie roślin, zalecała aby wykorzystywać w tym celu sekwencje znajdujące się w obrębie genomu plastydowego.

Genom mitochondrialny, który wykorzystywany jest powszechnie w identyfikacji zwierząt i grzybów, został odrzucony ze względu na występowanie w jego obrębie częstych rearanżacji i horyzontalnego transferu genów między mitochondrium i jądrem komórkowym (Hebert i in. 2003, Kress i in. 2015).

Za sprawą rozwoju technologii sekwencjonowania następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*), dzięki któremu możliwa jest równoległa i równoczesna analiza sekwencji wielu *loci*, powstała technika jednoczesnej identyfikacji wielu gatunków np. w próbkach środowiskowych. Początkowo, stosowana była ona jedynie do wykrywania mikroorganizmów (Sogin i in. 2006). W kolejnych latach technika ta została zaadaptowana do identyfikacji organizmów eukariotycznych (Porazinska i in. 2010; Kowalczyk i in. 2011; Raye i in. 2011; Brown i in. 2012; Fouts i in. 2012; Hiiesalu i in. 2012). Warunkiem koniecznym do identyfikacji gatunku w próbach środowiskowych jest jednak odpowiednie nasycenie publicznie dostępnych baz danych wiarygodnymi sekwencjami wielu *loci* barkodowych.

Celem prezentowanych badań była ocena przydatności *loci* barkodowych do identyfikacji gatunków występujących w środkowoeuropejskich zbiorowiskach traworoślowych. Wytypowane w toku analizy *loci* zostaną wykorzystane w dalszych badaniach do oceny podziemnej różnorodności fitocenozy traworoślowych w Polsce.

Material i Metody

Materiał badawczy stanowiło 176 gatunków roślin typowych dla zbiorowisk traworoślowych, z czego 118 odnotowano w czasie wykonywania spisów florystycznych na trzech stanowiskach: Nowa Wieś Królewska (*Calthion palustris*; łąka bagienna), Opole-Kolonia Goślawicka (*Arrhenatherion elatioris*, łąka świeża) i Gogolin (*Mesobromion*, murawa kserotermiczna). DNA izolowano z młodych liści pojedynczych osobników o potwierdzonej tożsamości taksonomicznej przy użyciu komercyjnego zestawu Genomic Mini AX Plant (A&A Biotechnology) lub metody CTAB (Murray i Thompson, 1980) z modyfikacją autorską.

Do wytypowania regionów diagnostycznych dla każdego z gatunków posłużono się bazami danych NCBI i CBOL (Coordinators NCBI, 2017; CBOL, 2009). Sekwencje starterów do wybranych regionów pochodziły z danych literaturowych (Tab. 1). Reakcję PCR przeprowadzono z użyciem wysoce specyficznej polimerazy KAPA HiFi PCR Kit (Roche). Skład reakcji i profil temperaturowy zoptymalizowano osobno dla każdej pary starterów

wykorzystując dane literaturowe zamieszczone w Tabeli 1. Reakcję sekwencjonowania metodą Sanger'a wykonywano z użyciem zestawu Bright-Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit (MCLAB). Rozdział fragmentów przeprowadzono w 3130xl Genetic Analyzers (Applied Biosystem) przy użyciu kapilar o długości 36 cm wypełnionych polimerem NanoPOP-7™ (MCLAB). Wyniki opracowywano przy użyciu FinchTV 1.4 software (Geospiza, Inc., Seattle, WA) i BioEdit (Hall i in., 2011).

Wyniki i Dyskusja

Na podstawie danych literaturowych wytypowano 14 regionów chloroplastowych i jeden jądrowy (Tab. 1), dla których przetestowano łącznie 45 par starterów. Podstawowym kryterium oceny starterów była efektywność amplifikacji pojedynczego fragmentu w jak największej liczbie gatunków. Najwięcej par starterów przetestowano dla regionu genomowego tj. niekodującej domeny *ITS* (ang. *Internal Transcribed Spacer*) występującej w obrębie genów rybosomalnego DNA (rDNA) i chloroplastowego regionu *matK* kodującego enzym maturazę K (Tab. 1). W przypadku dwóch regionów: *trnK* intron i *atpF* intron, mimo wielu prób optymalizacji, nie udało się uzyskać satysfakcjonującej jakości amplikonów dla wszystkich analizowanych gatunków roślin. Spośród 45 kombinacji par starterów ponad 30% generowało złożone wzory prążkowe reakcji PCR, czyli amplifikowało fragmenty niespecyficzne. W takich przypadkach uzyskanie informacji na temat specyficznej gatunkowo sekwencji DNA wiązałoby się z koniecznością izolacji właściwego fragmentu po rozdziale elektroforetycznym z żelu agarozowego. Ze względu na niewspółmierny do uzyskiwanych efektów nakład pracy, te pary starterów zostały odrzucone z dalszej analizy. Kolejne 14 par nie wykazywało uniwersalności w stosunku do części analizowanych gatunków, przez co nie zostały zakwalifikowane do dalszych badań. Udało się jednak z sukcesem wytypować z pozostałej grupy sześć par starterów, gwarantujących uzyskanie amplikonów spełniających kryteria regionów barkodowych, amplifikujących regiony genomu chloroplastowego tj.: *matK*, *rbcl*, *rpoCl*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *trnL* i *psbI-psbK* oraz jądrowego *ITS* (Tab. 1). Dla tych regionów w obrębie wytypowanej grupy gatunków roślin amplifikowano produkty o długości od 300 do 900 par zasad. Poszczególne regiony charakteryzowały się różną efektywnością w weryfikacji przynależności taksonomicznej, przy czym regiony takie jak *trnH-psbA*, *trnL* czy *ITS* pozwoliły na identyfikację do poziomu gatunkowego. Najniższa zmienność

sekwencji DNA charakteryzowała region *rbcL*, leżący w obrębie sekwencji kodującej dużą podjednostkę karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO), enzymu związanego z ciemną fazą fotosyntezy (Parry i in., 2003). Zmienność tej sekwencji związana była niemalże wyłącznie z obecnością polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) (Rys. 1a). Locus *trnL* wykazywał średni poziom zróżnicowania, a obserwowana zmienność między gatunkami miała zarówno charakter mutacji typu SNP jak i insercji i delecji (In/Del) (rys. 1b). Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi, w których ten niekodujący region (intron) chloroplastowy nie jest uważany za wystarczająco zmienny do identyfikacji taksonów (Shaw i in., 2005). Największą rozdzielczość spośród analizowanych loci chloroplastowych odnotowano w przypadku regionu zlokalizowanego pomiędzy genami *trnH* i *psbA*. W regionie tym obserwowano zarówno mutacje typu SNP jak i obecność dużej liczby In/Del, których położenie i długość wykazywała dużą zmienność (rys. 1c). Użyteczność tego regionu potwierdzają liczne wcześniejsze prace badawcze m. in. Kress i in. (2005) i Shapcott i in. (2015). Zestawienie wszystkich uzyskanych sekwencji DNA pozwoliło na poprawną identyfikację taksonomiczną analizowanych gatunków. Tym samym wytypowano dla każdego gatunków sekwencje DNA dla min. trzech regionów barkodowych. Nieskuteczność identyfikacji taksonomicznej roślin przy użyciu pojedynczego locus barkodowego zauważono już na wstępie przystosowywania tej metody do analizy świata roślin. Różne grupy badawcze sugerowały różnorodne, efektywne w identyfikacji zestawy loci diagnostycznych. Kress i in. (2005) wskazywali na dwa niekodujące regiony (jądrowy obszar *ITS* i chloroplastowy *trnH-psbA*). Natomiast w kolejnej pracy Kress i Erickson (2007) jako regiony odpowiednie do barkodingu u roślin rekomendowali *rbcL* i *trnH-psbA*. Shapcott i in. (2015, 2017) wykorzystywali w badaniach lasów deszczowych Australii trzy regiony (*rbcL*, *matK*, i *trnH-psbA*). Z kolei Braukmann i in. (2017) do identyfikacji roślin naczyniowych w Kanadzie wykorzystali *rbcL*, *matK* i *ITS2*. Obecnym standardem w aplikacji metody barkodignu dla gatunków roślin jest wykorzystanie sekwencji DNA kilku regionów jednocześnie. Wytypowanie tych regionów wymaga jednak przeprowadzenia wstępnej analizy wielu loci pod kątem ich użyteczności dla wybranej grupy obiektów. Uzyskane w ramach niniejszej pracy sekwencje DNA wytypowanej grupy gatunków roślin stanowią podstawę do weryfikacji składu gatunkowego zbiorowisk łąkowych.

Część wyników została zaprezentowana podczas Konferencji Dni Młodego Naukowca w 2019 r. w Radzikowie.

Literatura

- Braukmann TWA., Kuzmina ML., Sills J., Zakharov EV., Hebert PDN. 2017. Testing the efficacy of DNA barcodes for identifying the vascular plants of Canada. *PLoS ONE*; 12(1): e0169515.
- Brown DS., Jarman SN., Symondson WO. 2012. Pyrosequencing of prey DNA in reptile faeces: analysis of earthworm consumption by slow worms. *Mol Ecol Res*; 12: 259-266
- CBO Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci*; 106, 12794-12797.
- Coordinators NCBI Resource., 2017. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res*; 45: D12-D17.
- Cox CJ., Goffinet B., Shaw AJ., Boles SB. 2004. Phylogenetic relationships among the mosses based on heterogeneous Bayesian analysis of multiple genes from multiple genomic compartments. *Syst Bot*; 29: 234-250.
- Cuénoud P., Savolainen V., Chatrou L. W., Powell M., Grayer R. J., Chase M. W. 2002. Molecular phylogenetics of *Caryophyllales* based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *Am J Bot*; 89: 132-144
- Demaio PH., Barfuss MHJ., Kiesling R., Till W., Chiappella JO. 2011. Molecular phylogeny of *Gymnocalycium* (*Cactaceae*): assessment of alternative infrageneric systems, a new subgenus, and trends in the evolution of the genus. *Am J Bot*; 98: 1841-1854.
- Dobeš C., Mitchell-Olds T., Koch M. 2004. Extensive chloroplast haplotype variation indicates Pleistocene hybridization and radiation of North American *Arabis drummondii*, *A. divaricarpa*, and *A. holboellii* (*Brassicaceae*). *Mol Ecol*; 13: 349-370.
- Dong W., Xu C., Li C., Sun J., Zuo Y., Shi S. i in. 2015. *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Sci Rep*; 5, 8348.
- Fazekas AJ., Burgess KS., Kesanakurti PR., Graham SW., Newmaster SG., i in. 2008. Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. *PLoS ONE*; 3(7): e2802
- Ford CS., Ayres KL., Toomey N., i in. 2009 Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Bot J Linn Soc*; 159:1-11
- Fouts DE., Szpakowski S., Purushe J., Torralba M., Waterman RC., MacNeil MD., Alexander LJ., Nelson KE. 2012. Next Generation Sequencing to Define Prokaryotic and Fungal Diversity in the Bovine Rumen. *PLoS One*; 7: e48289.
- Hall, T., Biosciences, I., Carlsbad, C., 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*; 2: 60-61.

- Hamilton MB. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol Ecol*; 8: 521–523.
- Hebert PD., Cywinska A., Ball SL., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Royal Soc London B: Biol Sci*; 270, 313–321.
- Hiiesalu I., Opik M., Metsis M., Lilje L., Davison J., Vasar M., Moora M., Zobel M., Wilson SD., Partel M., 2012. Plant species richness belowground: higher richness and new patterns revealed by next-generation sequencing. *Mol Ecol*; 21: 2004–2016.
- Kowalczyk R., Taberlet P., Coissac E., Valentini A., Mique C., Kamiński T., Wójcik JM. 2011. Influence of management practices on large herbivore diet—Case of European bison in Białowieża Primeval Forest (Poland). *For Ecol Manag*; 261: 821–828.
- Kress WJ., Erickson DL. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*; 2(6): e508.
- Kress WJ., García-Robledo C., Uriarte, M., Erickson D. L., 2015. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends Ecol Evol*; 30, 25–35.
- Kress WJ., Wurdack KJ., Zimmer EA., Weigt LA., Janzen DH. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 8369–8374.
- Lahaye R., Van der Bank M., Bogarin D., Warner J., Pupulin F., Gigot G. i in. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105: 2923–2928.
- Moorhouse-Gann RJ., Dunn JC., Vere N., Goder M., Cole N., Hipperson H., Symondson WOC. 2018. New universal *ITS2* primers for high-resolution herbivory analyses using DNA metabarcoding in both tropical and temperate zones. *Sci Rep*; 8: 2914.
- Mirek, Z., Bieniek, W., Sztorc, A., 2007. Barkoding DNA—nowe narzędzie do opisu bioróżnorodności. *Wiad Bot*; 51: 41–50.
- Murray, MG., Thompson, WF., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*; 8: 4321–4326.
- Parry MA., Andralojc PJ., Mitchell RA., Madgwick PJ., Keys AJ. 2003. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *J Exp Bot*; 386: 1321–1333.
- Porazinska DL., Giblin-Davis RM., Esquivel A., Powers TO., Sung W., Thomas WK. 2010. Ecometagenetics confirms high tropical nematode diversity. *Mol Ecol*; 19: 5521–5530.
- Raye' G., Miquel C., Coissac E., Redjadj C., Loison A., Taberlet P. 2011. New insights on diet variability revealed by DNA barcoding and high-throughput pyrosequencing: chamois diet in autumn as a case study. *Eco Res*; 26: 265–276.
- Russell A., Samuel R., Rupp B., Barfuss MH., Šafran M., Besendorfer V., Chase MW. 2010. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (*Polystachyinae*; *Vandaeae*; *Orchidaceae*): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon*; 59: 389–404.
- Samuel R., Kathirarachchi H., Hoffmann P., Barfuss MH., Wurdack KJ., Davis CC., Chase, MW. 2005. Molecular phylogenetics of *Phyllanthaceae*: Evidence from plastid *matK* and nuclear *PHYC* sequences. *Am J Bot*; 92: 132–141.
- Shapcott A., Forster PI., Guymer GP., McDonald WJF., Faith DP., Erickson DL., Kress WJ. 2015. Mapping biodiversity and setting conservation priorities for SE Queensland's rainforests using DNA barcoding. *PLoS ONE*; 10: e0122164.
- Shapcott A., Liu Y., Howard M., Forster PI., Kress WJ., Erickson DL., Faith DP., Shimizu Y., McDonald WJF. 2017. Comparing floristic diversity and conservation priorities across south east Queensland regional rain forest ecosystems using phylodiversity indexes. *Int J Plant Sci*; 178: 211–229.
- Shaw J., Lickey EB., Beck JT., Farmer SB., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder CT., Schilling EE., Small RL., 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot*; 92: 142–166.
- Sogin ML., Morrison HG., Huber JA., Welch DM., Huse SM., Neal PR., Arrieta JM., Herndl GJ. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.”. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103: 12115–12120.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol*; 17: 1105–1109.
- Weising K., Gardner RC. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*; 42:9–19.
- Yu J., Xue JH., Zhou SL. 2011. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *J Syst Evol*; 49(3), 176–181.

Tabela 1

Table 1

Lista testowanych starterów [S- pojedynczy amplikon; M-amplikony niespecyficzne; pogrubieniem zaznaczono startery, które wykorzystano do pełnej analizy]

The list of tested primers [S- single amplicon, M- multiple amplicons; primers that were used for full analysis were marked in bold]

region	primer name	sequence (5'-3')	amplicons	range of amplicon size [bp]	present	references		
ITS	ITS-p5	CCTTATCAYTTAGAGGAAGGAG	S	800 - 900	all species	Cheng i in., 2016		
	ITS-u4	RGTTTCTTTTCCTCCGCTTA						
	ITS-u1	GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG	M					
	ITS-u4	RGTTTCTTTTCCTCCGCTTA						
	ITS-p5	CCTTATCAYTTAGAGGAAGGAG	S	400-500	all species			
	ITS-u2	GCGTTCAAAGAYTCGATGRITC						
	ITS-u1	GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG	S	400-500	all species			
	ITS-u2	GCGTTCAAAGAYTCGATGRITC						
	ITS-p3	YGACTCTCGGCAACGGATA	S	400-500	all species			
	ITS-u4	RGTTTCTTTTCCTCCGCTTA						
	ITS-u3	CAWCGATGAAGAACYGAGC	M					
	ITS-u4	RGTTTCTTTTCCTCCGCTTA						
	P17a	CTACCGATTGAATGGTCCGGTGAA	S	800-900	all species		Popp i Oxelman, 2001	
	26S-82Ra	TCCCGGTTCCGCTCGCCGTACTA						
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	M			White i in., 1990		
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC						
	ITS5 (F)	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	M					
	ITS4 (R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC						
	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	M					
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC						
	ITS5 (F)	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	M					
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC						
	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	M					
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC						
	UniPlantF	TGTGAATTGCARRATYCMG	S	300 - 550	all species		Moorhouse-Gann i in., 2018	
	UniplantR	CCCGHYTGAYYTRGGTDC						
	matK	matK-472F	CCCRTYCATCTGGAAATCTGGTTC	S	300-900		not all species	Yui in., 2011
		matK-1248R	GCTRTRATAATGAGAAAGATTCTGC					
matK-KIMIR		ACCCAGTCCATCTGGAAATCTGGTTC	S	800-900	all species	CBOL, 2009		
matK-KIM3F		CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG						
matK2.1a-f		ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC	M			Ford i in., 2009		
matK2.1ar		GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG						
matK2.1F		CCTATCCATCTGGAAATCTTAG	M					
MatK.5r R		GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG						
matK-390f		CGATCTATTCATTCAATATTC	S	800-900	all species	Cuénoud i in., 2002		
matK-1326r		TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT						
matK2.1F		CCTATCCATCTGGAAATCTTAG	S	800-900	not all species	Ford i in., 2009		
matK3.2 r		CTTCTCTGTAAAGAATTC						
550Fdi		CTRGAAATCTGGTTCAARCTCTTCG	M			Demaio i in., 2011		
750Rca		TGATCGTAAATGAGAGGATTGGTTACAG						
trnK 570F	TCCAAAATCAAAGAGCGATTGG	M			Russell i in., 2010			
190R	ATTCGAGTAATTAACGTTTACAA				Samuel i in., 2005			
80F	CTATACCA CTATCTTTTCGGGAG	no ampli-cons			Samuel i in., 2005			
530R	GTTCCAATTCCAATACTCGTGAAG							
matK-390f	CGATCTATTCATTCAATATTC	M			Cuénoud i in., 2002			
530R	GTTCCAATTCCAATACTCGTGAAG				Samuel i in., 2005			
80F	CTATACCA CTATCTTTTCGGGAG	no ampli-cons			Samuel i in., 2005			
190R	ATTCGAGTAATTAACGTTTACAA							
matK-472F	CCCRTYCATCTGGAAATCTGGTTC	S	250-300	not all species				
750Rca	TGATCGTAAATGAGAGGATTGGTTACAG							

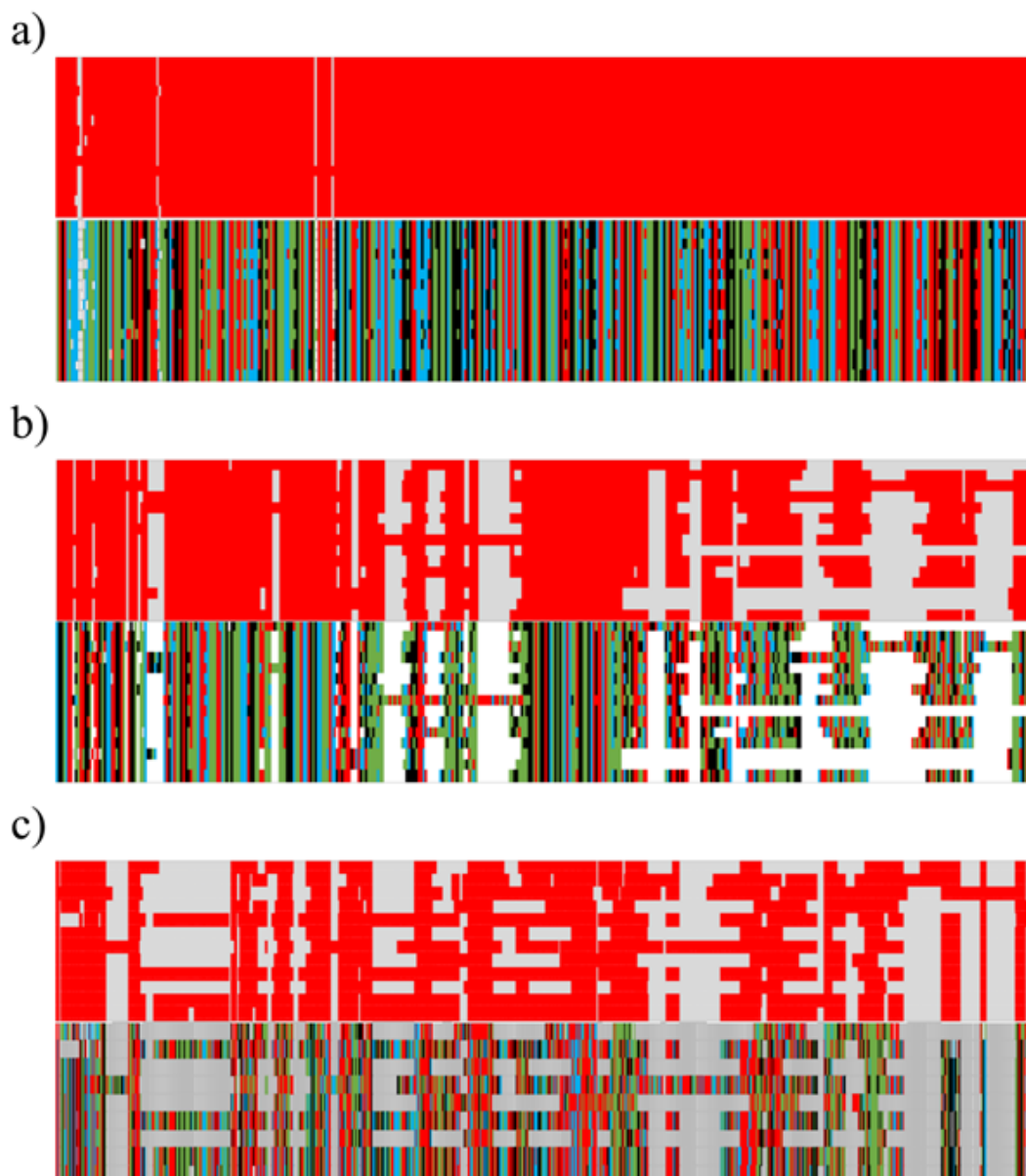
Lista testowanych starterów [S- pojedynczy amplikon; M-amplikony niespecyficzne; pogrubieniem zaznaczono startery, które wykorzystano do pełnej analizy]

The list of tested primers [S-single amplicon, M- multiple amplicons; primers that were used for full analysis were marked in bold]

region	primer name	sequence (5'-3')	ampli-cons	range of amplicon size [bp]	present	references
<i>rbcL</i>	rbcLa-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	M			Kress i Erickson, 2007
	rbcLa-R	GTAAAATCAAGTCCACCRCG				
	rbcLajf634R rbcL-aaf F	GAAACGGTCTCTCCAACGCAT ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	S	500-600	all species	CBOL, 2009
<i>rpoC1</i>	rpoC1 1f	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	S	600-700	not all species	Fazekas i in., 2008
	rpoC1 4r	CCATAAGCATATCTTGAGTTGG	S	500-600	all species	
	rpoC1 2f	GGCAAAGAGGGGAAGATTTTCG				
	rpoC1 4r	CCATAAGCATATCTTGAGTTGG				
<i>trnH-psbA</i>	psbAF trnH2	GTTATGCATGAACGTAATGCTC CGCGCATGGTGGATTACAATCC	S	400-700	all species	Kress i in., 2005
	psbA trnH(GUG)	CGAAGCTCCATCTACAAATGG ACTGCCTTGATCCACTTGCC	S	400-700	not all species	Hamilton, 1999
	psbA501f trnHR	TTTCTCAGACGGTATGCC GAACGACGGGAATTGAAC	S	400-700	not all species	Cox i in., 2004
	<i>yef</i>	yef1bF yef1bR yef1gF yef1gR	TCTCGACGAAAATCAGATTGTTGTGAAT ATACATGTCAAAGTGATGGAAAA TGAAAGCTCTAAGCAATGGATCYCC ATACGACCAATATTTTRGCTATTAT	S M	800-900	not all species
<i>atpF-atpH</i>	atpF atpH	ACTCGCACACACTCCCTTTC GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT	S	400-800	all species	Fazekas i in., 2008
<i>psbI-psbK</i>	psbIF psbKR	AGAGTTTGAGAGTAAGCAT TTAGCCTTTGTTTGCAAG	S	350-500	not all species	Lahaye i in., 2008
<i>trnK intron</i>	ccmp1	5'-CAGGTAAACTTCTCAACGGA-3' 5'-CCGAAAGTCAAAGAGCGATT-3'	M			Weising i Gardner, 1999
<i>5' to trnS</i>	ccmp2	5'-GATCCCGGACGTAATCCTG-3' 5'-ATCGTACCGAGGGTTCGAAT-3'	S	100-400	all species	
<i>trnG intron</i>	ccmp3	5'-CAGACCAAAGCTGACATAG-3' 5'-GTTTCATTTCGGCTCCTTTAT-3'	S	100-150	not all species	
<i>atpF intron</i>	ccmp4	5'-AATGCTGAATCGAYGACCTA-3' 5'-CCAAAATATTBGGAGGACTCT-3'	M			
<i>ORF 77-ORF82 intergenic</i>	ccmp5	5'-CGATGCATATGTAGAAAGCC-3' 5'-CATTACGTGCGACTATCTCC-3'	S	100-150	not all species	
<i>rpl20-rpl12 intergenic</i>	ccmp6	5'-TTGGCTACTCTAACCTTCCC-3' 5'-TTCTTTCTATTTCGAGDGA-3'	S	100-200	not all species	
<i>trnL</i>	trnL-FF trnL-FR	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC GATTTTCAGTCTCTGCTCTA	S	400-500	not all species	
	trnL-FF trnL-FRTab	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC ATTTGAACTGGTGACACGAG	S	400-600	all species	Dobeš i in., 2004 Taberlet i in., 1991
	trnL-Ffor trnL-FR	GGTTCAAGTCCCTCTATCATCCC GATTTTCAGTCTCTGCTCTA	S	500-800	not all species	Taberlet i in., 1991 Dobeš i in., 2004

Rys.1 Schematyczny obraz zróżnicowania w obrębie trzech regionów dla 16 przykładowych gatunków: a) *rbcl*; b) *trnL*; c) *trnH-psbA* [górny schemat przedstawia obecność in/del – delekcje zaznaczone na szaro; dolny schemat przedstawia obecność SNP – nukleotydy zaznaczone kolorami]

Fig. 1 Schematic image of the diversity within three regions for 16 different species: a) *rbcl*; b) *trnL*; c) *trnH-psbA* [the upper diagram shows the presence of in/del - deletions marked grey; the lower diagram shows the presence of SNP - nucleotides marked with colours].



SPIS TREŚCI

CONTENTS

Maciej Majka, Magdalena Gawłowska, Adriana Twardawska, Marek Korbas, Jakub Danielewicz, Tomasz Góral, Bogusława Ługowska, Jolanta Belter, Edward Witkowski, Tadeusz Drzazga, Przemysław Matysik, Urszula Woźna-Pawlak, Halina Wiśniewska	3
Wykorzystanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez <i>Oculimacula yallundae</i> i <i>O. acuformis</i> Use of molecular and phenotypic markers to identify wheat eyespot resistance genes caused by <i>Oculimacula yallundae</i> and <i>O. acuformis</i>	
Cezary Trawczyński	15
The effect of nitrogen fertilization on yield efficiency and quality of tubers potato varieties cultivated in an integrated production system Wpływ nawożenia mineralnego azotem na efektywność plonowania i jakość bulw odmian ziemniaka uprawianych w integrowanym systemie produkcji	
Wiesław Mądry, Dariusz Gozdowski	23
Historia rozwoju statystycznych metod planowania i analizy doświadczeń rolniczych na świecie oraz w Polsce A history of the development of statistical methods for designing and analyzing agricultural experiments in the world and in Poland	
Tomasz Góral, Piotr Ochodzki, Linda Kærgaard Nielsen, Dorota Walentyn-Góral	41
<i>Fusarium</i> species and <i>Fusarium</i> mycotoxins in grain of barley in Poland in 2009 and 2010. Short communication Gatunki <i>Fusarium</i> oraz toksyny fuzaryjne w ziarnie jęczmienia w Polsce w 2009 i 2010r. Komunikat	
Patrycja Siedlarz, Sławomir Bany, Krystyna Rybka	47
Quantitative changes in DNA methylation induced by monochromatic light in barley regenerants obtained by androgenesis Zmiany ilościowe metylacji DNA indukowane przez światło monochromatyczne u regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze androgenезы	
Teresa Oracka, Zbigniew Rybka, Bogusław Łapiński	53
The influence of homoeologous D(A) and D(B) substitutions on plant dry matter, nitrogen and phosphorus accumulation and utilization efficiency in hexaploid triticale young plants grown in hydroponics Wpływ homeologicznych substytucji D(A) i D(B) w siewkach heksaploidalnego pszenżyta na gromadzenie suchej masy, akumulację oraz wykorzystanie azotu i fosforu w kulturze hydroponicznej	
Marta Jańczak-Pieniążek, Jan Buczek, Renata Tobiasz-Salach, Dorota Bobrecka-Jamro	59
Wpływ intensywności uprawy na produktywność mieszańcowych i populacyjnych odmian pszenicy ozimej The impact of cultivation intensity for productivity on hybrid and population cultivars of winter wheat	
Wiesław Golka, Edward Arseniuk, Adrian Golka, Tomasz Góral	67
Sztuczne sieci neuronowe i teledetekcja w ocenie porażenia pszenicy jarej fuzariozą kłosów Artificial neural networks and remote sensing in the assessment of spring wheat infection by <i>Fusarium</i> head blight	

Maja Boczkowska, Anna Rucińska, Marcin Olszak, Arkadiusz Nowak

77

Ocena przydatności loci barkodowych do identyfikacji gatunków roślin łąk i muraw kserotermicznych.
Komunikat

Barcoding loci usefulness for the identification of Polish meadow and xerothermophilous sward
plant species. Short communication