



**POLITECHNIKA  
BYDGOSKA**  
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

**RADA NAUKOWA DYSCYPLINY ROLNICTWO I OGRODNICTWO**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Mgr inż. Rafał Nowak**

**BIOLOGICZNE I AGROTECHNICZNE UWARUNKOWANIA  
PLONOWANIA ORAZ WARTOŚCI UŻYTKOWEJ ZIARNA  
ALTERNATYWNYCH GENOTYPÓW JĘCZMIENIA *HORDEUM  
VULGARE L. VAR. NIGRICANS (SER.) KORN* I *HORDEUM  
VULGARE L. VAR. RIMPAUI WITTM***

***Biological and agrotechnical determinants of yield and grain  
utility value of alternative barley genotypes  
Hordeum vulgare L. var. nigricans (Ser.) Korn and Hordeum  
vulgare L. var. rimpaii Wittm***

DZIEDZINA: NAUKI ROLNICZE  
DYSCYPLINA: ROLNICTWO I OGRODNICTWO

**PROMOTOR PRACY**  
PROF. DR HAB. INŻ. MAŁGORZATA SZCZEPANEK  
KATEDRA AGRONOMII  
WYDZIAŁ ROLNICTWA I BIOTECHNOLOGII  
POLITECHNIKA BYDGOSKA IM. J. J. ŚNIADECKICH W BYDGOSZCZY

**Bydgoszcz, 2024**

## **Źródło finansowania**

Praca została sfinansowana z środków na działalność statutową Katedry  
Agronomii (BN-29/2019 - „*Innowacyjne technologie uprawy roli i wybranych  
roślin rolniczych*”)

oraz

z wewnątrzuczelnianych środków przyznanych w 2022 r. w ramach konkursu  
„Działanie Naukowe Młodych” na realizację przedsięwzięć badawczych  
młodych naukowców.

Tytuł projektu:

„*Ocena zawartości niskocząsteczkowych roślinnych związków chemicznych i  
aktywności przeciwutleniającej ziarna jęczmienia czarnego (*Hordeum vulgare  
L. var. nigricans* (Ser.) Korn) oraz kapturkowego (*H. vulgare var. rimpai  
Wittm*) (DMN 9/2022)”*

## Podziękowania

*Szczególne podziękowania kieruję do Pani Promotor  
**Prof. dr hab. inż. Małgorzaty Szczepanek** za ogromne wsparcie,  
poświęcony mi czas, dużą cierpliwość i życzliwość,  
cenne merytoryczne wskazówki i kilka lat owocnej współpracy.*

*Serdeczne podziękowania składam też  
pracownikom technicznym Katedry Agronomii,  
w szczególności Paniom: Kasi, Teresie i Ilonie za nieocenioną pomoc  
przy wykonywaniu prac polowych podczas prowadzenia doświadczeń.*

*Dziękuję również mojej rodzinie, w szczególności żonie i synom  
za wyrozumiałość i ogromne wsparcie w ciągu ostatnich pracowitych lat.*

## SPIS TREŚCI

1. Wstęp .....	6
2. Wykaz artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej .....	11
3. Uzasadnienie spójności tematycznej cyklu publikacji rozprawy .....	12
4. Hipoteza badawcza, cel i zakres badań .....	14
5. Materiały i metody .....	15
5.1. Materiał badawczy .....	15
5.2. Doświadczenia polowe.....	15
5.3. Warunki pogodowe .....	16
5.4. Pomiary cech biometrycznych i fizjologicznych .....	17
5.4.1. Fluorescencja chlorofilu .....	17
5.4.2. Wskaźniki powierzchni asymilacyjnej (LAI) i zieloności liści (SPAD) .....	18
5.4.3. Ocena cech biometrycznych i plonowania .....	18
5.5. Analiza składu chemicznego ziarna .....	19
5.5.1. Oznaczenie kwasów fenolowych .....	19
5.5.2. Oznaczenie flawonoidów .....	19
5.5.3. Oznaczenie karotenoidów .....	20
5.5.4. Oznaczenie wolnych kwasów tłuszczowych.....	20
5.5.5. Oznaczenie antocyjanidyn.....	20
5.5.6. Oznaczenie fitomelaniny .....	21
5.5.7. Oznaczenie potencjału antyoksydacyjnego.....	21
5.6. Analiza statystyczna .....	21
6. Wyniki .....	22
6.1. Cechy fizjologiczne.....	22
6.1.1. Fluorescencja chlorofilu .....	22
6.1.2. Wskaźnik powierzchni liściowej (LAI) i indeks zieloności liścia (SPAD) .....	22
6.2. Cechy biometryczne i plonowanie roślin .....	25
6.3. Zależności pomiędzy cechami fizjologicznymi, biometrycznymi i plonowaniem .....	28
6.4. Zawartość i kompozycja związków bioaktywnych w ziarnie .....	29
6.4.1. Zawartość i kompozycja kwasów fenolowych.....	29
6.4.2. Zawartość i kompozycja flawonoidów.....	32

6.4.3. Zawartość antocyjanidyn, fitomelaniny i polifenoli ogółem oraz aktywność przeciwutleniająca ziarna .....	34
6.4.4. Zawartość i kompozycja karotenoidów .....	35
6.4.5. Kompozycja wolnych kwasów tłuszczowych .....	36
6.4.6. Analizy wielowymiarowe i korelacje dla cech jakościowych ziarna.....	37
7. Dyskusja .....	40
8. Wnioski .....	49
9. Literatura .....	51
10. Streszczenie .....	59
11. Abstract .....	61
12. Złączniki .....	62
12.1. Kopie artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej .	62
12.2. Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej .....	124
12.3. Oświadczenia Współautorów artykułów naukowych .....	126

## 1. Wstęp

Rodzaj jęczmień (*Hordeum* spp.) należący do plemienia *Triticeae* obejmuje ponad 30 gatunków występujących w klimacie umiarkowanym, a także w suchych i mało żyznych regionach świata. Najważniejszym gospodarczo gatunkiem tego rodzaju jest jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.), który należy do najwcześniej udomowionych roślin rolniczych (10 – 12 tys. lat p.n.e.). Jego rodzimym miejscem pochodzenia jest region Żyznego Półksiężycy, obejmujący południowo-zachodni Iran, Irak i Turcję, aż po środkową Anatolię, północną Syrię i Palestynę [Dai i in. 2012; Haas i in. 2019]. Jęczmień zwyczajny w starożytności był głównym zbożem Egipcjan i Greków, którzy używali go do produkcji chleba i piwa. Był popularny również w Mezopotamii z uwagi na większą od pszenicy tolerancję na zasolenie gleb. W Europie zaczęto uprawiać go na przełomie XVI i XVII w. p. n. e. Obecnie nadal stanowi jedną z najważniejszych gospodarczo upraw polowych na świecie, piątą po pszenicy, kukurydzy, ryżu i soi pod względem powierzchni zasiewów, która wynosiła w 2022 r. 47,1 mln ha [FAOSTAT 2023]. W Polsce w 2022 r uprawa tego gatunku obejmowała 639 tys. ha [FAOSTAT 2023], z czego na 320 tys. ha uprawiano formę jarą [COBORU 2023]. Średni plon jęczmienia zwyczajnego na świecie wynosił w 2022 roku 3,28 t ha<sup>-1</sup>. W Polsce średnie plonowanie jęczmienia wynosiło w tym samym okresie 4,35 t ha<sup>-1</sup>. W 2022 r., w doświadczeniach porejestrowych plonowanie jęczmienia jarego przy przeciętnym poziomie agrotechniki wynosiło średnio dla odmian 7,00 t ha<sup>-1</sup> [COBORU 2023].

Jęczmień zwyczajny wywodzi się z jęczmienia dzikiego (*Hordeum spontaneum* (K. Koch) Thell). Gatunek ten, będący bezpośrednim przodkiem jęczmienia uprawnego stanowi cenny zasób genetyczny szczególnie dla hodowli odpornościowej. Gatunki jęczmienia składają się z cytotypów diploidalnych ( $2n = 2x = 14$ ), tetraploidalnych ( $2n = 4x = 24$ ) i heksaploidalnych ( $2n = 6x = 42$ ) [El-Hashash i in. 2019]. Jęczmień zwyczajny występuje zarówno w formie ozimej jak i jarej. Jego zróżnicowanie genetyczne przejawia się m.in. w rzędowości (kłos dwu-, lub sześciorzędowy) i obecności plewy (ziarno oplewione lub nieoplewione) [Gong i in. 2019]. Wśród genotypów jęczmienia występują również formy tworzące kłosa bezostne, ościste lub z ościami przekształconymi w trójdzielne nasadki – tzw. kaptury (var. *furcatum* lub *trifurcatum*). Ziarno jęczmienia może również różnić się barwą. Opisane zostały jak dotąd formy tworzące ziarniaki żółte, niebieskie, fioletowe, a nawet czarne [Gordeeva i in. 2019]. Ciemna barwa ziarna wynika z obecności kilku związków chemicznych, w tym fitomelanin i związków fenolowych [Shoeva i in. 2016]. Grupa określana w literaturze mianem jęczmienia czarnego obejmuje min. gatunek *H. vulgare* var. *nigricans*, znany również jako *H. distichon* var. *nigricans* [Global Biodiversity Information Facility], który można znaleźć w kilku regionach świata jako niszową odmianę lokalną, zwłaszcza w Iraku, Syrii i Turcji [Özberk i in. 2015]. Jęczmień kapturkowy *H. vulgare* var. *rimpau* może również mieć czarne ziarna. W Polsce powszechnie uprawiane są formy jara dwurzędowa oraz ozima dwu- lub wielorzędowa tworzące kłosa ościste z oplewionymi ziarniakami o żółtym zabarwieniu, zakończonymi długimi, ząbkowanymi ościami.

Ziarno jęczmienia jest wykorzystywane głównie do celów paszowych i w przemyśle piwowarskim, ale również w żywieniu ludzi [El-Hashash i in. [2019]. W Azji (głównie w Tybecie, w Chinach) jęczmień jest jednym z podstawowych surowców spożywczych [Sakellariou i Mylona 2020]. Korzystne właściwości dietetyczne i prozdrowotne jęczmienia sprawiają, że znaczenie konsumpcyjne tego gatunku wzrasta w ostatnich latach także w krajach europejskich. Wysoka jakość dietetyczna ziarna jęczmienia wynika m.in. z zawartości

substancji bioaktywnych o właściwościach przeciwutleniających [Horvat i in. 2020; Panizo-Casado i in. 2020]. Dotychczasowe badania wskazują, że zwłaszcza genotypy o ciemnym zabarwieniu ziarniaków charakteryzują się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym, wynikającym z zawartości przeciwutleniaczy takich jak związki fenolowe [Kim i in. 2007; Abdel-Aal i in. 2012; Yang i in. 2018]. Genotypy te mogą więc stanowić cenny surowiec do produkcji żywności funkcjonalnej. Przeciwutleniacze redukują stres oksydacyjny poprzez wychwytywanie wolnych rodników, dzięki czemu działają ochronnie na komórki organizmu i zmniejszają ryzyko wystąpienia chorób neurodegeneracyjnych, np. choroby Alzheimera i Parkinsona oraz chorób serca. Przeciwutleniacze chronią również komórki organizmów przed szkodliwym działaniem metali ciężkich poprzez ich chelatowanie [Kaur i in. 2021]. Antyoksydanty pełnią ważne funkcje obronne w samej roślinie, ograniczając skutki stresu abiotycznego i biotycznego [Lebudda i in. 2020]. Zmniejszają między innymi porażenie jęczmienia przez grzyby chorobotwórcze i mogą redukować ilość mykotoksyn wytwarzanych przez patogeny [Choo i in. 2015].

W rodzinie *Poaceae* kluczową rolę odgrywają fitopigmenty, takie jak karotenoidy i polifenole. Te związki chemiczne nie tylko odpowiadają za barwę roślin, ale co ważniejsze, mają właściwości prozdrowotne. Karotenoidy są znane ze swojej zdolności do nadawania owocom i warzywom pomarańczowego, czerwonego lub żółtego koloru [Dang i in. 2022]. Luteina, zeaksantyna oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten są najważniejszymi karotenoidami [Ficco i in. 2014]. Wśród nich  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten są promotorami witaminy A i są niezbędne w procesach biochemicznych, biorących udział w jej syntezie w organizmach zwierzęcych. Karotenoidy wykazują silne właściwości przeciwutleniające, a także przeciwzapalne [Linnewiel-Hermoni i in. 2016]. Badania kliniczne dowiodły również, że dieta bogata w karotenoidy obniża ryzyko chorób układu krążenia, nowotworów, osteoporozy i chorób oczu [Tanumihardjo i in. 2013].

Dominującą grupą metabolitów wtórnych u roślin zbożowych są jednak związki fenolowe, wśród których możemy wyróżnić między innymi takie grupy jak: antocyjanidyny, flawonoidy i kwasy fenolowe [Mińkowski 2013]. Substancje te, nazywane również polifenolami charakteryzują się pierścieniem aromatycznym z przyłączoną grupą hydroksylową, której zawdzięczają swoje właściwości przeciwutleniające. Związki należące do tej grupy są przedmiotem wielu badań prowadzonych na całym świecie, głównie w kierunku dokładnego poznania ich funkcji biologicznych i korzystnego wpływu na zdrowie ludzi i zwierząt. Antocyjany i flawonoidy mają korzystny wpływ na metabolizm lipidów i cukrów, a także zapobiegają zaburzeniom metabolicznym i sercowo-naczyniowym [Dang i in. 2022]. Ponadto udowodniono, że polifenole zapobiegają rozwojowi nowotworów, są pomocne w leczeniu alergii, wzmacniają układ trawienny, eliminują infekcje oraz stymulują wydzielanie estrogenów w organizmach kobiet [Grajek 2007]. Ponadto, ze względu na swój przeciwutleniający charakter, polifenole odgrywają istotną rolę w ochronie wrażliwych składników odżywczych przed utlenianiem.

Zboża są także źródłem lipidów, które obejmują kwasy tłuszczowe, takie jak nasycone (SFA), jednonienasycone (MUFA) i wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) [Guo i in. 2020]. Całkowita zawartość tłuszczu w ziarnach jęczmienia waha się między 3-4% [Geng i in. 2022]. Najcenniejsze są wielonienasycone kwasy tłuszczowe, zwłaszcza niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe, m.in. kwasy linolowy i linolenowy [Kaur i in. 2014]. Doniesienia literaturowe wskazują na korzyści zdrowotne wynikające ze spożywania PUFA, takie jak zmniejszenie ryzyka choroby niedokrwiennej serca, udaru mózgu i zawału mięśnia sercowego lub obniżenie poziomu cholesterolu we krwi [Abdelhamid i in. 2018]. Wykazano, że mają one działanie neuroprotektyjne, zapobiegają chorobie Parkinsona oraz wspomagają

funkcje poznawcze i wzrokowe [Litman i in. 2001]. Nadmierne spożycie nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) może z kolei wpływać na rozwój chorób serca i układu krążenia [Hooper i in. 2020].

Skład chemiczny zielonych części roślin jęczmienia w okresie wegetacji oraz wielkość plonu i końcowe parametry jakościowe ziarna zależą od czynników genetycznych, agrotechnicznych i siedliskowych [Zrckova i in. 2018; Malik 2012]. Dotychczasowe badania wskazują, że alternatywne genotypy jęczmienia wykazują większą zdolność do koncentracji związków prozdrowotnych, a także wyższy potencjał przeciwutleniający niż genotypy standardowe [Jin i in. 2022]. Badania w tym zakresie przeprowadzono na jęczmieniu górskim (ang. *Highland Barley*), rodzimej formy z Tybetu i regionu Qinghai, tworzącego ziarniaki o ciemnym zabarwieniu. Według Guo i in. [2020] oraz Idehen i in. [2017] jęczmień górski ma wyższą wartość odżywczą niż tradycyjnie uprawiane odmiany jęczmienia zwyczajnego. Potwierdzono również, że zmniejsza on ryzyko cukrzycy, choroby Alzheimera, miażdżycy, chorób sercowo-naczyniowych oraz może być przydatny w profilaktyce przeciwnowotworowej [Shen i in. 2016]. *Hordeum vulgare* var. *nigricans* i *Hordeum vulgare* var. *rimpaui*, z uwagi na ciemne zabarwienie ziarna, wskazujące na potencjalnie wyższą zawartość przeciwutleniaczy, mogą wykazywać podobne właściwości.

Wielkość i jakość plonu jęczmienia zależy od systemu gospodarowania. Według Kokare i in. [2014] plon ziarna tego gatunku uzyskiwany w warunkach ekologicznych jest mniejszy średnio o 25-60% niż w uprawie konwencjonalnej, co wynika głównie z różnic w nawożeniu i odchwaszczaniu. W warunkach uprawy ekologicznej uzyskanie wysokiego plonu nie jest jednak priorytetem, najważniejsza jest bowiem wysoka jakość surowca [Ingver i in. 2008]. Istnieje wiele badań, które dowodzą, że uprawa ekologiczna stymuluje akumulację naturalnych związków bioaktywnych w roślinach. W warunkach uprawy ekologicznej występuje bowiem wysoka ekspozycja roślin na czynniki stresowe, co zwiększa produkcję związków bioaktywnych [Asami i in. 2003]. Według Baker i in. [2020] hodowla wysokojakościowych genotypów jęczmienia, przydatnych do uprawy w systemie rolnictwa ekologicznego, jest bardzo ważna dla rozszerzenia rynków i zwiększenia potencjału jego uprawy.

W uprawie roślin coraz powszechniejszą praktyką staje się aplikowanie substancji wspomagających wzrost tzw. biostymulatorów. Biostymulatory to produkty pochodzenia naturalnego, które poprawiają metabolizm roślin [Brown i Saa 2015]. Stosuje się je w celu intensyfikacji pobierania składników odżywczych, zminimalizowania stresu biotycznego i abiotycznego oraz zmniejszenia dawek nawozów [EBIC 2021]. Wśród nich znajdują się produkty składające się z aminokwasów, które wpływają na plon, a także jego jakość, w tym zawartość związków prozdrowotnych [Posmyk i Szafrńska 2016]. W dotychczasowych badaniach potwierdzono wpływ stosowania biostymulatorów aminokwasowych na wzrost zawartości związków fenolowych w nasionach soi [Kocira i in. 2018; Kocira 2019], owocach papryki [Ertani i in. 2014] i liściach sałaty [Mpai i in. 2022]. W literaturze brakuje badań dotyczących wpływu stosowania biostymulatorów aminokwasowych na zawartość i skład związków bioaktywnych, w tym związków fenolowych, w ziarnie jęczmienia. Brak jest również badań dotyczących wpływu tego czynnika na cechy jakościowe ziarna jęczmienia uprawianego w ekologicznym i konwencjonalnym systemie uprawy. Szczególnie interesujące może okazać się stosowanie tych preparatów w przypadku alternatywnych genotypów jęczmienia, o podwyższonym potencjale do syntezy związków fenolowych.

Czynniki genetyczne i agrotechniczne wpływają na produktywność roślin poprzez interakcję z czynnikami siedliskowymi [Zalewski i Liszewski 2016]. Cechy morfologiczne i fizjologiczne roślin znacznie różnią się od siebie w optymalnych i niekorzystnych warunkach



wzrostu. Czynniki stresowe takie jak zbyt wysoka lub zbyt niska temperatura powietrza czy brak opadów powodują uszkodzenia aparatu fotosyntetyzującego (zwłaszcza PS II), ograniczając tym samym proces fotosyntezy, od przebiegu którego zależy wielkość i jakość plonu [Ashraf i in. 2006]. Fotosynteza to proces syntezy związków organicznych z prostych związków CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O, przy udziale aktywnie wykorzystanego promieniowania słonecznego (PAR), zachodzący w roślinach zielnych. Efektywność funkcjonowania aparatu fotosyntetyzującego przekłada się więc na proces akumulacji biomasy, przez co kształtuje cechy morfologiczne roślin oraz wielkość i jakość plonu. Fotosynteza najintensywniej zachodzi w liściach, głównie w liściu flagowym. Liście flagowe są przez roślinę stosunkowo wcześniej wykształcane i pozostają aktywne fotosyntetycznie do końca okresu formowania ziarna. Są więc głównym źródłem asymilatów dla kłosa i rozwijających się w nim ziarniaków [Starck 2002; Górny i in. 2004].

Liście pochłaniają około 70-80% padającego na nie promieniowania. Pozostała część promieniowania zostaje utracona w wyniku odbicia światła od liścia lub wyemitowana w postaci ciepła i promieniowania fluorescencyjnego. Efektywnie funkcjonujący aparat fotosyntetyzujący asymiluje większe ilości promieniowania świetlnego niż uszkodzony w wyniku stresu, a ilość usuniętego fluorescencyjnie promieniowania jest odwrotnie proporcjonalna do intensywności fotosyntezy. Dlatego też fluorescencja chlorofilu *a* stanowi o kondycji i wydajności aparatu fotosyntetyzującego [Strasser i in. 2000, Maxwell i Johnson 2000]. Procesy fizjologiczne mogą cechować się dużą zmiennością w zależności od genotypu oraz stosowanej agrotechniki [Shangguan i in. 2000]. Czynniki agrotechniczne, a zwłaszcza odżywienie składnikami pokarmowymi wpływają na produkcję głównego barwnika fotosyntetyzującego – chlorofilu [Kozłowska i in. 2010]. Zawartość tego barwnika w liściach wpływa na intensywność procesu fotosyntezy [Starck 2002]. Niedobór składników pokarmowych min. azotu wpływa natomiast na intensyfikację syntezy antocyjanów [Grzyś 2012]. Rośliny w dłuższych okresach czasu dostosowują również swój pokrój do panujących warunków środowiskowych, tak aby wspierać proces fotosyntezy [Glenn i in. 2008]. Zarówno wskaźniki wydajności fotosyntezy jak i cech morfologicznych roślin, w tym LAI mogą w przyszłości służyć do modelowania fenotypów zbóż dla potrzeb nowoczesnej selekcji i hodowli roślin [Rybka i Nitka 2014]. Jednym ze sposobów na pozyskanie informacji o stanie fizjologicznym roślin i szybkiego zdiagnozowania zaburzeń w funkcjonowaniu aparatu asymilującego jest pomiar fluorescencji chlorofilu *a*. Zjawisko to informuje m.in. o zmianach w efektywności funkcjonowania fotosyntezy wynikających z oddziaływania stresu abiotycznego (wysoka lub niska temperatura, niedobór lub nadmiar wody itp.). Cząsteczka chlorofilu jest fluorescencyjna, co umożliwia określenie aktywności fotochemicznej rośliny poprzez wykrywanie rozpraszania fotonów, co jest ściśle związane ze zmianami w transporcie elektronów na błonach chloroplastów [Sánchez-Reinoso i in. 2019]. Zaburzenie to powoduje spadek aktywności fotosyntezy całej rośliny [Faseela i in. 2019]. Mierząc fluorescencję chlorofilu, można wykryć zaburzenia aktywności fotosyntetycznej rośliny bez naruszania tkanek badanych roślin [Sánchez-Reinoso i in. 2019]. Specyfika parametrów opisujących fluorescencję chlorofilu, w tym najczęściej stosowanych wskaźników  $F_v/F_M$  i  $F_v/F_0$ , sprawiła, że są one coraz częściej wykorzystywane w diagnostyce stanu upraw rolniczych [Roostaeia i in. 2011]. Stosunek  $F_v/F_M$  (parametr reprezentujący wydajność konwersji pierwotnej energii świetlnej w centrum PS II) i stosunek  $F_v/F_0$  (reprezentujący fotochemiczne i niefotochemiczne wykorzystanie energii świetlnej w centrum reakcji) są ważnymi parametrami wykorzystywanymi jako wskaźniki stresu w wielu badaniach fotosyntetycznych. Ponieważ jednak zależą one od początkowego ( $F_0$ ) i maksymalnego ( $F_M$ ) poziomu fluorescencji, mogą

nie być wystarczająco czułe, aby wykryć różnice między próbkami [Singh i in. 2022]. W wielu badaniach wskaźnik wydajności ( $PI_{ABS}$ ) jest również przedstawiany jako istotny parametr do pomiaru wydajności fotosyntezy.  $PI$  jest parametrem integracyjnym obliczanym na podstawie fotochemii pierwotnej, gęstości aktywnego centrum reakcji w przeliczeniu na chlorofil i wydajności elektronów. Ilość biomasy wytworzonej podczas wegetacji i plon użyteczny roślin zależą również od właściwego odżywiania, które można pośrednio ocenić poprzez pomiar zawartości chlorofilu w liściach za pomocą mierników SPAD, wykorzystujących absorpcję światła o różnych długościach fal przez liść rośliny [Zhang i in. 2022]. Ostateczna wartość SPAD jest określana na podstawie różnicy między absorpcją fal światła czerwonego i podczerwonego. Im wyższa wartość tego parametru, tym więcej cząsteczek chlorofilu w liściu rośliny [Nyi i in. 2012]. Innym parametrem związanym z wielkością plonu jest wskaźnik powierzchni liści (LAI), który mówi o powierzchni liści, która przechwytuje energię słoneczną niezbędną do fotosyntezy roślin [Fang i in. 2019]. Wiadomo jednak, że na ostateczny plon ziarna zbóż bezpośredni wpływ ma wielkość i współzależność strukturalnych komponentów plonowania, takich jak generatywne pędy płodne na  $1\text{ m}^2$ , liczba ziaren w kłosie i masa 1000 ziaren [Gozdowski i in. 2008].

Przedstawione powyżej kwestie w pełni uzasadniają zakres rozprawy doktorskiej, w której analizowano parametry fizjologiczne i morfologiczne alternatywnych genotypów jęczmienia *H. v. var. nigricans* i *H. v. var. rimpai* w zróżnicowanych w warunkach hydrotermicznych, a także oceniano wpływ systemu gospodarowania oraz aplikacji biostymulatorów na zawartość związków bioaktywnych w ziarnie.

**Wykaz artykułów naukowych  
stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej**

1. Szczepanek M., **Nowak R.**, Błaszczuk K. Physiological and Agronomic Characteristics of Alternative Black Barley Genotypes (*Hordeum vulgare* var. *nigricans* and *H. v.* var. *rimpaui*) under Different Hydrothermal Conditions of the Growing Seasons. *Agriculture*, 2023, 13, 2033. <https://doi.org/10.3390/agriculture13102033>, **140 pkt. MNiSW , IF 3,6.**
2. **Nowak R.**, Szczepanek M., Kobus-Cisowska J., Stuper-Szablewska K., Dziedziński M., Błaszczuk K. Profile of phenolic compounds and antioxidant activity of organically and conventionally grown black-grain barley genotypes treated with biostimulant, *PLOS ONE*, 2023 18, 7, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428>, **100 pkt. MNiSW, IF 3,7.**
3. **Nowak R.**, Szczepanek M., Błaszczuk K., Kobus-Cisowska J., Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., Pobereźny J., Hassanpouraghdam MB., Rasouli F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. *Agronomy*, 2023, 13, 7, 1852. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071852>, **140 pkt. MNiSW, IF 3,7.**

### 3. Uzasadnienie spójności tematycznej cyklu publikacji rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska pt. Biologiczne i agrotechniczne uwarunkowania plonowania oraz wartości użytkowej ziarna alternatywnych genotypów jęczmienia *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Korn i *Hordeum vulgare* L. var. *rimpaui* Wittm składa się z trzech artykułów naukowych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach przypisanych do dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Przedmiotem badań w prezentowanych publikacjach były alternatywne genotypy jęczmienia *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Korn i *Hordeum vulgare* L. var. *rimpaui* Wittm oraz współczesna odmiana jęczmienia jarego 'Soldo', będąca wzorcem w badaniach rejestracyjnych Centralnego Ośrodka Badań Odmian Roślin Uprawnych (COBORU). Badania miały na celu analizę cech fizjologicznych i biometrycznych [P1] oraz plonowania [P1; P3], a także zawartości związków bioaktywnych w ziarnie [P2; P3] alternatywnych genotypów jęczmienia w zróżnicowanych warunkach środowiskowych oraz agrotechnicznych, a także porównanie ich z odmianą współczesną jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.).

W publikacji [P1] opisano wyniki dwuletniego, ścisłego doświadczenia polowego, mającego na celu identyfikację cech warunkujących produktywność alternatywnych genotypów jęczmienia w zróżnicowanych warunkach hydrotermicznych oraz porównanie ich ze współczesną odmianą uprawną jęczmienia o wysokiej plenności. Eksperyment polowy przeprowadzono w konwencjonalnym systemie gospodarowania. Dwukrotnie w trakcie sezonu wegetacyjnego oceniano współczynnik powierzchni asymilacyjnej liści oraz trzykrotnie efektywność funkcjonowania fotosyntezy oraz indeks zieloności liścia. Opisano również cechy biometryczne – liczbę kłosów płodnych i płonnych w przeliczeniu na roślinę i jednostkę powierzchni, plon biomasy roślin, plon słomy, plon ziarna i indeks żniwny.

W pracy [P2] i [P3] opisano natomiast wyniki z pochodzące z dwóch ścisłych doświadczeń polowych, prowadzonych w ekologicznym i konwencjonalnym systemie gospodarowania, których celem była ocena wpływu nalistnej aplikacji biostymulatora aminokwasowego Naturamin WSP na zawartość związków bioaktywnych (o działaniu prozdrowotnym) w ziarnie alternatywnych genotypów jęczmienia *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Korn i *Hordeum vulgare* L. var. *rimpaui* Wittm. W artykule [P3] opisano wpływ czynników agrotechnicznych – genotypu i aplikacji nalistnej biostymulatora oraz ich interakcji na zawartość karotenoidów w ziarnie, skład kwasów tłuszczowych oraz sumę kwasów fenolowych, flawonoidów, antocyjanidyn oraz ogólną zawartość związków

fenolowych. Oceniono również wpływ tych czynników na plonowanie jęczmienia, w konwencjonalnym i ekologicznym systemie gospodarowania [P3]. W pracy [P2] przedstawiono profil związków fenolowych zawartych w ziarnie badanych genotypów, z wyszczególnieniem pojedynczych substancji przynależnych do grupy kwasów fenolowych, flawonoidów i antocyjanidyn. Oznaczono również zawartość roślinnej melaniny odpowiedzialnej za czarną barwę ziarniaków oraz określono aktywność przeciwutleniającą ziarna.

Cykl publikacji wchodzący w skład rozprawy doktorskiej stanowi monotematyczny opis biologicznych podstaw i potencjału plonowania alternatywnych genotypów jęczmienia *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Korn i *Hordeum vulgare* L. var. *rimpaui* Wittm, w zróżnicowanych warunkach hydrotermicznych [P1] oraz przedstawia dowody na wysoką wartość użytkową ziarna [P2; P3], wynikającą z podwyższonej koncentracji związków prozdrowotnych, o działaniu przeciwutleniającym oraz większej niż w odmianie współczesnej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Uzyskane wyniki stanowią podstawy teoretyczne, niezbędne do ustalenia technologii uprawy alternatywnych genotypów jęczmienia oraz wskazują na przydatność ziarna do produkcji żywności funkcjonalnej.

#### 4. Hipoteza badawcza, cel i zakres pracy

Celem badań była ocena stanu fizjologicznego, cech biometrycznych, plonowania roślin oraz zawartości związków bioaktywnych w ziarnie alternatywnych genotypów jęczmienia *Hordeum vulgare* var. *nigricans* (Ser.) Korn i *Hordeum vulgare* var. *rimpau* Wittm oraz ich porównanie z odmianą współczesną *Hordeum vulgare* L., w warunkach ekologicznego i konwencjonalnego systemu gospodarowania.

Szczegółowe cele badawcze:

1. Określenie stanu fizjologicznego roślin, cech biometrycznych i plonowania alternatywnych genotypów i odmiany współczesnej jęczmienia w zróżnicowanych w latach badań warunkach hydrotermicznych.
2. Ocena zawartości związków bioaktywnych w ziarnie alternatywnych genotypów i odmiany współczesnej jęczmienia uprawianych w ekologicznym i konwencjonalnym systemie gospodarowania.
3. Rozpoznanie wpływu nalistnej aplikacji biostymulatora aminokwasowego na plonowanie oraz zawartość związków bioaktywnych w ziarnie badanych genotypów jęczmienia uprawianego ekologicznie i konwencjonalnie.
4. Analiza profilu związków fenolowych i tłuszczowych w ziarnie odmiany współczesnej i alternatywnych genotypów jęczmienia z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej.

Założono, że alternatywne genotypy jęczmienia *Hordeum vulgare* var. *rimpau* Wittm i *Hordeum vulgare* var. *nigricans* (Ser.) Korn będą plonowały na niższym poziomie niż współczesna odmiana uprawna jęczmienia, jednak ziarno tych genotypów będzie się charakteryzowało większą zawartością związków bioaktywnych. Założono również, że czynniki agrotechniczne takie jak stosowanie biostymulatora aminokwasowego oraz system gospodarowania, będą decydowały o stanie fizjologicznym roślin, przez co wpłyną na plonowanie oraz skład chemiczny ziarna.

## 5. Materiał i metody

### 5.1. Materiał badawczy

Przedmiotem badań były dwa alternatywne genotypy jęczmienia *Hordeum vulgare* L. var *nigricans* (Ser.) Körn i *H. vulgare* L. var. *rimpaii* Wittm oraz konwencjonalna odmiana uprawna 'Soldo' jęczmienia zwyczajnego (*H. vulgare* L.). Pierwsze dwa genotypy to formy jare jęczmienia zwyczajnego, należące do podgatunku jęczmienia dwurzędowego - ssp. *distichon*. Tworzą one oplewione ziarno, o barwie od ciemnobrazowej do czarnej, osadzone na luźnym i zwisłym kłosie (var. *nutans*). *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn tworzy kłos ościsty, natomiast *H. vulgare* L. var. *rimpaii* Wittm posiada ości przekształcone w trójdzielne nasadki tzw. kapturki (var. *furcatum*). Odmiana 'Soldo', traktowana w badaniu jako kontrola, była w okresie badań odmianą wzorcową w badaniach rejestracyjnych COBORU [COBORU 2018]. Jej hodowcą jest Saaten Union. Należy do odmian oplewionych, polecana jest do uprawy na cele konsumpcyjne lub paszowe. Charakteryzuje się wysokim i stabilnym plonowaniem w warunkach wysokiego i średniego poziomu agrotechniki. Charakteryzuje się ona średnim krzewieniem i wysoką masą tysiąca ziaren. Jest to odmiana o wysokiej odporności na najważniejsze choroby [Czembor et al. 2022]. Wykazuje również przydatność do uprawy w systemie ekologicznym.



Ryc. 1. Ziarniki badanych genotypów jęczmienia – (a) *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn, (b) *Hordeum vulgare* 'Soldo', (c) *H. vulgare* L. var. *rimpaii* Wittm [P2].

### 5.2. Doświadczenia polowe

Dwa ściśle, dwuletnie doświadczenia polowe przeprowadzono w warunkach systemu gospodarowania ekologicznego i konwencjonalnego, w latach 2021-22, w układzie losowanych podbloków (split-plot), w 4 powtórzeniach. Czynnikiem pierwszego rzędu były genotypy jęczmienia: A1 - *H. vulgare* L. var. *rimpaii* Wittm, A2 - *H. vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn, A3 - 'Soldo' *H. vulgare* L. Czynnikiem drugiego rzędu stanowiły natomiast zabiegi biostymulujące: B1 - kontrola bez aplikacji, B2 - nalistna aplikacja biostymulatora aminokwasowego. Powierzchnia poletka w systemie konwencjonalnym wynosiła 24 m<sup>2</sup> (16 m x 1,5 m), a w systemie ekologicznym 13,47 m<sup>2</sup> (7,7 m x 1,75 m). Zastosowany biostymulator zawierał 12,8% azotu całkowitego w formie organicznej i około 80% wolnych aminokwasów, w tym około 8% Asp, 12% Glu, 15% Ser, 8% Gly, 1% His, 6% Arg, 5% Thr, 5% Ala, 13% Pro, 0,5% Tyr, 6% Val, 0,5% Met, 3% Ile, 8% Leu, 6% Phe, 2% Lys, 1% Cys. Biostymulator zastosowano dwukrotnie w ciągu sezonu wegetacyjnego (pierwsza aplikacja w fazie wydłużania łodygi (BBCH 32), a druga na początku kłoszenia (BBCH 53), w dawkach po 0,5 kg ha<sup>-1</sup>, w postaci 0,17% wodnego roztworu. Ciecz roboczą rozpylano ręcznie, przy użyciu opryskiwacza plecakowego z regulatorem ciśnienia. Doświadczenia w systemie

konwencjonalnym zlokalizowano w Minikowie (53°10'02"N, 17°44'22"E), na glebie o pH 4,7 i następującej zawartości przyswajalnych form składników pokarmowych: 7,1 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 100 g<sup>-1</sup> gleby, 17,1 mg K<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup> gleby, 4,5 mg MgO 100 g<sup>-1</sup> gleby. Doświadczenie w systemie ekologicznym zlokalizowano w miejscowości Luchowo (53°15'40"N, 17°16'26"E), na glebie o pH 7,7 i zawartości 23,7 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 100 g<sup>-1</sup> gleby, 19,7 mg K<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup> gleby, 4,2 mg MgO 100 g<sup>-1</sup> gleby. Gleba, na której były założone oba doświadczenia charakteryzowała się bardzo niską zawartością azotu mineralnego. W systemie konwencjonalnym gleba zawiera 25,0 kg N<sub>min</sub> ha<sup>-1</sup>, natomiast w systemie ekologicznym 23,8 kg N<sub>min</sub> ha<sup>-1</sup>, w warstwie 0-30 cm. Siew jęczmienia w systemie konwencjonalnym przeprowadzono między 21 a 31 marca, a w systemie ekologicznym między 1 a 10 kwietnia. Gęstość siewu w obu doświadczeniach wynosiła 350 ziaren m<sup>-2</sup>, a rozstaw rzędów 12,5 cm. W systemie ekologicznym podczas wzrostu roślin stosowano wyłącznie bronowanie odchwaszczające w fazie krzewienia oraz aplikację biostymulatorów w wybranych kombinacjach. W systemie konwencjonalnym stosowano typową technologię uprawy jęczmienia z nawożeniem mineralnym i ochroną chemiczną. Materiał siewny zaprawiano tritikonazolem i prochlorazem w dawce 4 g i 12 g s.a. 100g<sup>-1</sup> kg ziarna. Nawożenie przedsięwzięte obejmowało aplikację 70 kg N ha<sup>-1</sup>; 40 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> i 70 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup>. Na początku strzelania w źdźbło, w celu ochrony przed chwastami zastosowano mieszaninę 2,4-D, florasulamu i pinoksadenu (180 + 3,75 + 40 g s.a. ha<sup>-1</sup>). Ochrona przed chorobami grzybowymi obejmowała dwa zabiegi - w fazie pierwszego kolanka (BBCH 31) tiofanat metylowy (700 g s.a. ha<sup>-1</sup>) oraz w fazie grubienia pochwy liścia flagowego (BBCH 41-49) protiokonazol i tebukonazol (125 + 125 g s.a. ha<sup>-1</sup>). W fazie liścia flagowego zastosowano cypermetrynę (25 g s.a. ha<sup>-1</sup>) w celu zwalczania skrzypionki zbożowej. Zbiór przeprowadzono między 21 a 31 lipca, w fazie pełnej dojrzałości, przy wilgotności ziarna 14%.

### 5.3. Warunki pogodowe

Warunki pogodowe w okresie wegetacji jęczmienia były zróżnicowane w latach badań. Rok 2021 w porównaniu do 2022 był wyraźnie chłodniejszy w okresie od 21 kwietnia do 10 maja i cieplejszy w okresach od 1 do 20 czerwca oraz od 1 do 20 lipca (Ryc. 2). W drugiej i trzeciej dekadzie kwietnia w 2021 roku obserwowano silne spadki temperatury przy gruncie, sięgające w okresie wschodów do -7,0 °C [P1]. W 2022 r., w tym samym okresie, minimalna temperatura powietrza przy gruncie oscylowała w granicach od -2,1 do 6,2 °C.

Sumaryczna ilość opadów w sezonie wegetacyjnym (III – VII) 2021 r. wyniosła 208,5 mm, natomiast w 2022 r. zaledwie 131,7 mm. W marcu 2021 r. suma opadów wyniosła 21,4 mm, natomiast w tym samym miesiącu 2022 wyniosła tylko 0,5 mm. Wyraźnym deficytem opadów charakteryzował się również okres od 21 kwietnia do 31 maja 2022 r., w którym suma opadów wyniosła zaledwie 25,4 mm. W analogicznym okresie 2021 opad był prawie 3 razy większy i wynosił 75,5 mm. Przed zbiorem jęczmienia (21 – 31 czerwca) opady deszczu w obu latach nie przekroczyły 6 mm.

Na podstawie sumy średnich dobowych temperatur powietrza i sumy opadów obliczono współczynnik hydrotermiczny Sielianinowa (k) [Selyaninov 1928] [P1] dla poszczególnych dekad, według następującego wzoru:

$$k = \frac{P \cdot 10}{\sum t}$$

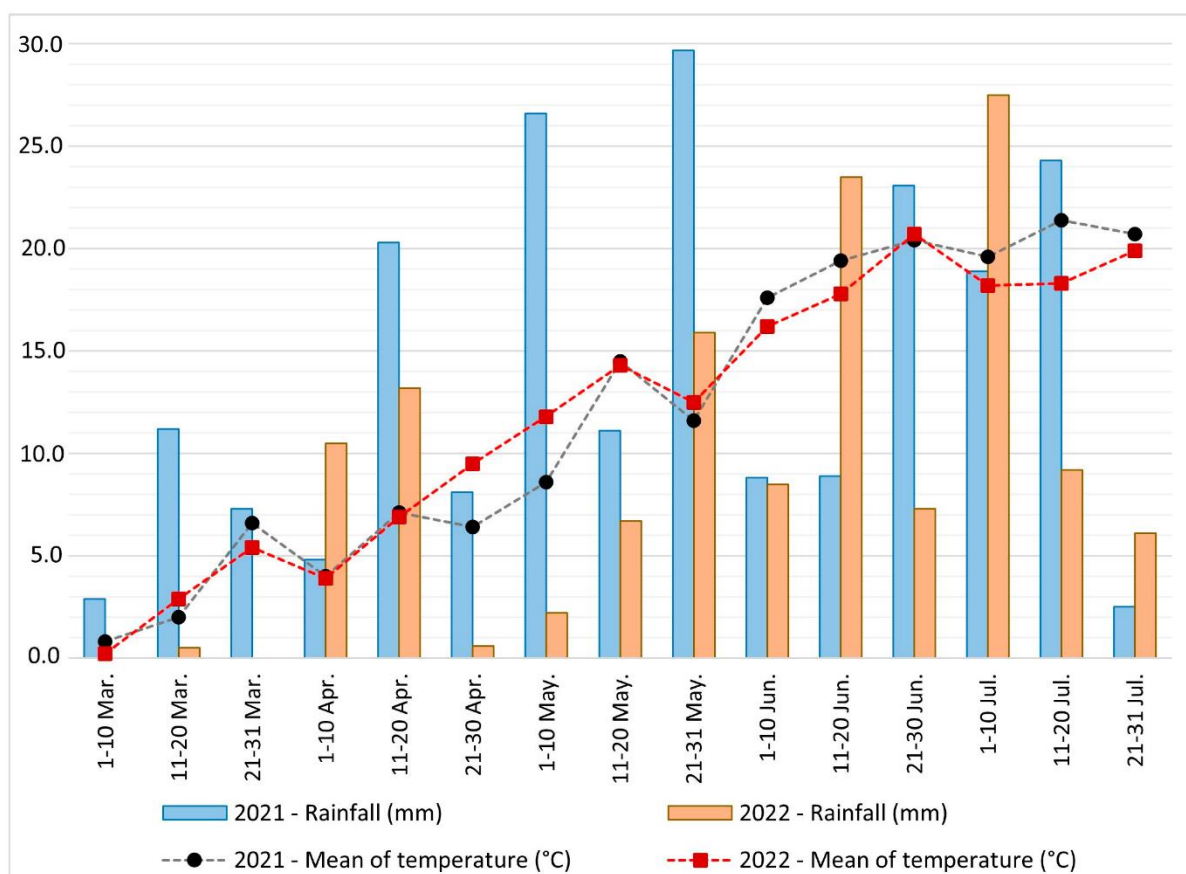
gdzie:

- P - suma opadów w mm;
- $\sum t$  - suma średnich dziennych temperatur powietrza > 0 °C



Na podstawie wartości tego współczynnika analizowane okresy zostały sklasyfikowane [Kuklik i in. 2016] jako:

- skrajnie suchy lub bardzo suchy -  $k \leq 0,7$ ;
- suchy lub dość suchy -  $0,7 < k \leq 1,3$ ;
- optymalny lub dość wilgotny -  $-1,3 < k \leq 2,0$ ;
- wilgotny, bardzo wilgotny lub ekstremalnie wilgotny -  $k > 2,0$ .



Ryc. 2. Warunki hydrotermiczne (temperatura powietrza i opady deszczu) w okresie wegetacji jęczmienia jarego w latach 2021-2022 [P1].

## 5.4. Pomiary cech biometrycznych i fizjologicznych

### 5.4.1. Fluorescencja chlorofilu

Pomiary bezpośredniej fluorescencji chlorofilu *a* u roślin jęczmienia przeprowadzono w trzech terminach: 1 – w fazie drugiego liścia właściwego (BBCH 12), w trzeciej dekadzie kwietnia, 2 – w fazie liścia flagowego (BBCH 39), w trzeciej dekadzie maja oraz 3 – w fazie pełni kłoszenia (BBCH 55), w drugiej dekadzie czerwca. Badania wykonano z wykorzystaniem fluorymetru Pocket PEA (Pocket Plant Efficiency Analyzer) (Hansatech Instruments, United Kingdom). Pomiary bezpośredniej fluorescencji chlorofilu prowadzono na powierzchni 4 mm<sup>2</sup> w środkowej części dojrzałej blaszki liściowej, na najmłodszym w pełni rozwiniętym liściu tj. na liściu pierwszym w fazie BBCH 12, na liściu podflagowym w fazie BBCH 39 oraz na liściu flagowym w fazie BBCH 55. Do wygaszenia fazy jasnej fotosyntezy wykorzystano klipsy,

które blokowały dopływ światła do badanej próbki na okres 30 minut przed pomiarem. Pomiar wykonano według zaleceń producenta aparatu, przy natężeniu impulsu światła  $3500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  i czasie jego trwania 1 s. W zależności od terminu wykonano 60-80 pomiarów dla każdego z genotypów. Mierzono następujące parametry:  $F_0$  – fluorescencję początkową,  $F_M$  – fluorescencję maksymalną,  $F_V = F_M - F_0$  – fluorescencję zmienną,  $F_V/F_M$  – maksymalną wydajność PSII,  $PI_{\text{ABS}}$  (PI) – wskaźnik funkcjonowania PSII, Area – pole powierzchni nad krzywą indukcji fluorescencji chlorofilu. Szczegółową analizę mierzonych sygnałów fluorescencji chlorofilu przeprowadzono również wykorzystując test OJIP, z wykorzystaniem którego oznaczono fenomenologiczne strumienie energii w przeliczeniu na powierzchnię badanej próbki – CS:

- $ABS/CS$  - absorpcja energii wzbudzenia przez próbkę fotosyntetyzującą (CS) w czasie zero ( $t = 0$ ),
- $TR_O/CS = \phi_{\text{PO}} (ABS/CS)$  - pojemność zaabsorbowanej energii wzbudzenia przez próbkę fotosyntetyzującą PSII (CS), w czasie zero ( $t = 0$ ),
- $ET_O/CS = \phi_{\text{EO}} (ABS/CS)$  - transport elektronów PSII fotosyntetyzującej próbki (CS), w czasie zero ( $t = 0$ ),
- $DI_O/CS = (ABS/CS) - (TR_O/CS)$  - ilość energii rozproszonej w postaci ciepła przez PSII fotosyntetyzującej próbki (CS), w czasie  $t = 0$ ,
- $PI_{\text{abs}}$  - wskaźnik funkcjonowania PSII w odniesieniu do absorpcji.

#### 5.4.2. Wskaźniki powierzchni asymilacyjnej (LAI) i indeks zieloności liści (SPAD)

W okresie wegetacji LAI (wskaźnik powierzchni liści) mierzono dwukrotnie, w fazie liścia flagowego (BBCH 39) i w fazie pełni kłoszenia (BBCH 55), przy użyciu urządzenia SunScan Canopy Analysis System (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, Wielka Brytania). Sonda urządzenia o długości 1 m, wyposażona w 64 czujniki PAR, została umieszczona w łanie rośliny tuż nad powierzchnią gleby. W tym samym czasie drugi czujnik mierzący promieniowanie bezpośrednie i rozproszone został umieszczony powyżej łanu roślin. Pomiary promieniowania były przesyłane z sondy i czujnika do terminala PDA, który konwertował i rejestrował wartości kwantowe promieniowania na powierzchnię liści, wyrażoną w  $\text{m}^2$  powierzchni liści  $\text{m}^{-2}$  gleby.

W tych terminach, jak również w fazie drugiego liścia (BBCH 12) indeks SPAD został określony na 30 najmłodszych liściach, w 16 powtórzeniach dla każdego genotypu, przy użyciu urządzenia Minolta N-tester (Konica Minolta, Osaka, Japonia). Centralna część blaszki liściowej została umieszczona w klipsie urządzenia, które było wyposażone w źródło światła po jednej stronie i fotodetektor po drugiej stronie blaszki liściowej. Gdy klips był zamknięty, źródło światła świeciło przez liść, a ilość światła o długości fali 650 nm i 940 nm, która przeszła przez blaszkę liściową, była odczytywana przez fotodetektor, który wskazywał ilość światła pochłoniętego przez chlorofil. Na tej podstawie urządzenie obliczało ilość chlorofilu w badanej próbce wyrażoną w jednostkach SPAD.

#### 5.4.3. Ocena cech biometrycznych i plonowania

W fazie kwitnienia (BBCH 59) określono suchą masę pędów nadziemnych, na kolejnych roślinach zebranych z rzędu o długości odpowiadającej powierzchni  $0,5 \text{ m}^2$ , na każdym poletku. Następnie w fazie dojrzałości pełnej (BBCH 89) na każdym poletku doświadczalnym wyznaczono powierzchnię  $1 \text{ m}^2$  i określono liczbę kłosów płodnych (z ziarniakami) i płonnych

(kłosy bez ziarniaków). W tej samej fazie rozwojowej z każdego poletka losowo zebrano 30 kłosów, na których obliczono liczbę ziaren w kłosie. Rośliny z poletek doświadczalnych zbierano za pomocą kombajnu poletkowego Winterstaiger Classic (Winterstaiger, Austria). Plon ziarna oraz plon słomy oznaczono metodą wagową po zbiorze, następnie na podstawie tych parametrów obliczono wielkość biomasy nadziemnej w fazie dojrzałości pełnej oraz stosunek plonu ziarna do plonu słomy przedstawiony jako indeks żniwny (HI – *ang.* harvest index). Masa 1000 ziaren została określona na podstawie próbek pobranych po osiągnięciu stałej wilgotności ziarna wynoszącej 12%, na podstawie 500 sztuk, w dwóch powtórzeniach każdego obiektu.

## 5.5. Analiza składu chemicznego ziarna

### 5.5.1. Oznaczenie kwasów fenolowych

Zawartość kwasów fenolowych: kwasu galusowego (GA), kwasu 2,5-dihydroksobenzoesowego (2, 5-DHBA), kwasu 4-dihydroksobenzoesowego (p-HBA), kwasu protokatechowego (PCA), kwasu syringowego (SYA), kwasu p-kumarowego (p-CA), kwasu chlorogenowego (CGA), kwasu kawowego (CA), kwasu synaptycznego (SA), kwasu ferulowego (FA), oznaczono zgodnie z opisem Stuper-Szablewskiej i in. [2019]. Zmielone próbki ziarna o masie 0,2 g poddano hydrolizie alkalicznej w 4 ml 2M wodnego roztworu wodorotlenku sodu, a następnie hydrolizie kwasowej w 2 ml 6M wodnego roztworu kwasu solnego. Kwasy fenolowe ekstrahowano z fazy nieorganicznej eterem dietylowym (2 x 2 ml). Następnie przeprowadzono hydrolizę kwasową ekstraktów eterowych w 3 ml 6M wodnego roztworu kwasu solnego. Otrzymane ekstrakty eterowe odparowano do sucha w strumieniu azotu, a następnie rozpuszczono w 1 ml metanolu. Analizę chromatograficzną przeprowadzono przy użyciu wysokosprawnego chromatografu cieczowego Waters SDS 501 (Waters, Milford, MA, USA) z detektorem Waters 486 Tunable Absorbance Detector (Waters, Milford, MA, USA). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie RP C-18, 250 x 4 mm x 5  $\mu\text{m}$ . Jako fazę elucyjną zastosowano mieszaninę acetonitrylu 0,2% (v/v) HCOOH w H<sub>2</sub>O (gradient). Pomiar przeprowadzono przy długości fali  $\lambda = 320$  i 280 nm. Identyfikacja związków polegała na porównaniu czasu retencji badanego piku z czasem retencji wzorca (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Analizowano tylko związaną frakcję kwasów fenolowych.

### 5.5.2. Oznaczanie flawonoidów

Skład flawonoidów oznaczono metodą opisaną w pracy Kobus i in. [2022]. Wyekstrahowane flawonoidy rozdzielono i zidentyfikowano za pomocą Agilent UPLC wyposażonego w kolumnę z odwróconymi fazami Nova-Pak C18 (3,9 x 150 mm, rozmiar cząstek 5  $\mu\text{m}$ ; obie firmy Waters, Milford, MA, USA). Rozpuszczalnikiem A był 0,3% (v/v) HCOOH w H<sub>2</sub>O, natomiast rozpuszczalnikiem B był acetonitryl o czystości HPLC. Szybkość przepływu rozpuszczalników utrzymywano na poziomie 1 ml/min. Profil gradientu był następujący: 85% A w 0 minucie i 25% A w 40 minucie. Faza ruchoma elucji gradientowej była następująca: A, acetonitryl z 0,1% kwasem mrówkowym; i B, 1% wodna mieszanina kwasu mrówkowego (pH = 2). Chromatogramy rejestrowano przy użyciu detektora UV-Vis przy  $\lambda = 370$  nm. Rozdzielone związki zidentyfikowano na podstawie mapowania czasu retencji przy użyciu zestawu wzorców. Ilość następujących flawonoidów oznaczono przy użyciu roztworów wzorcowych (0,001-0,01  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) poszczególnych związków (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Oznaczono siedem flawonoidów: naringeninę, witaksynę, rutynę, kwercyтынę, apigeninę, kampferol i luteinę.

### 5.5.3. Oznaczenie karotenoidów

Ekstrakty karotenoidów otrzymano ze zmielonych nasion (0,4 mg), które rozcierano mieszaniną acetonu i eteru (1:1). Następnie, po oddzieleniu tkanki roślinnej, aceton i frakcję hydrofilową usunięto z ekstraktu przez przemywanie wodą. Wynikiem był ekstrakt eterowy z mieszaniną pigmentów karotenoidowych. Tak przygotowany ekstrakt zatężano w wyparce próżniowej w temperaturze 35°C do uzyskania oleistej pozostałości, a następnie trawiono w 2 ml metanolu (Merck, Rahway, NJ, USA) i poddawano analizie chromatograficznej. Luteinę, zeaksantynę i  $\beta$ -karoten oznaczono przy użyciu Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) z detektorem Waters Acquity PDA (Waters, USA). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Acquity UPLC® BEH C18 (100 mm  $\times$  2,1 mm, wielkość cząstek 1,7  $\mu$ m) (Waters, Milford, MA, USA). Elucję przeprowadzono przy użyciu rozpuszczalnika - metanolu, wody i eteru tert-butylo-metylowego (TBME). Zastosowano gradient przy przepływie 0,4 ml min<sup>-1</sup>. Kolumna i próbki były termostatowane, temperatura kolumny wynosiła 30°C, a temperatura testowa 10°C. Podczas analizy roztwory były odgazowywane w aparacie Waters. Objętość iniekcji wynosiła 10  $\mu$ L. Odczyt przeprowadzono przy długości fali  $\lambda = 445$  nm. Identyfikację związków oparto na widmach w zakresie od 200 do 600 nm, a czasy retencji porównano ze standardami.

### 5.5.4. Oznaczenie wolnych kwasów tłuszczowych

Próbki (100 mg) umieszczono w probówkach hodowlanych o pojemności 17 ml, zawieszono w 2 ml metanolu, potraktowano 0,5 ml 2 M wodnego wodorotlenku sodu i szczelnie zamknięto. Proces zmydlenia przeprowadzono przy użyciu promieniowania mikrofalowego o częstotliwości 2450 MHz i maksymalnej mocy wyjściowej 900 W. Próbki napromieniowywano (370 W) przez 20 s, a po ok. 5 min. przez kolejne 20 s. Po 15 min. zawartość probówek neutralizowano 1 M wodnym kwasem solnym, dodawano 2 mL MeOH i przeprowadzano ekstrakcję pentanem (3-4 mL) wewnątrz probówek. Ekstrakty pentanu odparowano do sucha w strumieniu azotu. W kolejnym etapie ekstrakty poddano metylacji przy użyciu mieszaniny bezwodnego metanolu i kwasu siarkowego (1:5, v/v). Do ekstraktu zawierającego lipidy dodano 0,5 ml metanolu, a następnie 0,15 ml mieszaniny metanolu i kwasu siarkowego (1:5, v/v). Próbki ogrzewano w temperaturze 70 °C przez 15 minut. Po schłodzeniu roztworu dodano 0,5 ml n-heksanu, a następnie dodano wystarczającą ilość wody, aby utworzyć dwie warstwy. Górną warstwę heksanu usunięto i poddano analizie w systemie UPLC klasy Acquity H wyposażonym w detektor Waters Acquity PDA (Waters, USA). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Acquity UPLC® BEH C18 (150 mm  $\times$  2,1 mm, wielkość cząstek 1,7  $\mu$ m) (Waters, Irlandia). Elucję przeprowadzono jako gradient przy użyciu następującego składu fazy ruchomej: A: acetonitryl; B: 2-propanol, przepływ 0,17 mL min<sup>-1</sup>. Pomiar stężeń steroli przeprowadzono przy użyciu zewnętrznego wzorca przy długości fali  $\lambda = 195-300$ . Związki zidentyfikowano na podstawie porównania czasów retencji badanego piku z czasem retencji wzorca oraz poprzez dodanie określonej ilości wzorca do badanej próbki i powtórzenie analizy.

### 5.5.5. Oznaczenie antocyjanidyn

Ekstrakty antocyjanidyn otrzymano ze zmielonych nasion (5 g), które rozcierano z mieszaniną roztworu etanolowego (70%) i acetonu (1:1). Następnie, po oddzieleniu tkanki roślinnej poprzez filtrację i odwirowanie, antocyjanidyny zostały oddzielone od pozostałych barwników na kolumnkach SPE. Tak przygotowany ekstrakt zatężono w wyparce próżniowej

w temperaturze 35°C, rozpuszczono w 1 ml metanolu (Merck) i poddano analizie chromatograficznej. Analizowano następujące związki: delfinidynę, luteolinidynę, malwinidynę, peonidynę, petunidynę, rosinidynę, aurantinidynę, cyjanidynę. Antocyjanidyny oznaczono przy użyciu Acquity UPLC (Waters, USA) z detektorem Waters Acquity PDA (Waters, USA). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Acquity UPLC® BEH C18 (150 mm x 2,5 mm, wielkość cząstek 1,8 µm) (Waters, Irlandia). Elucję przeprowadzono przy użyciu rozpuszczalnika A - metanolu, wody B i acetonitrylu C. Jako fazę elucyjną zastosowano mieszaninę acetonitrylu 0,2% (v/v) HCOOH w H<sub>2</sub>O (gradient). Gradient stosowano przy przepływie 0,4 ml/min. Kolumna i próbki były termostatowane, temperatura kolumny wynosiła 30°C, a temperatura testu 10°C. Podczas analizy, roztwory były odgazowywane w aparacie Waters. Związki zidentyfikowano na podstawie widm w zakresie od 200 do 600 nm i czasów retencji w porównaniu do wzorców.

### 5.5.6. Oznaczenie fitomelaniny

Analizę zawartości fitomelaniny przeprowadzono w oparciu o protokół analityczny zaproponowany przez firmę Merck [<https://www.sigmaaldrich.com>], z własnymi modyfikacjami. Ekstrakty fitomelaniny otrzymano ze zmieszanych nasion (5 g), które rozcierano z wodnym roztworem alkoholu etylowego (60%). Następnie, po oddzieleniu tkanki roślinnej poprzez filtrację i odwirowanie, separację fitomelaniny od pozostałych barwników przeprowadzono na kolumnkach SPE. Tak przygotowany ekstrakt zatężano w wyparce próżniowej w temperaturze 35°C, rozpuszczano w 1 ml metanolu (Merck) i poddawano analizie chromatograficznej. Fitomelaninę oznaczano przy użyciu Acquity UPLC (Waters, USA) z detektorem Waters Acquity PDA (Waters, USA). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Acquity UPLC® BEH C18 (250 mm x 2,5 mm, wielkość cząstek 1,5 µm) (Waters, Irlandia). Elucję przeprowadzono przy użyciu rozpuszczalnika A - metanolu, wody B i acetonitrylu C. Zastosowano gradient przy przepływie 0,4 ml/min. Związek zidentyfikowano na podstawie czasów retencji w porównaniu do wzorców.

### 5.5.7. Ocena potencjału antyoksydacyjnego

Zmiatanie wolnych rodników przy użyciu stabilnego rodnika ABTS<sup>+</sup> (kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)) przeprowadzono zgodnie z modyfikacją ulepszonej metody ABTS<sup>+</sup> opisanej przez Zhou i wsp. [2018]. Test spektrofotometryczny przeprowadzono na 96-dołkowych płytkach. Ekstrakt (10 µl) lub etanol (10 µl, kontrola) dodawano do 195 µl roztworu rodnika ABTS<sup>+</sup> i pozostawiano na 30 minut, aż do uzyskania stabilnego odczytu absorbancji. Spadek absorbancji przy 734 nm mierzono względem próby ślepej (etanol).

## 5.6. Analiza statystyczna

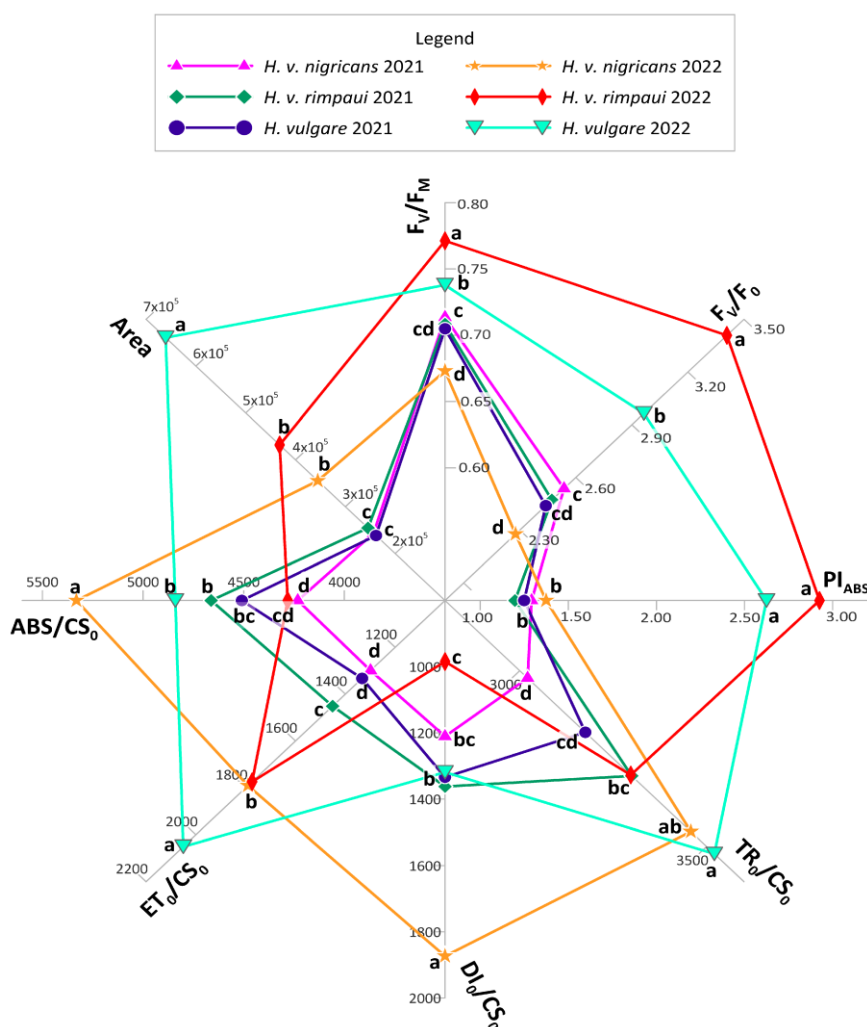
Wyniki przedstawione w publikacji [P1] i [P3] analizowano za pomocą jednowymiarowej dwuczynnikowej, a w publikacji [P2] trójczynnikowej analizy wariancji. Różnice pomiędzy średnimi testowano za pomocą testu HSD Tucke'a przy  $p = 0,05$ . Wykres radarowy przedstawiony w publikacji [P1] opracowany został w programie Grapher (Golden Softwear, USA). Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie ± odchylenie standardowe. Przeprowadzono również analizę korelacji prostej Pearsona, hierarchiczną analizę skupień [P2] i analizę głównych składowych (PCA). Wszystkie obliczenia wykonano przy użyciu pakietu statystycznego Statistica PL 13.0 (StatSoft, Kraków, Polska) [P2].

## 6. Wyniki

### 6.1. Cechy fizjologiczne

#### 6.1.1. Fluorescencja chlorofilu

Pierwszy pomiar fluorescencji chlorofilu przeprowadzony na siewkach jęczmienia w stadium BBCH 12 wykazał istotne różnice w efektywności funkcjonowania aparatu fotosyntetyzującego pod wpływem interakcji roku badań i genotypu ( $p \leq 0,05$ ) [P1]. W pierwszym sezonie badań, dla większości parametrów oznaczanych w stadium siewki, nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy *H. vulgare* a alternatywnymi genotypami jęczmienia (*H. v. var. nigricans* i *H. v. var. rimpaui*). Istotne różnice zaobserwowano jedynie w indeksie  $ET_0/CS_0$ , który był istotnie wyższy u *H. v. var. rimpaui* niż u pozostałych genotypów. Dodatkowo genotypy alternatywne różniły się od siebie w 2021 roku pod względem parametrów  $ABS/CS_0$  i  $TR_0/CS_0$ , które były istotnie większe u *H. v. var. rimpaui* niż u *H. v. var. nigricans* (Ryc. 3).



Ryc. 3. Parametry fluorescencji chlorofilu w liściach siewek *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaui*, and *H. vulgare*. a–d — wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$  [P1].

W drugim roku badań obserwowano znacznie większe zróżnicowanie między genotypami. Większe wartości wskaźników  $F_v/F_0$ ,  $F_v/F_m$  i  $PI_{ABS}$  w 2022 r. odnotowano u *H. v.*

var. *rimpaii*. Pierwsze dwa parametry były istotnie większe u *H. v. var. rimpaii* niż u pozostałych genotypów, podczas gdy  $PI_{ABS}$  był istotnie większy u *H. v. var. rimpaii* tylko w porównaniu z *H. v. var. nigricans*. W drugim roku badań genotyp jęczmienia współczesnego charakteryzował się istotnie wyższą powierzchnią (Area),  $ET_0/CS_0$  i  $TR_0/CS_0$  niż genotypy alternatywne. *H. v. var. nigricans* w 2022 r. wykazywał największe wartości wskaźników  $DI_0/CS_0$  i  $ABS/CS_0$  w porównaniu z pozostałymi genotypami. Wartości tych parametrów były istotnie większe dla tego genotypu o 42,1% i 10,2% w porównaniu z *H. vulgare* oraz 90,3% i 24,5% niż u *H. v. var. rimpaii* (Ryc. 3).

Tabela 1. Parametry fluorescencji chlorofilu liści podflagowego i flagowego *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii* i *H. vulgare* [P1].

Rok	Genotyp	$F_v/F_M$	$F_v/F_0$	$PI_{ABS}$
Liść podflagowy				
2021	<i>H. v. nigricans</i>	0,789 c ± 0,007	3,78 c ± 0,172	2,05 d ± 0,163
	<i>H. v. rimpaii</i>	0,789 c ± 0,013	3,84 c ± 0,183	1,93 d ± 0,266
	<i>H. vulgare</i>	0,806 ab ± 0,014	4,25 ab ± 0,176	3,96 c ± 0,518
2022	<i>H. v. nigricans</i>	0,815 a ± 0,004	4,42 a ± 0,118	5,14 b ± 0,635
	<i>H. v. rimpaii</i>	0,797 bc ± 0,013	3,96 c ± 0,288	4,04 c ± 0,714
	<i>H. vulgare</i>	0,806 ab ± 0,009	4,18 b ± 0,234	5,82 a ± 1,28
Liść flagowy				
2021	<i>H. v. nigricans</i>	0,835 a ± 0,015	4,94 a ± 0,076	5,10 c ± 0,583
	<i>H. v. rimpaii</i>	0,827 ab ± 0,006	4,79 a ± 0,188	5,90 bc ± 1,09
	<i>H. vulgare</i>	0,805 cd ± 0,009	4,16 c ± 0,234	4,84 c ± 0,422
2022	<i>H. v. nigricans</i>	0,808 cd ± 0,007	4,25 bc ± 0,220	6,36 b ± 1,06
	<i>H. v. rimpaii</i>	0,790 d ± 0,029	3,71 d ± 0,421	5,08 c ± 1,44
	<i>H. vulgare</i>	0,811 bc ± 0,026	4,47 b ± 0,250	7,51 a ± 1,39

a-d - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; "±" odnosi się do odchylenia standardowego.

Na fluorescencję chlorofilu w liściach podflagowym i flagowym, opisaną parametrami takimi jak  $F_v/F_M$ ,  $F_v/F_0$ , lub  $PI_{ABS}$ , miała wpływ interakcja roku badań i genotypu ( $p \leq 0,05$ ) [P1]. W 2021 r. wartości  $F_v/F_M$  i  $F_v/F_0$  oceniane na liściu podflagowym były znacznie większe u *H. vulgare* niż u alternatywnych genotypów jęczmienia (*H. v. var. nigricans* i *H. v. var. rimpaii*) (Tabela 1). W 2022 tylko  $F_v/F_0$  miał większą wartość u *H. vulgare* niż u *H. v. var. rimpaii*. W 2021 r. wskaźniki  $F_v/F_M$  i  $F_v/F_0$  pierwotnych genotypów były podobne, podczas gdy w 2022 r. *H. v. var. nigricans* charakteryzował się większymi wartościami tych parametrów w porównaniu z *H. v. var. rimpaii*.

Analiza wskaźników  $F_v/F_M$  i  $F_v/F_0$  wskazuje na odmienną reakcję badanych genotypów niż wcześniej opisaną dla parametrów mierzonych na liściu podflagowym (Tabela 1). W 2021 r. alternatywne genotypy jęczmienia charakteryzowały się większymi wartościami parametrów  $F_v/F_M$  i  $F_v/F_0$  niż jęczmień zwyczajny (*H. vulgare*). W 2022 r. wartości tych wskaźników były

podobne u *H. v. var. nigricans* i *H. vulgare*. W tym samym roku wartość parametru  $F_V/F_0$  w jęczmieniu kapturkowym (*H. v. var. rimpai*) była najmniejsza wśród badanych genotypów, a wartość wskaźnika  $F_V/F_M$  była znacznie mniejsza tylko w porównaniu z *H. vulgare* (Tabela 1).

Pomiary wskaźnika witalności PSII ( $PI_{ABS}$ ) na liściu podflagowym w 2021 r. oraz liściach podflagowym i flagowym w 2022 r. wykazały zwiększoną wartość tego wskaźnika w jęczmieniu zwyczajnym (*H. vulgare*) w porównaniu z alternatywnymi genotypami jęczmienia (*H. v. var. nigricans* i *H. v. var. rimpai*) (Tabela 1). *H. v. rimpai* charakteryzował się mniejszymi wartościami  $PI_{ABS}$  liścia podflagowego i flagowego w 2022 roku. Nie było różnic w parametrze  $PI_{ABS}$  między genotypami w analizie liści flagowych 2021.

### 6.1.2. Wskaźnik powierzchni asymilacyjnej liści (LAI) i indeks zieloności liścia (SPAD)

Pomiary LAI prowadzone w fazach BBCH 35 i BBCH 57 wskazują, że wskaźnik ten był średnio dla badanych genotypów odpowiednio o 71,4 i 19,9% większy w 2021 r. w porównaniu z 2022 r. (Tabela 2). Obserwowany był również istotny wpływ interakcji rok x genotyp w kształtowaniu wskaźnika powierzchni liści (LAI).

Tabela 2. Wskaźnik powierzchni liści (LAI) *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpai* i *H. vulgare* w fazie liścia podflagowego (BBCH 35) i w fazie kłoszenia (BBCH 57) [P1].

Rok	Genotyp	LAI w BBCH 35	LAI w BBCH 57
2021	<i>H. v. nigricans</i>	3,49 b ± 0,733	3,00 b ± 0,515
	<i>H. v. rimpai</i>	4,51 a ± 0,516	3,14 a ± 0,598
	<i>H. vulgare</i>	2,50 c ± 0,539	2,34 c ± 0,268
2022	<i>H. v. nigricans</i>	1,76 de ± 0,261	2,44 c ± 0,530
	<i>H. v. rimpai</i>	2,03 d ± 0,382	2,55 bc ± 0,421
	<i>H. vulgare</i>	1,46 e ± 0,253	2,08 c ± 0,560

a-d - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; "±" odnosi się do odchylenia standardowego

W 2021 r. wskaźnik LAI jęczmienia kapturkowego (*H. v. var. rimpai*) był większy w porównaniu z *H. v. nigricans* i *H. vulgare* zarówno w fazie liścia flagowego, jak i kłoszenia. W 2022 r. wartość LAI *H. v. var. rimpai* była znacznie większa tylko w porównaniu do 'Soldo' *H. vulgare* w fazie liścia podflagowego (Tabela 2). W 2022 roku LAI porównywanych genotypów czarnego jęczmienia nie różniło się znacząco w obu analizowanych fazach rozwoju jęczmienia.

Wskaźnik zieloności liścia (SPAD), średnio dla badanych genotypów był większy w 2022 r. niż w 2021 r., o 10,3% w fazie siewki, o 36,1% na fazieliścia podflagowego i o 38,1% w fazie kłoszenia (Tabela 3).

Zarówno w 2021 r. jak i w 2022 r. *H. vulgare* w fazie siewki (BBCH 12) charakteryzował się wyższymi wartościami wskaźnika SPAD niż *H. v. var. rimpai*. W fazie liścia podflagowego (BBCH 35) i w fazie kłoszenia (BBCH 57) wykazano istotny wpływ interakcji genotyp x rok badań na ten parametr. W 2021 r. SPAD w fazie liścia podflagowego (BBCH 35) był on istotnie większy u jęczmienia zwyczajnego (*H. vulgare*) w porównaniu z *H. v. var. nigricans* i *H. v. rimpai* (Tabela 3). Z kolei pomiar w tym samym roku w BBCH 57



wskazywał na mniejsze wartości tego wskaźnika u *H. vulgare* w porównaniu z *H. v. var. nigricans*. Analiza SPAD w 2022 r. w obu fazach rozwoju roślin (BBCH 35 i BBCH 57) nie wykazała znaczących różnic między genotypami.

Tabela 3. Indeks zieloności liścia (SPAD) w fazie siewki (BBCH 12), liścia podflagowego (BBCH 35) i w kłoszenia (BBCH 57) *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii* i *H. vulgare* [P1].

Rok	Genotyp	SPAD BBCH 12	SPAD BBCH 35	SPAD BBCH 57
2021	<i>H. v. nigricans</i>	345,9 b ± 75,6	310,3 c ± 7,83	457,4 b ± 21,76
	<i>H. v. rimpaii</i>	285,6 c ± 53,13	324,0 c ± 13,4	470,9 b ± 20,7
	<i>H. vulgare</i>	381,4 b ± 52,4	404,4 b ± 13,1	370,8 c ± 85,1
2022	<i>H. v. nigricans</i>	383,1 b ± 37,6	470,7 a ± 25,1	590,9 a ± 59,00
	<i>H. v. rimpaii</i>	352,3 b ± 46,4	456,7 a ± 29,4	571,5 a ± 47,1
	<i>H. vulgare</i>	465,9 a ± 35,9	486,3 a ± 56,3	590,1 a ± 48,9

a-d - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; "±" odnosi się do odchylenia standardowego

## 6.2. Cechy biometryczne i plonowanie roślin

W 2021 r. ilość suchej masy pędów w fazie kwitnienia wszystkich analizowanych genotypów była podobna i znacznie większa (o 28,5%) w porównaniu z 2022 r. Ilość skumulowanej masy pędów alternatywnych genotypów jęczmienia (*H. v. var. nigricans* i *Hordeum v. var. rimpaii*) w 2022 r. była na ogół większa niż biomasa pędów *H. vulgare*, przy czym różnica była statystycznie istotna tylko dla *H. v. rimpaii* (Tabela 4).

Tabela 4. Sucha masa pędów nadziemnych w fazie kwitnienia, liczba kłosów płodnych i płonnych *H. vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii* i *Hordeum vulgare* [P1].

Rok	Genotyp	Sucha masa pędów nadziemnych (g m <sup>-2</sup> )	Liczba kłosów płodnych (szt. roślina <sup>-1</sup> )	Liczba kłosów płonnych (szt. m <sup>-2</sup> )
2021	<i>H. v. nigricans</i>	728,2 a ± 98,5	2,05 bc ± 0,217	8,06 c ± 8,13
	<i>H. v. rimpaii</i>	776,8 a ± 129,5	2,16 ab ± 0,250	2,56 c ± 3,27
	<i>H. vulgare</i>	775,2 a ± 111,0	2,36 a ± 0,192	1,75 c ± 1,57
2022	<i>H. v. nigricans</i>	575,1 bc ± 79,4	1,68 d ± 0,208	103,44 a ± 46,32
	<i>H. v. rimpaii</i>	678,2 ab ± 145,9	1,87 cd ± 0,271	68,88 b ± 31,73
	<i>H. vulgare</i>	558,0 c ± 127,4	1,77 d ± 0,278	75,63 b ± 26,75

a-d - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; "±" odnosi się do odchylenia standardowego.

W 2021 r. liczba kłosów płodnych z rośliny u badanych genotypów była większa niż w 2022 r. (Tabela 4). Analiza interakcji genotyp × rok wykazała, że w 2021 r. odmiana 'Soldo' *H. vulgare* wykształciła istotnie więcej kłosów płodnych z rośliny w porównaniu z *H. v. var. nigricans*, podczas gdy w 2022 r. parametr ten był podobny u wszystkich porównywanych genotypów.

Liczba pędów generatywnych na powierzchni 1 m<sup>2</sup> u poszczególnych genotypów była podobna w obu latach badań i wynosiła średnio 684 w przypadku *H. v. var. nigricans*, 685 u *H. v. var. rimpai* i 695 u *H. vulgare* (Ryc. 4). Analiza interakcji genotyp × rok wykazała, że w 2021 roku współczesna odmiana jęczmienia rozwinęła więcej pędów generatywnych na 1 m<sup>2</sup> w porównaniu z *H. v. var. nigricans*.

W 2021 r. prawie wszystkie pędy generatywne (średnio 99,4%) rozwinęły kłosa z ziarnami. W 2022 r. niektóre pędy generatywne (średnio 11,4%) miały kłosa płonne (bez ziarna). Wzrost liczby takich pędów (sterylnych pędów generatywnych) w 2022 r. odnotowano u każdego genotypu. *H. v. var. nigricans* zazwyczaj miał ich więcej niż inne genotypy, ale różnica była statystycznie istotna wyłącznie w 2022 roku (Tabela 4).

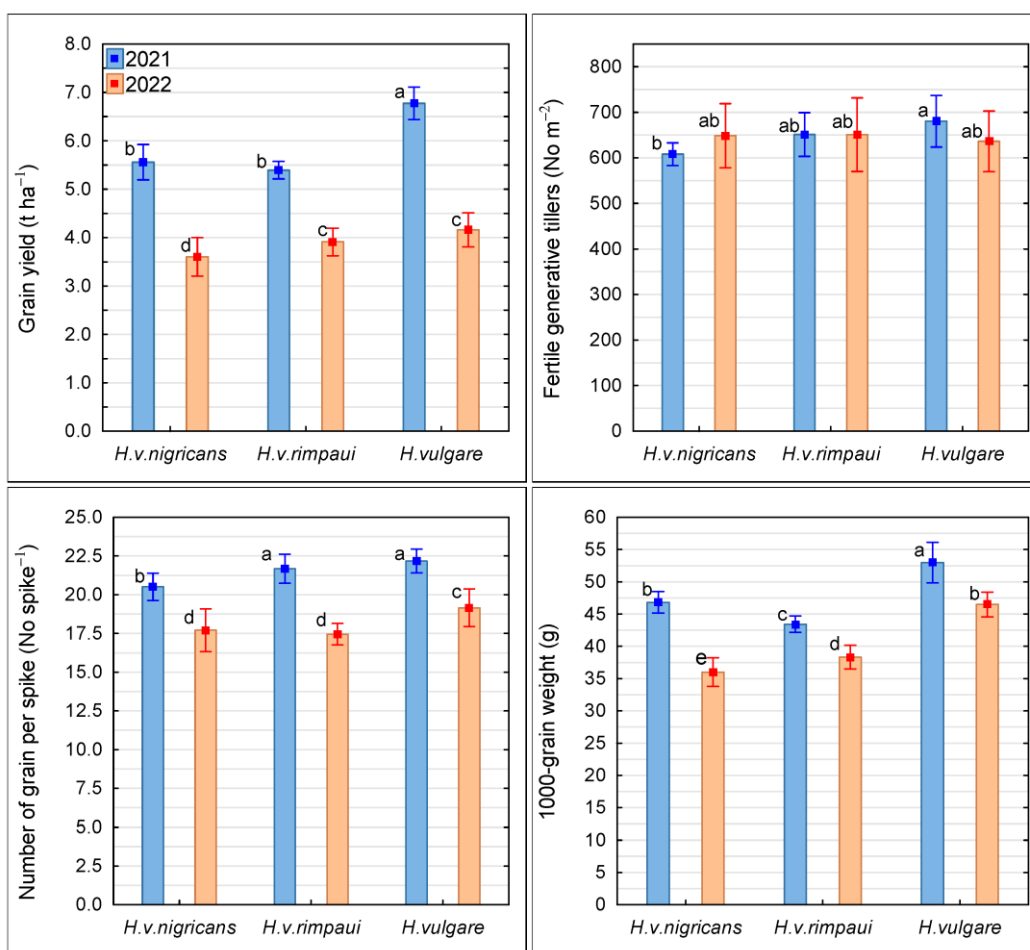
Liczba ziaren w kłosie była istotnie mniejsza w 2022 r. niż w 2021 r. (średnio o 15,6% dla genotypów). W 2021 r. liczba ziaren w kłosie *H. v. var. rimpai* i odmiany 'Soldo' *H. vulgare* była podobna i istotnie większa w porównaniu z *H. v. var. nigricans* (Ryc. 4). Jednak w 2022 roku oba alternatywne genotypy jęczmienia (*H. v. var. nigricans* i *H. v. var. rimpai*) wytworzyły mniej ziaren w kłosie w porównaniu z *H. vulgare*.

Masa tysiąca ziaren (MTZ) była mniejsza dla każdego z testowanych genotypów w 2022 r. w porównaniu z 2021 r. (średnio o 15,6%) [P1]. W 2021 r. masa tysiąca ziaren *H. v. var. nigricans* była większa niż u *H. v. var. rimpai*, z kolei w 2022 r. zależność ta była odwrotna. W obu latach badań MTZ odmiany 'Soldo' *H. vulgare* była większa niż alternatywnych genotypów jęczmienia (*H. v. var. nigricans* i *H. v. var. rimpai*) (Ryc. 4).

W przypadku każdego z badanych genotypów plon ziarna w 2021 r. był mniejszy (średnio o 34%) w porównaniu z plonem w 2022 r. W 2021 r. odmiana 'Soldo' *H. vulgare* dała znacznie większy plon ziarna w porównaniu z alternatywnymi genotypami jęczmienia. Jednak w 2022 r. plony ziarna *H. v. var. rimpai* i *H. vulgare* były podobne i znacznie większe niż plony *H. v. var. nigricans* (Ryc. 4).

Plon badanych genotypów jęczmienia w systemie konwencjonalnym w latach 2021-2022 wynosił średnio 4,92 t ha<sup>-1</sup> w konwencjonalnym systemie gospodarowania. W systemie ekologicznym był on znacznie mniejszy i wynosił 1,74 t ha<sup>-1</sup> [P3]. Plon ziarna jęczmienia zwyczajnego *H. vulgare* był istotnie większy niż *H. vulgare var. nigricans* i *H. vulgare var. rimpai* [P3]. Nalistna aplikacja biostymulatora aminokwasowego nie miała istotnego wpływu na plon ziarna badanych genotypów jęczmienia w żadnym z systemów gospodarowania [P3].

Plony słomy, jak również ziarna każdego genotypu były mniejsze w 2022 r. w porównaniu z 2021 r. (średnio o 28%). W 2021 r. masa słomy *H. v. var. rimpai* była większa niż *H. v. var. nigricans*; jednak w 2022 r. nie było znaczących różnic pomiędzy genotypami alternatywnymi. W każdym z ocenianych lat badań plon słomy był najmniejszy u współczesnej odmiany 'Soldo' *H. vulgare*.



Ryc. 4. Plon ziarna i elementy strukturalne plonowania *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpai* i *H. vulgare*. Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe. a-e-średnie wartości oznaczone różnymi literami wskazują na istotne różnice ( $p \leq 0,05$ ) [P1]

Wykazano wpływ interakcji genotyp  $\times$  rok na wartość indeksu żniwnego. W 2021 r. był on większy w porównaniu z 2022 r. w *H. vulgare* cv. 'Soldo' i *H. v.* var. *nigricans* (Tabela 5). W obu latach indeks żniwny *H. vulgare* cv. 'Soldo' był istotnie większy niż w przypadku genotypów pierwotnych. W 2021 r. *H. v.* var. *nigricans* wykazywał istotnie większą wartość tego wskaźnika niż *H. v. rimpai*.

Tabela 5. Plon słomy i indeks żniwny *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpai* i *H. vulgare* [P1].

Rok	Genotyp	Plon słomy (t ha <sup>-1</sup> )	Indeks żniwny
2021	<i>H. v. nigricans</i>	5,35 b $\pm$ 0,549	0,510 c $\pm$ 0,028
	<i>H. v. rimpai</i>	5,87 a $\pm$ 0,415	0,478 d $\pm$ 0,015
	<i>H. vulgare</i>	4,69 c $\pm$ 0,511	0,591 a $\pm$ 0,028
2022	<i>H. v. nigricans</i>	3,84 d $\pm$ 0,268	0,484 d $\pm$ 0,032
	<i>H. v. rimpai</i>	4,22 d $\pm$ 0,357	0,481 d $\pm$ 0,018
	<i>H. vulgare</i>	3,35 e $\pm$ 0,334	0,555 b $\pm$ 0,013

a-d - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; " $\pm$ " odnosi się do odchylenia standardowego.

### 6.3. Zależności pomiędzy cechami fizjologicznymi, biometrycznymi i plonowaniem

Obliczono współczynnik korelacji prostej Pearsona między parametrami fluorescencji chlorofilu ( $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ , i  $PI_{ABS}$ ) a indeksem chlorofilu (SPAD) (Tabela 6). Współczynnik korelacji dla SPAD i parametru  $PI_{ABS}$ , zarówno w BBCH 35, jak i BBCH 57, dla wszystkich trzech genotypów był dodatni, z wyjątkiem *H. v. rimpai* na etapie BBCH 57, dla którego korelacja nie była istotna. Zależność pomiędzy parametrami  $F_V/F_M$  i  $F_V/F_0$  oraz SPAD była różna w zależności od genotypu. W obu genotypach jęczmienia czarnego, w fazie BBCH 57 korelacja dla  $F_V/F_M$  i  $F_V/F_0$  oraz SPAD była ujemna (Tabela 6). Jednak pomiar we wcześniejszym etapie wzrostu (BBCH 35) wskazywał na istotną, pozytywną korelację pomiędzy tymi wskaźnikami tylko u *H. v. nigricans*.

Tabela 6. Zależności między indeksem zieloności liścia (SPAD) w fazie liścia podflagowego (BBCH 35) i w fazie kłoszenia (BBCH 57) a parametrami fluorescencji chlorofilu ( $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$  i  $PI_{ABS}$ ) dla *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpai* i *H. vulgare* (współczynniki korelacji prostej Pearsona) [P1].

Faza	Cecha	<i>H. v. nigricans</i>	<i>H. v. rimpai</i>	<i>H. vulgare</i>
SPAD				
BBCH 35	$F_V/F_M$	0,902 *	0,292	-0,007
	$F_V/F_0$	0,884 *	0,261	-0,275
	$PI_{ABS}$	0,925 *	0,853 *	0,381 *
BBCH 57	$F_V/F_M$	-0,585 *	-0,620 *	0,240
	$F_V/F_0$	-0,738 *	-0,752 *	0,615 *
	$PI_{ABS}$	0,488 *	-0,314	0,677 *

\* - istotne przy  $p \leq 0,05$

Obliczono również współczynniki korelacji dla wskaźnika powierzchni liści (LAI), cech biometrycznych i agronomicznych oraz plonu ziarna każdego genotypu (Tabela 7). Parametr LAI, oznaczony w fazie liścia podflagowego (BBCH 35), wykazał istotnie silną, pozytywną korelację z wydajnością ziarna wszystkich analizowanych genotypów. Jednak na późniejszym etapie rozwoju roślin (BBCH 57) korelacja ta była istotna tylko dla alternatywnych genotypów jęczmienia.

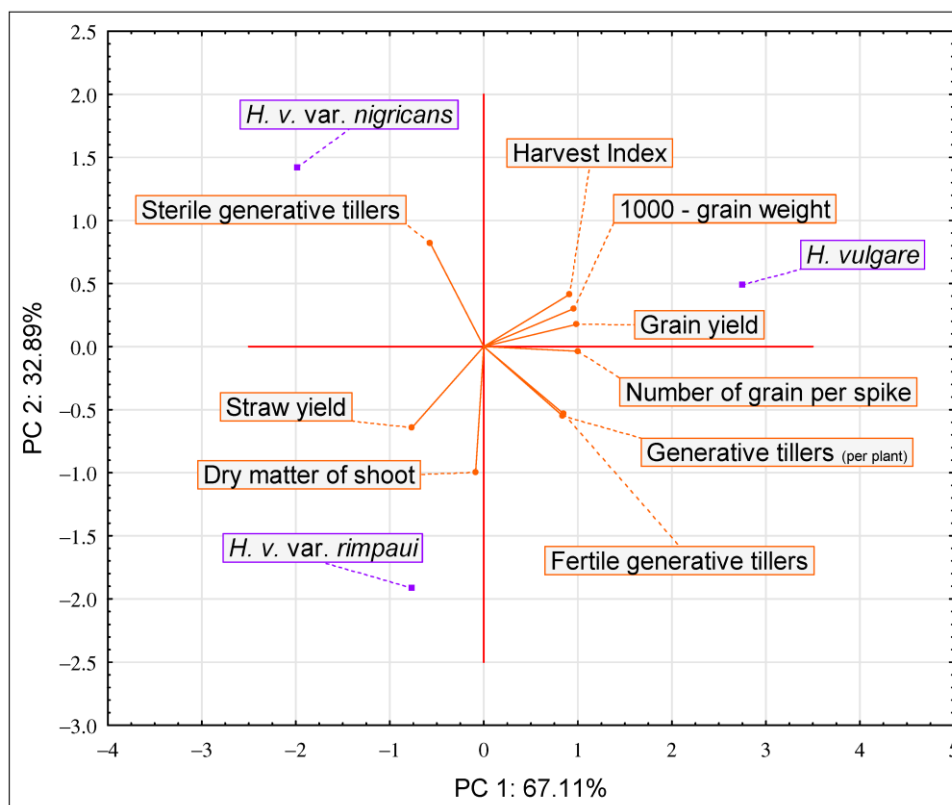
Tabela 7. Zależności między plonem ziarna a wskaźnikiem powierzchni liści (LAI) oraz cechami biometrycznymi i agronomicznymi *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpai* i *H. vulgare* (współczynniki korelacji prostej Pearsona).

Cecha	<i>H. v. nigricans</i>	<i>H. v. rimpai</i>	<i>H. vulgare</i>
LAI w BBCH 35	0,779 *	0,917 *	0,737 *
LAI w BBCH 57	0,469 *	0,561 *	0,221
Sucha masa pędów w fazie kwitnienia	0,667 *	0,378 *	0,711 *
Liczba kłosów płodnych na 1 m <sup>2</sup>	-0,248	-0,011	0,364 *
MTZ	0,917 *	0,852 *	0,827 *
Liczba ziaren w kłosie	0,834 *	0,722 *	0,915 *

\* - istotne przy  $p \leq 0,05$

Wykazano pozytywną korelację pomiędzy biomasą pędów w fazie kwitnienia a końcowym plonem ziarna, zarówno dla jęczmienia czarnego, jak i *H. vulgare* (Tabela 7). Obliczone współczynniki korelacji dla głównych składowych plonu, takich jak MTZ i liczba ziaren w kłosie dla *H. v. var. nigricans*, *H. v. var. rimpaii* i *H. vulgare*, wskazują na istotnie silny lub bardzo silny, pozytywny związek między tymi parametrami a plonem ziarna (Tabela 7).

Przeprowadzono również analizę składowych głównych (PCA) dla cech biometrycznych fizjologicznych i plonowania. Całkowita wariancja dla parametrów agronomicznych i biometrycznych została opisana w 100% przez dwie główne składowe - PC1 (67,11%) i PC2 (32,89%) (Ryc. 5). Przeprowadzona analiza wskazuje na silny związek pomiędzy plonem ziarna a masą tysiąca ziaren, liczbą ziaren w kłosie oraz indeksem żniwnym. Cechy te były zależne u odmiany współczesnej jęczmienia. Po przeciwległej stronie wykresu dla indeksu żniwnego oraz MTZ znalazły się plon słomy oraz sucha masa pędów nadziemnych, co wskazuje na ujemną korelację tych cech. Plon słomy i sucha masa pędów nadziemnych były najsilniej związane z *H. v. rimpaii*. Analiza wskazała również na związek liczby kłosów płonnych z *H. v. var. nigricans*. Wśród badanych cech liczba kłosów płonnych była w najmniejszym stopniu różnicowana przez genotyp.



Ryc. 5. Wyniki analizy składowych głównych (PCA) dla parametrów biometrycznych i plonowania *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii* i *H. vulgare* [P1].

## 6.4. Zawartość i kompozycja związków bioaktywnych w ziarnie

### 6.4.1. Zawartość i kompozycja kwasów fenolowych

W ziarniakach jęczmienia z obu systemów uprawy dominującą grupą związków fenolowych były kwasy fenolowe. W obu systemach gospodarowania średnia ich zawartość była większa w genotypach alternatywnych niż u *H. v. vulgare* [P3]. Dominującym genotypem pod

względem zawartości tych związków był *H. v. rimpai*, zwłaszcza poddany aplikacji biostymulatora (Tabela 8). Biostymulator bardzo silnie oddziaływał na kwasy fenolowe, których zawartość po jego aplikacji wzrosła średnio dla wszystkich genotypów prawie o 41% w systemie konwencjonalnym oraz o 38% w ekologicznym (Tabela 8). Jednak analiza interakcji wykazała stymulujący wpływ biostymulatora na koncentrację kwasów fenolowych jedynie w genotypach pierwotnych jęczmienia, natomiast nie było takiego wpływu u *H. v. vulgare* (Tabela 8).

Tabela 8. Zawartość związków fenolowych w ziarnie badanych genotypów jęczmienia uprawianych w konwencjonalnym i ekologicznym systemie gospodarowania [P3]

Genotyp	Czynnik	Kwasy fenolowe ogółem (mg kg <sup>-1</sup> )	Flawonoidy ogółem (mg kg <sup>-1</sup> )	Antocyjanidyny ogółem (mg kg <sup>-1</sup> )	Związki fenolowe ogółem (mg kg <sup>-1</sup> )
System konwencjonalny					
<i>H. v. nigricans</i>	B	1137 b ± 40,1	427 b ± 3,19	1,43 c ± 0,015	1565 b ± 43,9
	K	856 c ± 24,3	381 c ± 9,40	1,78 b ± 0,035	1239 c ± 33,4
<i>H. v. rimpai</i>	B	1371 a ± 54,5	555 a ± 33,7	1,89 a ± 0,053	1928 a ± 80,6
	K	777 c ± 57,1	397 bc ± 18,7	1,23 d ± 0,044	1175 c ± 60,5
<i>H. vulgare</i>	B	566 d ± 11,0	115 d ± 4,89	0,00 e ± 0,00	681 d ± 15,8
	K	552 d ± 5,03	86,6 d ± 5,07	0,00 e ± 0,00	639 d ± 8,29
System ekologiczny					
<i>H. v. nigricans</i>	B	1437 b ± 81,4	584 b ± 15,8	1,59 c ± 0,118	2023 b ± 70,2
	K	1199 c ± 18,2	604 ab ± 22,2	2,03 b ± 0,231	1805 c ± 22,8
<i>H. v. rimpai</i>	B	2102 a ± 63,3	689 a ± 75,8	2,54 a ± 0,156	2794 a ± 136,4
	K	1176 c ± 80,2	637 ab ± 14,6	1,74 bc ± 0,231	1815 bc ± 75,2
<i>H. vulgare</i>	B	845 d ± 50,8	228 c ± 12,4	0,00 d ± 0,00	1073 d ± 63,2
	K	795 d ± 58,6	184 c ± 14,1	0,00 d ± 0,00	978 d ± 57,9

a-e - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; znak ± odnosi się do odchylenia standardowego

B – aplikacja nalistna biostymulatora aminokwasowego; K – kontrola bez aplikacji

Spośród kwasów fenolowych zidentyfikowanych w analizowanym ziarnie dominował kwas ferulowy, nieco mniej było kwasu 2,5-hydroksybenzoesowego, syringowego i kawowego, natomiast najmniejszą zawartość w ziarniakach stwierdzono dla kwasu synapowego oraz 4-hydroksybenzoesowego (Tabele 9 i 10). Ziarno *H. v. rimpai* cechowało się najwyższą, wśród badanych genotypów zawartością kwasu 2,5-hydroksybenzoesowego, protokatechowego, syringowego, kawowego, synapowego oraz ferulowego. *H. v. nigricans* w porównaniu z *H. v. rimpai* zawierał istotnie mniej wymienionych fenolokwasów (odpowiednio o 19,3%, 18,3%, 19,9%, 37,5%, 61,2% i 12,3%). Genotypy o czarno zabarwionym ziarnie zawierały blisko dwukrotnie więcej kwasu 2,5-hydroksybenzoesowego, protokatechowego, kawowego i ferulowego oraz ponad ośmiokrotnie więcej kwasu syringowego niż odmiana 'Soldo' *H. vulgare* (Tabele 9 i 10). Z kolei współczesna odmiana jęczmienia zawierała istotnie więcej kwasu galusowego i chlorogenowego.

Tabela 9. Zawartość kwasów fenolowych - pochodnych kwasu hydroksybenzoesowego w ziarnie jęczmienia [P2].

Genotyp	Czynnik	GA (mg kg <sup>-1</sup> )	2,5-DHBA (mg kg <sup>-1</sup> )	4-p-HBA (mg kg <sup>-1</sup> )	PCA (mg kg <sup>-1</sup> )	SYA (mg kg <sup>-1</sup> )
System konwencjonalny						
<i>H. v. nigricans</i>	B	10,2d ±0,58	40,1cd ±1,50	15,4a-c ±0,82	18,4cd ±2,16	51,3b ±0,88
	K	12,9d ±0,12	44,5b-d ±2,63	15,3a-c ±0,70	5,9ef ±0,61	49,4b ±1,04
<i>H. v. rimpai</i>	B	18,7c ±0,36	65,1a ±3,09	18,2a ±1,94	16,2c-e ±1,83	64,4ab ±11,38
	K	12,3d ±0,93	46,0b-d ±1,72	11,7bc ±1,68	21,3bc ±1,02	60,4ab ±1,05
<i>H. vulgare</i>	B	26,2ab ±0,95	31,5de ±0,99	15,4a-c ±1,33	5,3f ±0,46	6,6c ±0,40
	K	16,7c ±1,47	20,5e ±1,03	10,9c ±0,34	3,6f ±0,39	5,8c ±0,53
System ekologiczny						
<i>H. v. nigricans</i>	B	18,1c ±0,23	46,4a-d ±0,73	16,1ab ±0,25	31,2ab ±0,36	54,4b ±2,07
	K	18,9c ±0,76	51,6a-c ±2,17	16,6ab ±0,66	34,0a ±1,41	58,9ab ±1,88
<i>H. v. rimpai</i>	B	26,4ab ±1,53	61,4ab ±15,01	18,3a ±3,88	38,1a ±11,88	76,1a ±16,98
	K	16,9c ±2,50	53,9a-c ±2,97	14,2a-c ±2,87	34,0a ±0,60	66,4ab ±4,74
<i>H. vulgare</i>	B	29,6a ±1,53	38,0de ±2,71	15,5a-c ±1,34	7,4ef ±0,95	8,9c ±0,95
	K	23,34b ±1,64	31,1de ±11,60	16,3ab ±2,67	8,0d-f ±1,03	6,8c ±1,37

a-f - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; znak ± odnosi się do odchylenia standardowego

B – aplikacja nalistna biostymulatora aminokwasowego; K – kontrola bez aplikacji; GA – kwas galusowy, 2,5-DHBA – kwas 2,5-dihydroksobenzoesowy, p-HBA – kwas 4-dihydroksobenzoesowy, PCA – kwas protokatechowy, SYA – kwas syryngowy

Zawartość analizowanych kwasów fenolowych (z wyjątkiem 4-dihydroksybenzoesowego) była istotnie większa w ziarnie pochodzącym z ekologicznego systemu uprawy w porównaniu do konwencjonalnego (Tabela 1 i 2). Największy wzrost zawartości kwasów fenolowych w ziarnie ekologicznym w porównaniu do ziarna z systemu konwencjonalnego odnotowano dla kwasu syryngowego, ferulowego, oraz protokatechowego, odpowiednio o 32,2%, 50,6% i 116,1%. Reakcja na system gospodarowania różniła się jednak w zależności od genotypu. Odmiana 'Soldo' w warunkach uprawy ekologicznej gromadziła w ziarnie istotnie więcej kwasu ferulowego natomiast *H. v. nigricans* i *H. v. rimpai* kwasu protokatechowego w porównaniu do uprawy konwencjonalnej (Tabele 9 i 10).

Wpływ na zawartość kwasów fenolowych w ziarnie miała także nalistna aplikacja biostymulatora na bazie aminokwasów w okresie wegetacji jęczmienia (Tabele 9 i 10). Średnio dla badanych genotypów ziarno po aplikacji biostymulatora zawierało istotnie więcej kwasu galusowego, 2,5-hydroksybenzoesowego, 4-hydroksybenzoesowego, chlorogenowego, kawowego i ferulowego (odpowiednio o 32,4%, 14,2%, 16,3%, 28,0%, 24,7% i 39,8%) w porównaniu z kontrolą. Reakcja na biostymulator była odmienna u genotypów jęczmienia. Zarówno w ekologicznym jak i konwencjonalnym systemie uprawy zastosowanie biostymulatora spowodowało zwiększenie koncentracji kwasu galusowego u odmiany 'Soldo',

oraz kwasu kawowego i ferulowego w genotypach pierwotnych jęczmienia (*H. v. nigricans* i *H. v. rimpai*). Biostymulator miał korzystny wpływ na koncentrację kwasu synapowego w ziarnie *H. v. nigricans* wyłącznie w uprawie konwencjonalnej, natomiast *H. v. rimpai* w uprawie ekologicznej.

Tabela 10. Zawartość kwasów fenolowych - pochodnych kwasu hydroksycynamonowego w ziarnie jęczmienia [P2].

Genotyp	Czynnik	p-CA (mg kg <sup>-1</sup> )	CGA (mg kg <sup>-1</sup> )	CA (mg kg <sup>-1</sup> )	SA (mg kg <sup>-1</sup> )	FA (mg kg <sup>-1</sup> )
System konwencjonalny						
<i>H. v. nigricans</i>	B	26,5a ± 0,69	14,8cd ± 0,36	61,1c ± 0,83	7,00b-d ± 0,61	889c ± 38,2
	K	21,4a ± 0,94	13,1cd ± 0,86	15,7e ± 0,84	1,96f ± 0,55	677d ± 24,4
<i>H. v. rimpai</i>	B	30,3a ± 1,02	17,4bc ± 3,71	123a ± 3,17	7,72b-f ± 1,52	1010bc ± 1,5
	K	29,6a ± 0,64	15,3cd ± 2,43	11,5e ± 0,91	13,7b ± 1,67	555de ± 59,6
<i>H. vulgare</i>	B	32,1a ± 5,71	23,7ab ± 3,07	31,1d ± 2,97	2,16f ± 0,36	392f ± 3,7
	K	25,5a ± 0,84	10,3d ± 0,94	31,0d ± 5,67	12,4b-d ± 1,08	415ef ± 6,6
System ekologiczny						
<i>H. v. nigricans</i>	B	29,4a ± 0,32	15,8cd ± 0,26	74,6b ± 5,86	5,46ef ± 0,46	1146b ± 80,6
	K	31,1a ± 1,32	16,3cd ± 0,64	18,7e ± 0,75	4,63ef ± 0,42	948c ± 23,7
<i>H. v. rimpai</i>	B	35,3a ± 11,5	17,9bc ± 3,84	121a ± 4,19	21,1a ± 3,19	1686a ± 27,3
	K	31,6a ± 0,68	13,9cd ± 2,92	16,6e ± 2,54	6,59d-f ± 4,54	922c ± 74,6
<i>H. vulgare</i>	B	34,6a ± 3,40	30,0a ± 0,68	38,3d ± 0,84	9,29b-e ± 0,94	633d ± 37,1
	K	37,1a ± 12,3	24,5a ± 1,05	35,6d ± 1,08	12,8bc ± 1,40	599d ± 72,8

a-f - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; znak ± odnosi się do odchylenia standardowego

B – aplikacja nalistna biostymulatora aminokwasowego; K – kontrola bez aplikacji; p-CA – kwas p-kumarowy, CGA – kwas chlorogenowy, CA – kwas kawowy, SA – kwas synapowy, FA – kwas ferulowy

#### 6.4.2. Zawartość i kompozycja flawonoidów

Zawartość flawonoidów była większa w jęczmieniach pierwotnych niż w odmianie współczesnej, a największą ich zawartością w obu systemach gospodarowania cechował się *H. v. rimpai* (Tabela 11). Genotyp ten w uprawie konwencjonalnej gromadził ponad 4 razy, a w uprawie ekologicznej ponad 3 razy więcej flawonoidów niż *H. v. vulgare*. Tylko w uprawie konwencjonalnej, średnio dla genotypów biostymulator korzystnie wpływał na koncentrację flawonoidów. W tym systemie uprawy *H. v. rimpai* traktowany biostymulatorem gromadził nawet więcej flawonoidów niż *H. v. nigricans* (Tabela 11).

Dominującymi flawonoidami w ziarniakach *H. v. nigricans* i *H. v. rimpai* były naringenina, kwercetyna, apigenina, kampferol i luteolina. Spośród flawonoidów oznaczonych w ziarniakach *H. v. 'Soldo'* najwięcej było witaksyny (Tabela 11). Badane genotypy były podobne tylko pod względem zawartości rutyny. Ziarno *H. v. rimpai* w porównaniu do *H. v. nigricans* charakteryzowało się istotnie większą koncentracją naringeniny, witaksyny i



apigeniny (odpowiednio o 37,6%, 38,5%, 52,1%) i istotnie mniejszą kwercetyny i kampferolu (odpowiednio o 13,2% i 9%) .

Średnio dla genotypów ziarniaki pochodzące z systemu ekologicznego zawierały w stosunku do systemu konwencjonalnego istotnie więcej naringeniny o 20,7%, kwercetyny o 35,3%, apigeniny o 84,4%, kampferolu o 129%, luteoliny o 134% oraz witaksyny o 256,8%. Jednak poszczególne genotypy w różny sposób reagowały na systemy gospodarowania. U współczesnej odmiany 'Soldo' ekologiczny system uprawy sprzyjał koncentracji witaksyny, w przypadku *H. v. nigricans* apigeniny i luteoliny a w genotypie *H. v. rimpaii* kampferolu (Tabela 11).

Tabela 11. Zawartość flawonoidów w ziarnie jęczmienia [P2].

Genotyp	T	NGN mg kg <sup>-1</sup>	VIT mg kg <sup>-1</sup>	RU mg kg <sup>-1</sup>	QU mg kg <sup>-1</sup>	API mg kg <sup>-1</sup>	KPF mg kg <sup>-1</sup>	LU mg kg <sup>-1</sup>
System konwencjonalny								
<i>H. v. nigricans</i>	B	175,4 <sup>de</sup> ±6,16	2,8 <sup>f</sup> ±0,92	19,2 <sup>a</sup> ±0,68	145,9 <sup>b-d</sup> ±7,6	14,7 <sup>d-ef</sup> ±2,1	37,0 <sup>cd</sup> ±1,3	31,9 <sup>cd</sup> ±1,4
	K	159,7 <sup>e</sup> ±8,6	4,6 <sup>ef</sup> ±0,44	16,8 <sup>a</sup> ±0,47	122,3 <sup>d</sup> ±2,6	30,4 <sup>e</sup> ±1,0	17,6 <sup>ef</sup> ±1,3	29,5 <sup>cd</sup> ±1,0
<i>H. v. rimpaii</i>	B	270,5 <sup>ab</sup> ±23,7	16,4 <sup>bc</sup> ±3,95	16,5 <sup>a</sup> ±6,06	124,6 <sup>d</sup> ±3,5	77,6 <sup>a</sup> ±1,6	15,5 <sup>ef</sup> ±0,6	33,7 <sup>c</sup> ±2,9
	K	193,8 <sup>c-e</sup> ±8,8	6,7 <sup>ef</sup> ±0,30	16,2 <sup>a</sup> ±1,01	126,4 <sup>d</sup> ±9,5	28,8 <sup>cd</sup> ±1,4	7,2 <sup>f</sup> ±1,2	17,4 <sup>de</sup> ±0,8
<i>H. vulgare</i>	B	28,4 <sup>f</sup> ±1,2	13,3 <sup>cd</sup> ±0,80	22,0 <sup>a</sup> ±1,56	28,2 <sup>e</sup> ±3,4	3,5 <sup>f</sup> ±0,3	18,0 <sup>ef</sup> ±1,7	1,8 <sup>ef</sup> ±0,1
	K	14,9 <sup>f</sup> ±2,2	10,0 <sup>de</sup> ±0,80	15,6 <sup>a</sup> ±2,20	15,7 <sup>e</sup> ±3,9	5,2 <sup>ef</sup> ±1,1	24,1 <sup>de</sup> ±3,0	1,1 <sup>f</sup> ±0,03
System ekologiczny								
<i>H. v. nigricans</i>	B	209,6 <sup>cd</sup> ±9,0	17,0 <sup>bc</sup> ±0,24	17,9 <sup>a</sup> ±0,23	181,1 <sup>a-c</sup> ±4,3	55,5 <sup>b</sup> ±1,0	47,5 <sup>bc</sup> ±0,8	55,8 <sup>b</sup> ±1,0
	K	183,6 <sup>de</sup> ±4,4	17,6 <sup>bc</sup> ±0,70	18,7 <sup>a</sup> ±0,75	206,7 <sup>a</sup> ±8,9	62,0 <sup>ab</sup> ±2,6	52,8 <sup>ab</sup> ±2,2	62,4 <sup>ab</sup> ±2,6
<i>H. v. rimpaii</i>	B	304,5 <sup>a</sup> ±18,8	19,7 <sup>b</sup> ±4,03	17,8 <sup>a</sup> ±9,17	133,2 <sup>cd</sup> ±24,6	75,3 <sup>a</sup> ±16,9	63,1 <sup>a</sup> ±15,2	75,8 <sup>a</sup> ±16,9
	K	232,9 <sup>bc</sup> ±28,7	15,4 <sup>b-d</sup> ±2,71	16,6 <sup>a</sup> ±2,53	185,2 <sup>ab</sup> ±49,2	65,7 <sup>ab</sup> ±4,6	55,3 <sup>ab</sup> ±3,2	66,1 <sup>ab</sup> ±4,7
<i>H. vulgare</i>	B	45,3 <sup>f</sup> ±3,5	67,0 <sup>a</sup> ±1,61	23,3 <sup>a</sup> ±1,80	32,9 <sup>e</sup> ±1,4	17,5 <sup>c-f</sup> ±1,6	36,4 <sup>cd</sup> ±1,6	5,8 <sup>ef</sup> ±1,0
	K	41,5 <sup>f</sup> ±12,5	55,8 <sup>b</sup> ±3,31	20,9 <sup>a</sup> ±8,05	22,6 <sup>e</sup> ±9,2	19,4 <sup>c-e</sup> ±1,2	19,4 <sup>ef</sup> ±3,4	4,1 <sup>ef</sup> ±0,8

a-f - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; znak  $\pm$  odnosi się do odchylenia standardowego

T – zabieg; B – aplikacja nalistna biostymulatora aminokwasowego; K – kontrola bez aplikacji; NGN - naringenina, VIT - witaksyna, RU - rutyna, QU - kwercetyna, API - apigenina, KPF - kampferol, LU - luteolina

Aplikacja biostymulatora, średnio dla badanych genotypów istotnie zwiększyła zawartość większości flawonoidów (luteoliny o 13,5%, apigeniny o około 15,3%, witaksyny o 20,2%, kampferolu o 23,2% i naringeniny o 25,1%) (Tabela 11). Reakcja różniła się jednak od genotypu i systemu gospodarowania. *H. v. nigricans* w uprawie ekologicznej nie wykazywał reakcji zawartości flawonoidów na aplikację biostymulatora, natomiast w systemie konwencjonalnym aplikacja preparatu powodowała istotnie zwiększenie zawartość kampferolu. Przeciwnie odmiana 'Soldo' *H. vulgare* wykazywała pozytywną reakcję koncentracji flawonoidów (witaksyny i kampferolu) na biostymulator wyłącznie w uprawie ekologicznej. *H. v. rimpaii* wykazywał najsilniejszą reakcję na biostymulator. W systemie konwencjonalnym powodował on zwiększenie koncentracji naringeniny (o 39,6%), witaksyny

(2,5 razy), apigeniny (2,7 razy) i luteoliny (1,9 razy), a w systemie ekologicznym wyłącznie naringeniny (o 30,7%).

### 6.4.3. Zawartość antocyjanidyn, fitomelaniny i polifenoli ogółem oraz aktywność przeciwutleniająca ziarna

Antocyjanidyny były gromadzone jedynie w genotypach pierwotnych *H. v. nigricans* i *H. v. rimpaii*, (Tabela 8 i 12). W uprawie ekologicznej *H. v. rimpaii*, niezależnie od aplikacji biostymulatora gromadził więcej anthocyanidins niż *H. v. nigricans*. Jednak warto zauważyć, że genotyp ten, zarówno uprawiany ekologicznie jak i konwencjonalnie, gromadził najwięcej antocyjanidyn, jeżeli był poddany działaniu biostymulatora (Tabela 8 i 12).

Analogicznie do kwasów fenolowych, flawonoidów oraz antocyjanidyn, zawartość polifenoli ogółem była istotnie większa w pierwotnych genotypach niż odmianie współczesnej, uprawianych zarówno ekologicznie, jak i konwencjonalnie. Biostymulator, bez względu na system uprawy, średnio dla genotypów istotnie podwyższał koncentrację polifenoli ogółem [P3]. Genotyp *H. v. rimpaii*, pochodzący z obu systemów gospodarowania, cechował się istotnie większą od pozostałych genotypów zawartością polifenoli ogółem, ale tylko gdy był poddany działaniu preparatu aminokwasowego. Podobnie jak dla poszczególnych związków fenolowych, *H. v. vulgare* w żadnym z systemów gospodarowania, nie zareagował zwiększeniem ilości polifenoli ogółem po aplikacji biostymulatora [P3].

Tabela 12. Zawartość barwników roślinnych w ziarnie i aktywność przeciwutleniająca (ABTS<sup>+</sup>) jęczmienia [P2].

Genotyp	Czynnik	Dph (mg kg <sup>-1</sup> )	Lut (mg kg <sup>-1</sup> )	PhM (mg kg <sup>-1</sup> )	ABTS <sup>+</sup> %
<i>H. v. nigricans</i>	B	1.17de ±0.02	0.26cd ±0.02	149.6b ±5.82	90.1a ±0.49
	K	1.26c-e ±0.02	0.52b ±0.02	34.7d ±4.19	87.3a ±2.54
<i>H. v. rimpaii</i>	B	1.72b ±0.05	0.17d ±0.02	129.0c ±4.12	79.4a ±11.52
	K	1.07e ±0.03	0.16d ±0.02	46.0d ±3.18	86.9a ±1.92
<i>H. vulgare</i>	B	0.00f	0.00e	0.00e	61.4a ±2.77
	K	0.00f	0.00e	0.00e	72.7a ±5.21
<i>H. v. nigricans</i>	B	1.37cd ±0.10	0.22cd ±0.02	171.9a ±5.76	87.8a ±1.75
	K	1.39cd ±0.20	0.64a ±0.04	40.7d ±7.01	86.7a ±6.68
<i>H. v. rimpaii</i>	B	2.27a ±0.18	0.28c ±0.08	163.5a ±3.32	89.8a ±0.73
	K	1.48bc ±0.16	0.26cd ±0.08	39.7d ±2.46	90.6a ±0.37
<i>H. vulgare</i>	B	0.00f	0.00e	1.2e ±0.10	58.3a ±13.00
	K	0.00f	0.00e	0.00e	75.8a ±4.16

a-f - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; znak ± odnosi się do odchylenia standardowego

T – zabieg; B – aplikacja nalistna biostymulatora aminokwasowego; K – kontrola bez aplikacji; Dph - delfinidyna, Lut - luteolinidyna, PhM – fitomelanina, ABTS<sup>+</sup> - potencjał antyoksydacyjny

Barwniki antocyjanowe (delfinidyna, luteolinidyna) oznaczono wyłącznie w ziarniakach genotypów pierwotnych (Tabela 12). Zarówno stosowanie biostymulatora jak i uprawa w systemie ekologicznym wpływały istotnie na zwiększenie zawartości delfinidyny w ziarnie. Biostymulator ograniczał natomiast zawartość luteolinidyny w ziarnie.

Fitomelanina (Tabela 12) znajdowała się w znacznych ilościach w ziarniakach o czarnej barwie (*H. v. nigricans* i *H. v. rimpaii*). Współczesna odmiana 'Soldo', o żółtym ziarnie na ogół nie zawierała fitomelaniny. Jej śladowe ilości wykryto jedynie w ziarniakach tej odmiany pochodzących z uprawy konwencjonalnej. Średnio dla badanych genotypów ziarno z systemu ekologicznego zawierało istotnie więcej fitomelaniny (o 16%) niż z systemu konwencjonalnego. Bardzo silny wpływ na koncentrację tego związku w ziarniakach miała również aplikacja biostymulatora aminokwasowego. W ziarnie pochodzącym z roślin traktowanych biostymulatorem było 3.8 razy więcej fitomelaniny niż w kontroli.

Aktywność przeciwutleniająca ABTS<sup>+</sup> była istotnie zróżnicowana w zależności od genotypu jęczmienia [P2]. Najwyższym potencjałem do usuwania wolnego rodnika ABTS<sup>+</sup> cechowały się genotypy alternatywne, które miały o około 20 punktów procentowych wyższy potencjał do usuwania wolnego rodnika niż odmiana współczesna o ziarnie żółtym [P2]. Nalistna aplikacja biostymulatora aminokwasowego stosowana w trakcie sezonu wegetacyjnego nie miała istotnego wpływu na potencjał przeciwutleniający ziarna niezależnie od systemu gospodarowania (Tabela 12).

#### 6.4.4. Zawartość i kompozycja karotenoidów

Aplikacja biostymulatora miała istotny wpływ na zawartość β-karotenu, luteiny i zeaksantyny w ziarnie [P3]. Średnio dla genotypów istotnie zwiększała zawartość tych związków, a także karotenoidów ogółem, zarówno w uprawie konwencjonalnej jak i organicznej. Biostymulator najsilniej oddziaływał na luteinę, której ilość po aplikacji preparatu wzrosła ponad trzykrotnie w obu systemach gospodarowania, natomiast najmniejszy efekt odnotowano dla zeaksantyny.

Tabela 13. Zawartość związków fenolowych w ziarnie badanych genotypów jęczmienia uprawianych w konwencjonalnym i ekologicznym systemie gospodarowania [P3]

Genotyp	Czynnik	Luteina (mg kg <sup>-1</sup> )	Zeaksantyna (mg kg <sup>-1</sup> )	β-karoten (mg kg <sup>-1</sup> )	Karotenoidy ogółem (mg kg <sup>-1</sup> )
System konwencjonalny					
<i>H. v. nigricans</i>	B	0,066 b ± 0,004	0,035 c ± 0,002	0,253 b ± 0,015	0,354 b ± 0,015
	K	0,016 e ± 0,001	0,029 d ± 0,001	0,190 c ± 0,010	0,235 d ± 0,009
<i>H. v. rimpaii</i>	B	0,087 a ± 0,005	0,043 b ± 0,002	0,387 a ± 0,015	0,516 a ± 0,015
	K	0,026 d ± 0,003	0,015 e ± 0,002	0,160 d ± 0,010	0,201 e ± 0,009
<i>H. vulgare</i>	B	0,035 c ± 0,002	0,081 a ± 0,002	0,217 bc ± 0,006	0,333 b ± 0,004
	K	0,011 f ± 0,001	0,089 a ± 0,002	0,163 d ± 0,015	0,263 c ± 0,015
System ekologiczny					
<i>H. v. nigricans</i>	B	0,075 a ± 0,011	0,043 b ± 0,002	0,307 ab ± 0,015	0,424 ab ± 0,025
	K	0,019 c ± 0,002	0,033 c ± 0,002	0,241 bc ± 0,027	0,293 cd ± 0,020
<i>H. v. rimpaii</i>	B	0,108 a ± 0,012	0,051 b ± 0,006	0,393 a ± 0,074	0,553 a ± 0,070
	K	0,034 b ± 0,003	0,018 d ± 0,002	0,210 c ± 0,020	0,262 d ± 0,021
<i>H. vulgare</i>	B	0,028 b ± 0,003	0,084 a ± 0,007	0,287 abc ± 0,025	0,398 b ± 0,018
	K	0,017 c ± 0,002	0,090 a ± 0,003	0,248 bc ± 0,040	0,354 bc ± 0,041

a-e - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; znak ± odnosi się do odchylenia standardowego

B – aplikacja nalistna biostymulatora aminokwasowego; K – kontrola bez aplikacji

Spośród analizowanych karotenoidów największy udział w ziarnie miał  $\beta$ -karoten [P3]. W uprawie konwencjonalnej średnia zawartość  $\beta$ -karotenu była większa w genotypach pierwotnych (*H. v. nigricans*, *H. v. rimpai*) w porównaniu z *H. v. vulgare*. Jednak analiza interakcji genotypu i biostymulatora wskazuje, że tylko *H. v. rimpai* gromadził istotnie więcej  $\beta$ -karotenu w porównaniu z *H. v. vulgare*, a nawet więcej niż *H. v. nigricans*, ale tylko wtedy, jeśli w trakcie wegetacji był traktowany biostymulatorem (Tabela 13).

Średnia zawartość luteiny była istotnie większa w genotypach pierwotnych w porównaniu z *H. v. vulgare*, i jednocześnie największa u *H. v. rimpai*, zarówno w konwencjonalnym jak i ekologicznym systemie gospodarowania [P3]. Jednak podobnie jak w przypadku  $\beta$ -karotenu zawartość luteiny w genotypach pierwotnych była większa niż w odmianie współczesnej tylko w wariacie z biostymulatorem (Tabela 13).

Jęczmień zwyczajny *H. vulgare* o ziarnie żółtym charakteryzował się najwyższym udziałem zeaksantyny, zarówno w uprawie konwencjonalnej jak i ekologicznej [P3]. Warto zauważyć, że aplikacja biostymulatora nie miała wpływu na zawartość tego związku w odmianie współczesnej jęczmienia, ale powodowała jego zwiększenie w genotypach pierwotnych (Tabela 13).

#### 6.4.5. Kompozycja wolnych kwasów tłuszczowych

Tabela 14. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w ziarnie badanych genotypów jęczmienia [P3].

Genotyp	Czynnik	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
System konwencjonalny				
<i>H. v. nigricans</i>	B	20,5 a $\pm$ 0,34	19,0 a $\pm$ 0,44	60,5 b $\pm$ 0,11
	K	19,8 ab $\pm$ 0,41	17,4 bc $\pm$ 0,40	62,8 a $\pm$ 0,30
<i>H. v. rimpai</i>	B	20,6 a $\pm$ 0,61	18,4 ab $\pm$ 0,55	61,0 b $\pm$ 0,85
	K	18,8 b $\pm$ 0,22	16,9 c $\pm$ 0,77	64,4 a $\pm$ 0,67
<i>H. vulgare</i>	B	21,0 a $\pm$ 0,81	19,6 a $\pm$ 0,55	59,4 b $\pm$ 0,26
	K	19,7 ab $\pm$ 0,85	19,6 a $\pm$ 0,088	60,7 b $\pm$ 0,91
System ekologiczny				
<i>H. v. nigricans</i>	B	19,7 b $\pm$ 0,73	13,0 c $\pm$ 0,37	67,3 a $\pm$ 1,04
	K	19,9 b $\pm$ 0,54	12,6 c $\pm$ 0,13	67,6 a $\pm$ 0,46
<i>H. v. rimpai</i>	B	24,8 a $\pm$ 0,24	19,9 a $\pm$ 0,66	55,3 c $\pm$ 0,54
	K	19,7 b $\pm$ 1,11	15,5 b $\pm$ 0,89	64,9 b $\pm$ 1,20
<i>H. vulgare</i>	B	24,5 a $\pm$ 0,17	14,6 b $\pm$ 0,38	60,9 c $\pm$ 0,26
	K	22,8 a $\pm$ 1,38	13,1 c $\pm$ 0,49	64,1 b $\pm$ 1,36

a-c - średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ ; znak  $\pm$  odnosi się do odchylenia standardowego

B – aplikacja nalistna biostymulatora aminokwasowego; K – kontrola bez aplikacji; SFA – nasycone kwasy tłuszczowe, MUFA – jednonienasycone kwasy tłuszczowe, PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe

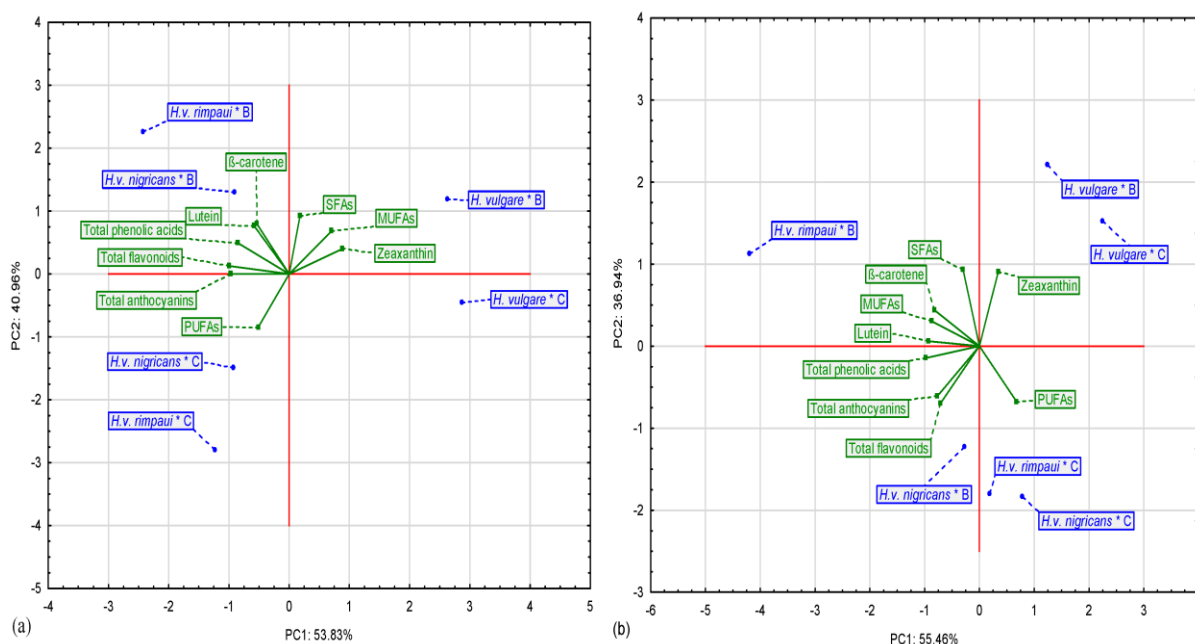
Spośród analizowanych wolnych kwasów tłuszczowych, największy udział w tłuszczu magazynowanym w ziarnie miały kwasy tłuszczowe wielonienasycone (PUFA), średnio 60% [P3]. W uprawie konwencjonalnej średnia zawartość PUFA była największa w *H. v. rimpai*, natomiast w ekologicznej w *H. v. nigricans* [P3]. Średnio dla genotypów biostymulator zmniejszał udział PUFA, zarówno w uprawie konwencjonalnej jak i ekologicznej, jednak u niektórych genotypów (*H. v. vulgare* i *H. v. nigricans*, odpowiednio w uprawie

konwencjonalnej i ekologicznej) udział PUFA po aplikacji biostymulatora i bez zabiegu był podobny (Tabela 14).

W uprawie konwencjonalnej największym udziałem jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) cechował się *H. v. vulgare*, natomiast w ekologicznej *H. v. rimpaii* [P3]. Średnio dla genotypów, biostymulator istotnie zwiększał udział MUFA w tłuszczu ziarna jęczmienia z obu systemów gospodarowania. Brak reakcji zawartości MUFA na biostymulator odnotowano jedynie u *H. v. vulgare* w uprawie konwencjonalnej (Tabela 14) i *H. v. nigricans* w uprawie organicznej (Tabela 14).

Średni udział nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) był największy w ziarnie *H. v. vulgare*, uprawianego ekologicznie, natomiast w uprawie konwencjonalnej genotypy jęczmienia pod względem tej cechy były do siebie podobne [P3]. Średnio dla genotypów, biostymulator zwiększał udział SFA, jednak analiza interakcji genotypu i biostymulatora wykazała, że jedynie *H. v. rimpaii* reagował istotnym wzrostem koncentracji SFA po aplikacji preparatu, zarówno w systemie konwencjonalnym jak i ekologicznym (Tabela 14).

#### 6.4.6. Analizy wielowymiarowe i korelacje dla cech jakościowych ziarna



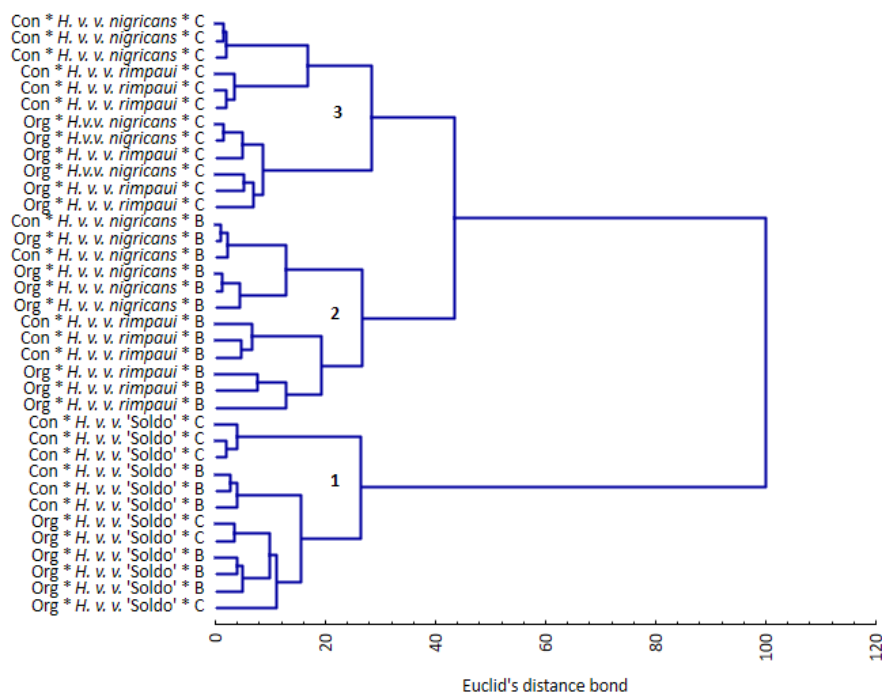
Ryc. 6. Analiza głównych składowych (PCA) parametrów biochemicznych w ziarnie *H. v. nigricans*, *H. v. rimpaii* i *H. vulgare* z: (a) systemu konwencjonalnego i (b) ekologicznego, w zależności od nalistnej aplikacji biostymulatora. B – nalistna aplikacja biostymulatora, C – kontrola bez zabiegu. Znak "\*" odnosi się do interakcji dwóch czynników: genotyp \* zabieg biostymulujący.

W celu dokładniejszego przeanalizowania wpływu genotypu, biostymulatora i systemu gospodarowania na stężenie analizowanych parametrów biochemicznych, przeprowadzono analizę głównych składników (PCA). W systemie konwencjonalnym analiza (PCA) wyjaśniła 53,83% dla pierwszej głównej składowej (PC1) i 40,96% dla drugiej głównej składowej (PC2) co dało razem 94,79% całkowitej wariancji, a dla systemu ekologicznego PC1 definiował 55,46%, a PC2 36,94% całkowitej wariancji (razem 92,40% całkowitej wariancji). Oznacza to, że zmienne prezentowane w obu biplotach są silnie reprezentowane przez te składowe (Ryc. 6).

Na obu wykresach kąty między prostymi dla antocyjanów i flawonoidów, a także fenoli, luteiny i karotenu są bardzo wąskie, co wskazuje, że cechy te są silnie skorelowane. Pozostałe

kierunki i szerokie kąty między zeaksantyną i PUFA wskazują na niewielką ich zależność. W analizie PCA dla systemu konwencjonalnego i ekologicznego, całkowite antocyjanidyny i całkowite flawonoidy, jak również całkowite fenole, luteina i karoten wraz z nasyconym kwasem tłuszczowym są lepiej opisane przez PC2 w przeciwieństwie do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), które są reprezentowane przez PC1. Porównanie analizy PCA dla każdego systemu gospodarowania wykazało, że tylko zeaksantyna, w obu biplotach, znajduje się po stronie dodatniej PC1 i PC2 (Ryc. 6).

Genotyp *H. v. vulgare* niezależnie od czynników agrotechnicznych charakteryzował się najwyższym poziomem luteiny. Jak można było zaobserwować na schemacie, tylko konwencjonalne i niepoddane zabiegowi rośliny *H. v. rimpai* i *H. v. nigricans* powodowały oddalenie PUFA od innych zmiennych. Po stronie negatywnej dla PC1, znajdowały się traktowane biostymulatorami alternatywne genotypy jęczmienia - *H. v. rimpai* i *H. v. nigricans* z systemu konwencjonalnego oraz ekologicznego i charakteryzowały się wysoką zawartością  $\beta$ -karotenu, luteiny, kwasów fenolowych ogółem, flawonoidów ogółem i antocyjanidyn ogółem. Związek pomiędzy SFA, MUFA i genotypami z lub bez zastosowania aminokwasów różni się w zależności od systemu gospodarowania (Ryc. 6).



Ryc. 7. Hierarchiczna analiza skupień z wykorzystaniem miary odległości Euklidesowej dla testowanych kombinacji [P2].

Przeprowadzona hierarchiczna analiza skupień (Ryc. 7) podzieliła analizowane przypadki na 3 skupienia. Do skupienia 1 zostały zaklasyfikowane wszystkie kombinacje z *H. vulgare* 'Soldo'. Skupienie 2 było złożone z kombinacji, które obejmowały *H. v. nigricans* i *H. v. rimpai* poddany działaniu biostymulatora. W skupieniu 3 znajdowały się natomiast kombinacje z genotypami czarnoziarnistymi nie poddanymi biostymulacji. Przeprowadzona analiza potwierdziła, że największy wpływ na koncentrację związków fenolowych w ziarnie wywarła interakcja genotypu i zabiegu biostymulującego, a dopiero potem system uprawy.

	CA	SYA	2,5-DHBA	FA	NGN	VIT	QU	LU	PhM	ABTS <sup>+</sup>
CA		0.0793	0.2486	0.5782*	0.2256	0.2134	-0.0264	0.157	0.3824*	-0.0571
SYA	0.0793		0.8418*	0.7220*	0.9621*	-0.3739*	0.9020*	0.9241*	0.9011*	0.7593*
2,5-DHBA	0.2486	0.8418*		0.7032*	0.8754*	-0.0091	0.7096*	0.8178*	0.7372*	0.4397*
FA	0.5782*	0.7220*	0.7032*		0.7967*	0.0598	0.6200*	0.8259*	0.7834*	0.5171*
NGN	0.2256	0.9621*	0.8754*	0.7967*		-0.277	0.8467*	0.9170*	0.9245*	0.6961*
VIT	0.2134	-0.3739*	-0.0091	0.0598	-0.277		-0.3504*	-0.1838	-0.4148*	-0.4619*
QU	-0.0264	0.9020*	0.7096*	0.6200*	0.8467*	-0.3504*		0.9242*	0.8390*	0.7120*
LU	0.157	0.9241*	0.8178*	0.8259*	0.9170*	-0.1838	0.9242*		0.8606*	0.7054*
PhM	0.3823*	0.9011*	0.7372*	0.7834*	0.9245*	-0.4148*	0.8390*	0.8606*		0.6959*
ABTS <sup>+</sup>	-0.0571	0.7593*	0.4397*	0.5171*	0.6961*	-0.4619*	0.7120*	0.7054*	0.6958*	

Red - positive relation, blue-negative relation between compared factors. The color intensity indicates strength of correlation.  
Significant effects:  $p < 0.05$  (\*)

Ryc. 8. Macierz korelacji związków fenolowych i ABTS<sup>+</sup> [P2].

Analiza korelacji prostej Pearsona wykazała bardzo silną korelację z wysokim współczynnikiem determinacji pomiędzy kwasem syringowym, a najważniejszymi flawonoidami – naringeniną ( $r=0,9621$ ;  $r^2=0,9257$ ), kwercetyną ( $r=0,9020$ ;  $r^2=0,8136$ ) i luteoliną ( $r=0,9241$ ;  $r^2=0,8539$ ). Również zawartość fitomelaniny silnie zależała od kwasu syringowego oraz naringeniny. ABTS<sup>+</sup> wykazywała najsilniejszą korelację z zawartością kwasu syringowego, naringeniny, kwercetyny, luteoliny i fitomelaniny (Ryc. 8).

## 7. Dyskusja

Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowaną reakcję wskaźników fluorescencji chlorofilu na warunki hydrotermiczne sezonów wegetacyjnych. Ocena tych parametrów w fazie siewki wykazała niższą wydajność fotosyntezy jęczmienia w 2021 r. Mogło to wynikać z ujemnych temperatur podczas kiełkowania i wschodów [P1]. Wszystkie parametry związane z efektywnością funkcjonowania fotosystemu II (PS II), w tym  $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ , i  $PI_{ABS}$ , wskazywały na stres roślin. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy genotypami w zakresie tych parametrów. Według Elakhdara i in. [2023], młode rośliny jęczmienia wystawione na działanie ujemnych temperatur wykazywały znacznie zmniejszoną wydajność PS II, co objawiało się niższymi wartościami  $F_V/F_0$  i  $F_V/F_M$ . W warunkach niskiej temperatury obserwowanej w 2021 roku *H. v. var. rimpai* charakteryzował się wyższymi wartościami  $ET_0/CS_0$ ,  $TR_0/CS_0$  i  $ABS/CS_0$  (wskaźniki związane z fotosyntetycznym transportem elektronów i absorpcją) niż *H. v. var. nigricans*. Może to wskazywać na nieco wyższą tolerancję tego genotypu na stres związany z występowaniem ujemnych temperatur. Efektywny transport elektronów może zmniejszyć ryzyko uszkodzeń spowodowanych nadmiernym wzbudzeniem centrów reakcji ze względu na mniejszą ilość chlorofilu antenowego [Watanabe i in. 1995].

W 2022 r., w okresie pomiarów na siewkach (BBCH 12), temperatury powietrza nie były tak niskie jak w 2021 r., co wykluczało występowanie stresu termicznego u roślin. Jednak siewki jęczmienia mogły być narażone na stres związany z bardzo małymi opadami deszczu (Ryc. 1). Na występowanie suszy w tym okresie wskazywał również bardzo niski współczynnik hydrotermiczny Sielianinowa w kwietniu [P1]. Warunki hydrotermiczne w 2022 r. nie zakłóciły funkcjonowania PS II tak silnie jak w 2021 r., na co wskazują znacznie większe wartości większości parametrów fluorescencji chlorofilu. Jednak odpowiedź roślin w znacznym stopniu zależała od genotypu. Parametry świadczące o efektywności funkcjonowania PS II wskazały, że *H. v. rimpai* może cechować się większą tolerancją na niedobór wody w fazie siewki niż pozostałe badane genotypy. Charakteryzował się on znacznie wyższymi wartościami parametrów  $F_V/F_0$ ,  $F_V/F_M$  i  $PI_{ABS}$ . Podobne wyniki pod względem wydajności PS II w siewkach jęczmienia poddanych stresowi suszy uzyskali Oukarroum et al. [2007]. Zgodnie z tym badaniem, wskaźnik  $PI_{ABS}$  był zróżnicowany poprzez zmianę warunków wilgotności, ponieważ susza może wpływać na różne etapy procesu fotosyntezy.

W badaniach własnych wartości  $F_V/F_M$  i  $F_V/F_0$  liści podflagowego i flagowego znacznie się różniły w zależności od genotypu i roku badania (Tabela 1). Zauważono jednak, że wszystkie wyniki oscylowały wokół wartości uważanych za odpowiednie dla roślin niepoddanych warunkom stresowym [Luo i in. 2016]. Podczas analizy  $PI_{ABS}$  liści podflagowego i flagowego (Tabela 1), większe wartości były zwykle obserwowane w 2022 niż w 2021 roku, chociaż 2022 był mniej korzystny dla wzrostu i wydajności jęczmienia [P1]. Większe wartości  $PI_{ABS}$  w 2022 r. były najprawdopodobniej spowodowane warunkami hydrotermicznymi w dniach pomiarów. W 2022 r., w pierwszym i drugim terminie pomiaru (3 tydzień maja dla liścia podflagowego i 2 tydzień czerwca dla liścia flagowego), warunki pogodowe były optymalne lub bliskie optymalnym dla roślin (współczynnik Sielianinowa odpowiednio 1,16 i 1,32) [P1]. Jednak w 2021 r. współczynniki Sielianinowa w obu terminach pomiaru (1 tydzień czerwca dla liścia podflagowego i 2 tydzień czerwca dla liścia flagowego) wskazywały na występowanie stresu wodnego (współczynnik Sielianinowa odpowiednio 0,50 i 0,46) [Kuklik i in. 2016].

Wskaźnik chlorofilu (wartość SPAD) zależał głównie od fazy rozwojowej roślin i warunków hydrotermicznych sezonu wegetacyjnego. Pomiaru wykonane w fazie siewki,



wykazały niższą wartość niż pomiary wykonane na liściu flagowym (Tabela 3). Parametr ten różnił się w zależności od genotypu, ale rok badania wydawał się mieć większy wpływ na wartość SPAD, która była wyższa w 2022 niż w 2021 roku. W 2022 r., gdy warunki pogodowe podczas sezonu wegetacyjnego były mniej korzystne, rośliny produkowały mniejszą powierzchnię liści (Tabela 2) i biomasę pędów (Tabela 4), co z kolei przyczyniło się do większego stężenia cząsteczek chlorofilu w liściach i wyższych wartości SPAD. Podobny pogląd przedstawił Hasanuzzamana et al. [2022] w swoich badaniach nad jęczmieniem i stresem suszy.

W niniejszych badaniach przedstawiono analizę korelacji pomiędzy parametrami SPAD i fluorescencji chlorofilu (Tabela 6), która jest nowatorskim podejściem i jak dotąd nie jest powszechnie prezentowana w literaturze. Ogólnie stwierdzono znaczącą, pozytywną zależność między wskaźnikiem  $PI_{ABS}$  a wartością SPAD dla trzech analizowanych genotypów w obu mierzonych etapach wzrostu (BBCH 35 i BBCH 57). Związek ten pozwolił stwierdzić, że wraz ze wzrostem stężenia cząsteczek chlorofilu na powierzchni liści wzrasta jednostkowa wydajność fotosyntezy, co jest opisane przez parametr  $PI_{ABS}$ , powszechnie stosowany wskaźnik podczas stresów abiotycznych [Arab i in. 2023].

W latach, w których warunki pogodowe sprzyjają produktywności roślin (w badaniach własnych - 2021 rok) (Rysunek 1), zawartość chlorofilu może być niższa, jednak jest ona zazwyczaj kompensowana przez większą powierzchnię liści, co pozwala na utrzymanie wysokiej produktywności [Elis i in. 2023]. Uzyskane wyniki są zgodne z tym poglądem, ponieważ zaobserwowaliśmy wyższy współczynnik powierzchni liści (LAI) w 2021 r. niż w 2022 r. dla analizowanych genotypów (Tabela 2).

W 2021 r. w obu fazach rozwojowych (BBCH 37 i 57) jęczmień zwyczajny 'Soldo' miał niższy wskaźnik LAI niż *H. v. var. rimpai* i *H. v. var. nigricans*. Potwierdzają to ustalenia Alqudah et al. [2015], zgodnie z którymi niższe wartości LAI we współczesnych odmianach zbóż są wynikiem hodowli roślin. Jednym z celów tych procesów była uprawa roślin, które wytwarzają krótsze i węższe liście, aby lepiej dostosować się do różnych warunków środowiskowych. *H. v. rimpai* i *H. v. nigricans*, jako przedstawiciele pierwotnych zbóż, nie uległy żadnej poprawie w procesach hodowlanych i charakteryzują się wyższym LAI, zwłaszcza jęczmień kapturkowy. Jednak w mniej sprzyjających warunkach pogodowych (jak w 2022 r. w badaniach własnych) jęczmień czarny nie rozwija znacząco większej powierzchni liści (LAI), co w stresie suszy pozwala na ograniczenie transpiracji [Jia i Wang 2021].

Wskaźnik powierzchni liści (LAI), czyli powierzchnia liści na jednostkę powierzchni, na poziomie agronomicznym, jest analizowany przede wszystkim pod kątem jego wpływu na końcowy plon [Liu i in. 2018]. Badania własne wykazały znaczącą silną korelację między wskaźnikiem powierzchni liści a wydajnością ziarna dla wszystkich trzech badanych genotypów jęczmienia, głównie na etapie intensywnego rozwoju organów fotosyntetyzujących i akumulacji biomasy nadziemnej (BBCH 35). Z drugiej strony brak związku między wydajnością ziarna a LAI w późniejszych stadiach rozwoju jęczmienia zwyczajnego można również wyjaśnić procesem hodowli. Jednym z największych kamieni milowych w hodowli zbóż była introgresja genów *Rht*, które odpowiadają za skrócenie wysokości słomy [Wu i in. 2020]. W poprzednich badaniach zaobserwowano, że zboża z aktywnymi genami *Rht* (większość współczesnych genotypów pszenicy i jęczmienia) mają mniejsze powierzchnie liści, ale zdolność fotosyntezy jest jeszcze większa niż wśród genotypów pierwotnych [Moregan i in. 1990]. Implementacja tych genów w roślinach wpłynęła także na inne cechy. Jednym z głównych efektów było zmniejszenie plonu słomy i biomasy pędów, co było zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu (Tabela 4 i Tabela 5). Uważa się również, że

geny Rht mają wpływ na ziarniaki poprzez zwiększenie ich masy, co z kolei zwiększa ostateczną wydajność ziarna. Efektem zwiększenia plonu ziarna i zmniejszenia plonu słomy w efekcie prac hodowlanych był wzrost indeksu żniwnego (ang. *Harvest index*, HI) [Ukozehasi i in. 2022]. W niniejszym badaniu HI był znacznie większy dla *H. vulgare* niż dla alternatywnych genotypów jęczmienia (Tabela 5). Ponadto niektórzy autorzy wskazują, że geny Rht wpływają na liczbę ziaren w kłosie, zmniejszając zapotrzebowanie na asymilaty przez pędy i zwiększając transport asymilatów z pędów do rozwijających się kłosów, co skutkuje większą płodnością kwiatów [Youssefian i in. 1992]. Jednak w 2021 r. nie było znaczącej różnicy w liczbie ziaren w kłosie między jęczmieniem zwyczajnym a *H. v. var. rimpau* (główna forma jęczmienia). Wskazuje to na zdolność niektórych pierwotnych genotypów do produkcji podobnej liczby ziaren w kłosie, co współczesny jęczmień.

Jęczmień pospolity ma w większym stopniu zdeterminowany genetycznie potencjał produkcyjny w sprzyjających warunkach pogodowych (2021), głównie ze względu na wzrost MTZ w porównaniu z obydwoma pierwotnymi genotypami oraz liczbę ziaren w kłosie i liczbę płodnych kłosów na 1 m<sup>2</sup> w porównaniu z *H. v. var. nigricans*. Warto zauważyć, że przy niesprzyjających warunkach pogodowych (2022 r.) nie stwierdzono różnic między żadnym z analizowanych genotypów (pierwotnym i współczesnym) w liczbie płodnych kłosów na 1 m<sup>2</sup>. Jest to zgodne z Yessen et al. [1995], którzy twierdzili, że czarny jęczmień rosnący w warunkach gleby o niskiej zdolności do retencji wody (co wskazuje na niską dostępność wody dla roślin) plonuje na większym poziomie niż *H. vulgare*.

W badaniach własnych niektóre pędy rozwinęły kłosy bez ziaren (kłosy płone). Liczba takich pędów była ściśle związana z warunkami środowiskowymi. Największa liczba pędów generatywnych pozostała bezproduktywna przy deficycie opadów w 2022 r. Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami [Szczepanek i in. 2022], które wykazały wzrost liczby kłosów płonnych w pszenicy jarej w wyniku występowania suszy w okresie wegetacji. W niniejszym badaniu zaobserwowano, że *H. v. var. nigricans* ma największą liczbę kłosów płonnych spośród badanych genotypów (Tabela 4). W badaniach Pecio i Wach [2015], genotypy jęczmienia jarego różniły się pod względem reakcji na niedobór wody, co skutkowało różną liczbą kłosów z wykształconymi ziarnami.

Największe zróżnicowanie w plonowaniu między genotypem współczesnym a alternatywnymi obserwowano w konwencjonalnym systemie gospodarowania w 2021 r. o większej sumie opadów w okresie wegetacji. Wskazuje to na większy potencjał produkcyjny współczesnej odmiany w porównaniu z alternatywnymi genotypami, zwłaszcza w warunkach sprzyjających wysokim plonom, takich jak większa dostępność wody i intensywne agrotechnika. Wielu badaczy uważa, że pierwotne formy jęczmienia są bardziej tolerancyjne na niekorzystne warunki środowiskowe niż nowoczesne odmiany uprawne [Lakew i in. 2011; Chen i in. 2019]. Jednak współczesne odmiany charakteryzują się wysokim indeksem żniwnym, który według Simpsona i Siddique [1994] zwiększa transport wody i składników odżywczych do kłosa, co skutkuje większymi plonami. Cechy te mogą wyjaśniać zwiększone różnice w plonach między genotypami przy potencjalnie lepszej dostępności składników odżywczych i wody, wynikającej z warunków uprawy.

Nalistna aplikacja biostymulatora nie miała wpływu na plon ziarna badanych genotypów. Podobne wyniki uzyskali Staugaitis i wsp. [2017], gdzie zastosowanie biostymulatora aminokwasowego istotnie zwiększyło plon ziarna pszenicy tylko w jednym z pięciu lat badań. Nalistna biostymulacja roślin aminokwasami zwiększa natomiast zawartość makro- i mikroelementów w liściach, a także zawartość związków bioaktywnych, takich jak peroksydaza gwaszajolowa, mających niwelujący wpływ na skutki stresu środowiskowego

[Harizanova i in. 2022]. Efekt plonotwórczy takiego zabiegu może zatem wynikać głównie z łagodzenia stresu. W niniejszych badaniach rośliny traktowano biostymulatorem w końcowej fazie strzelania w źdźbło oraz w fazie kłoszenia. Wyżej wymienione fazy rozwojowe wystąpiły w maju i czerwcu, przy czym w obu latach badań miesiące te były nie były bardzo suche, co samo w sobie mogło mieć stymulujący wpływ na rośliny i zatrzeć plonotwórczy efekt aplikacji biostymulatora. Pomimo braku efektu plonotwórczego, zastosowanie biostymulatora miało pozytywny wpływ na jakość, a zwłaszcza na właściwości prozdrowotne ziarna jęczmienia.

W naszych badaniach stężenie poszczególnych związków karotenoidowych zależało od genotypu jęczmienia. Żółte ziarno *H. vulgare* charakteryzowało się najwyższym stężeniem zeaksantyny, która jest pigmentem nadającym żółty kolor organom roślinnym [Dufossé i in. 2018]. Genotyp *H. v. rimpai* uprawiany w obu systemach gromadził najwięcej luteiny. Zawartość  $\beta$ -karotenu była większa w ciemno wybarwionych ziarnach *H. v. nigricans* i *H. v. rimpai* w porównaniu do *H. vulgare*. Różnice w zawartości poszczególnych karotenoidów pomiędzy genotypami jęczmienia o różnej barwie ziarna wykazali również Iannucci i in. [2021].

Spośród oznaczanych karotenoidów najwyższą zawartość  $\beta$ -karotenu stwierdzono w ziarnie *H. v. nigricans*, *H. v. rimpai* i *H. vulgare*, uprawianych konwencjonalnie i ekologicznie. Inni badacze wskazują, że dominującym karotenoidem w jęczmieniu jest zeaksantyna [Siebenhandl i in. 2007; Masisi i in. 2015]. Znacząca akumulacja  $\beta$ -karotenu w ziarnie jęczmienia, wykazana w niniejszych badaniach, może być cenna dla konsumentów, ponieważ jest prekursorem syntezy witaminy A, która jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmu [Linnewiel-Hermoni i in. 2016].

W warunkach doświadczalnych nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniu karotenoidów ogółem pomiędzy genotypami jęczmienia uprawianego zarówno konwencjonalnie, jak i ekologicznie. Warto jednak zwrócić uwagę na tendencję do akumulacji większej ilości karotenoidów ogółem w ziarnie odmiany *H. v. rimpai*. Wyniki dotychczasowych badań nad koncentracją karotenoidów ogółem w ziarnach o różnych kolorach są niejednoznaczne. Wielu badaczy wskazywało, że genotypy o ciemnej barwie ziarna gromadziły większe ilości karotenoidów ogółem niż genotypy tworzące ziarniaki o zwyczajowym – żółtym wybarwieniu. Zaobserwowano te zależności u fioletowej pszenicy (mieszaniec międzygatunkowy) [Guo i in. 2013], a także u pszenicy (*Triticum aestivum*) o innych kolorach ziaren [Saini i in. 2021]. Przeciwnie, Bassolino i in. [2022] wskazali, że jęczmień i pszenica o tradycyjnej barwie ziarna mają większe całkowite stężenie karotenoidów niż genotypy tworzące ziarniaki o ciemniejszym zabarwieniu. Potrzeba więc dalszych badań, aby wyjaśnić w pełni to zagadnienie.

W ziarniakach wszystkich badanych genotypów jęczmienia stężenie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) było większe niż jednonienasyconych (MUFA) i nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) [P2]. PUFA obejmowały takie wolne kwasy tłuszczowe, jak kwas linolowy, kwas linolenowy lub kwas  $\gamma$ -linolenowy. Drugie pod względem udziału w strukturze kwasów tłuszczowych były kwasy nasycone (SFA), wśród których dominował kwas palmitynowy i stearynowy. Najmniej wśród kwasów tłuszczowych było kwasów MUFA, takich jak np. kwas oleinowy. Dane te są zgodne z wcześniejszymi badaniami Liu [2011], w których różne genotypy jęczmienia ("Baronesse" i "Merlin") charakteryzowały się najwyższą zawartością kwasu linolowego, następnie kwasu palmitynowego i najmniejszą ilością kwasu oleinowego. Potwierdzono to również w innych badaniach, w których dominował kwas linolowy, a kwas palmitynowy zajmował drugie miejsce [Qian i in. 2009]. Podobne zależności obserwowano w u alternatywnego genotypu jęczmienia

(*H. v. var. nudum* Hook.) [Xu i in. 2016]. Doniesienia literaturowe wskazują, że kwas linolowy, linolenowy, palmitynowy, stearynowy i oleinowy stanowią ponad 90% wszystkich wolnych kwasów tłuszczowych w zbożach, ale ich skład może się różnić w zależności od gatunku, a nawet odmiany [Relina i in. 2020]. Badania własne wykazały, że *H. v. rimpai* z uprawy konwencjonalnej i *H. v. nigricans* z obu systemów uprawy gromadziły większą ilość PUFA niż *H. vulgare* [P2]. Można stwierdzić, że niektóre alternatywne formy jęczmienia mogą być lepsze pod względem wartości odżywczej, zwłaszcza gdy są uprawiane ekologicznie.

Badania własne wskazują, że genotypy o czarnej barwie ziarniaków (*H. v. nigricans*, *H. v. rimpai*) charakteryzują się wyższą zawartością polifenoli ogółem niż jęczmień żółty (*H. vulgare*). Podobnie, w badaniu Abdel-Aal i in. [2012], większe całkowite stężenie polifenoli ogółem stwierdzono w ziarnach jęczmienia czarnego ("Hongqingluo") i niebieskiego ("Huiliqingluo") w porównaniu z jęczmieniem zwyczajnym. W badaniach własnych większość polifenoli w ziarnie każdego z analizowanych genotypów stanowiły kwasy fenolowe. Ge i in. [2021], analizując jęczmień o różnych kolorach ziaren, również zauważyli, że czarny jęczmień zawierał najwięcej polifenoli, w tym kwasów fenolowych i flawonoidów. W przeprowadzonym doświadczeniu pierwotne genotypy *H. v. nigricans* i *H. v. rimpai* gromadziły antocyjanidyny w ziarnie, podczas gdy nie potwierdzono obecności tych związków w żółtych ziarniakach odmiany współczesnej *H. vulgare* [P2]. Podobnie w badaniu Pereira-Caro i in. [2013] stwierdzono wysokie stężenie antocyjanidyn w ryżu (*Oryza sativa* L.) o czarnych ziarnach ('Artemide'), ale nie wykryto ich w ryżu białym. Wielu badaczy twierdzi, że kolorowe genotypy zbóż, ze względu na większe stężenie różnych związków fenolowych, mają silniejsze działanie przeciwutleniające niż tradycyjne formy tych gatunków [Ge i in. 2021; Bellido 2009]. Polifenole wykazują aktywność przeciwutleniającą, m.in. w ochronie tłuszczu, w tym nienasyconych kwasów tłuszczowych, przed wolnymi rodnikami [Shen i in. 2016], co może tłumaczyć istotną korelację zaobserwowaną w naszym doświadczeniu pomiędzy związkami fenolowymi a kwasem linolowym dla roślin uprawianych konwencjonalnie i kwasem linolenowym dla jęczmienia ekologicznego [P3]. Dodatnia korelacja między fenolami, karotenoidami i SFA a składową PC2 oraz silniejsza korelacja PUFA ze składową PC1 może wynikać z negatywnych skutków środowiskowych i wskazywać, że rośliny doświadczają stresu oksydacyjnego podczas wegetacji. Zarówno związki fenolowe [Dang i in. 2022], jak i karotenoidy [Ficco i in. 2014] są znane ze swoich właściwości przeciwutleniających i ochronnych, a ich metabolizm w roślinach jest indukowany przez stres oksydacyjny. Badania przeprowadzone na pszenicy przez Ullah i in. [2022] pokazują, że podczas stresu suszy rośliny wprowadzają zmiany również w profilu kwasów tłuszczowych, zwiększając zawartość kwasu palmitynowego (SFA) kosztem kwasów linolowego i linolenowego, podczas gdy po okresie suszy, podczas odbudowy, wzrasta udział kwasów laurynowego, mirystynowego, palmitynowego i stearynowego należących do grupy kwasów nasyconych (SFA). Rośliny próbują naprawić oksydacyjne uszkodzenia błon plazmatycznych poprzez regulację proporcji kwasów tłuszczowych, które pełnią różne funkcje w metabolizmie.

Wpływ różnego rodzaju biostymulatorów na plonowanie i cechy ilościowe zbóż jest stosunkowo dobrze zbadany, ale brakuje szczegółowych badań nad ich wpływem na parametry jakościowe ziarna. W naszych badaniach, które dotyczą tego mało poznanego obszaru, wykazano istotny wpływ biostymulatora aminokwasowego na zawartość karotenoidów, wolnych kwasów tłuszczowych i polifenoli. Aminokwasy zawarte w zastosowanym biostymulatorze są prekursorami i aktywatorami wielu procesów biochemicznych, modulując tym samym ilość poszczególnych związków bioaktywnych zawartych w roślinie [Rouphael i in. 2021]. Zjawisko to potwierdza szereg badań przeprowadzonych na różnych roślinach, np.

w uprawie pszenicy [Szpunar-Krok i in. 2021]. W badaniach własnych zaobserwowano istotny wzrost zawartości karotenoidów po zastosowaniu biostymulatora [P3]. Nalistna aplikacja biostymulatora aminokwasowego w uprawie soi, oprócz zwiększenia zawartości  $\beta$ -karotenu, spowodowała wzrost zawartości flawonoidów, antocyjanów i kwasów fenolowych [Kocira i in. 2020], co zaobserwowano również w naszym badaniu. Biostymulatory mogą również wpływać na wolne kwasy tłuszczowe, ponieważ aminokwasy są niezbędnym substratem w ich biosyntezie [Kocira i in. 2020]. Zastosowanie biostymulatora z dodatkiem aminokwasów zmieniło stosunek wolnych kwasów tłuszczowych na korzyść kwasów wielonienasyconych w rzepaku [He i in. 2020] i soi [Petrova i in. 2023]. Jednak w badaniach własnych i eksperymencie przeprowadzonym na orzechu laskowym [Szparaga i in. 2021] zauważono, że biostymulator zmniejszył ilość PUFA przy jednoczesnym zwiększeniu zawartości nasyconych i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. Uzyskane różnice mogą wynikać z odmiennego składu zastosowanych biostymulatorów. Preparat zastosowany w badaniach własnych, podobnie jak na orzechu laskowym, bazował na czystych aminokwasach roślinnych, podczas gdy pozostałe preparaty zawierały również mikroelementy. Żelazo jest dodatkiem do wielu biostymulatorów. Jest niezbędne do tworzenia ferredoksyny, która odgrywa ważną rolę w NADPH jako donor elektronów dla desaturazy stearylowej, enzymu niezbędnego do tworzenia nienasyconych kwasów tłuszczowych [Pascoalino i in. 2021]. Można zatem przypuszczać, że same aminokwasy wpływają na zmianę składu wolnych kwasów tłuszczowych, natomiast na kierunek zmian: nasycone-nienasycone, większy wpływ mają inne składniki, np. żelazo. Tezę tę potwierdzają badania Tousi i in. [2014], w których zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w soi istotnie wzrosła po zastosowaniu preparatu z żelazem, podczas gdy po zastosowaniu czystych aminokwasów takiej reakcji nie udowodniono. System gospodarowania (ekologiczny, konwencjonalny) ma wpływ na akumulację związków biochemicznych w roślinach. Porównywalne do otrzymanych w badaniach własnych wyniki dla karotenoidów opisano dla lokalnych odmian jęczmienia ("Naket") w pracy Hussain i in. [2021], a także genotypów pszenicy ("Andriolo", "Gentil rosso", "Palesio") według Di Silvestro i in. [2017]. Zmiana systemu uprawy na ekologiczny zwiększyła stężenie związków fenolowych w pszenicy durum [Pandino i in. 2020], orkiszu [Fares i in. 2019] lub pszenicy twardej czerwonej [Tian i in. 2022]. Niektórzy badacze tłumaczą zwiększone zawartości tych roślinnych związków w ziarnach organicznych zmianami w metabolizmie, które wynikają z dostępności azotu i innych ważnych makroelementów w glebie oraz ich wzajemnego stosunku [Gałązka i in. 2011]. Niedobór azotu zwiększa aktywność enzymu liazy L-fenylalaniny, który eliminuje amoniak z aminokwasów aromatycznych i prowadzi do syntezy kwasu cynamonowego, który jest prekursorem wielu związków fenolowych w roślinach [Gałązka i in. 2011]. Zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych również wzrasta z powodu ograniczonej dostępności azotu [Abd El-Satar i in. 2017]. Ponadto wiele metabolitów wtórnych bierze udział w reakcjach obronnych roślin na stropy biotyczne i abiotyczne. Grupa ta obejmuje również fenole, karotenoidy i wolne kwasy tłuszczowe, które biorą udział w procesach odpornościowych roślin, a ich synteza jest zwiększona w odpowiedzi na atak patogenów [Buczek i in. 2023; Bhattacharya i in. 2010; Swapnil i in. 2021]. W uprawach ekologicznych, gdzie pestycydy nie są stosowane do zwalczania szkodników, wyższa akumulacja takich związków jest wysoce pożądana. Z drugiej strony, istnieje wiele badań, które nie potwierdzają wzrostu stężenia fitochemikaliów w roślinach uprawianych ekologicznie. Badania Stracke i in. [2009] oraz Konopka i in. [2012] nie wykazały statystycznej różnicy w zawartości karotenoidów między pszenicą uprawianą ekologicznie i konwencjonalnie.

Wśród oznaczonych kwasów fenolowych dominującym był kwas ferulowy, będący pochodną kwasu hydroksycynamonowego. Podobnie inni badacze [Cai i in. 2015; Zhu i in. 2015] wskazują na najwyższy udział kwasu ferulowego w składzie kwasów fenolowych w ziarnie jęczmienia. Synteza i akumulacja kompozycji fitochemicznych w tkankach roślinnych zależy od genotypu, środowiska uprawy i ich interakcji [Kiani i in. 2021]. W badaniach Jin i in. [2022] genotypy jęczmienia o czarnym ziarnie charakteryzowały się istotnie wyższym stężeniem związków fenolowych ogółem i kwasów fenolowych ogółem w porównaniu do genotypów o żółtym ziarnie. Podobnie w niniejszym badaniu profil kwasów fenolowych zależał od genotypu jęczmienia. Kwasy galusowy i chlorogenowy występowały najobficiej w żółtym ziarnie odmiany 'Soldo'. W porównaniu do ziarna tej odmiany, czarno zabarwione ziarno genotypów pierwotnych (*H. v. nigricans* i *H. v. rimpau*) zawierało istotnie więcej kwasów fenolowych, takich jak kwas 2,5-hydroksybenzoesowy, kwas protokatechowy, kwas kawowy, kwas ferulowy i kwas syringowy.

Wśród oznaczonych w ziarniakach jęczmienia flawonoidów, największy ilościowy udział miały naringenina i kwercetyna. Było ich istotnie więcej niż w żółtych ziarniakach odmiany współczesnej. Według Glagoleva i in. [2017] szlaki metaboliczne odpowiedzialne za czarny kolor ziaren wynikają z obecności genu B1p, który wpływa na zwiększoną syntezę związków fenolowych, które z kolei tworzą czarną pigmentację ziaren w procesie utleniania. W niniejszych badaniach, oprócz czynników genetycznych, na koncentrację kwasów fenolowych i flawonoidów wpływały również czynniki agrotechniczne. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na korzystny wpływ systemu uprawy ekologicznej na zawartość kwasów fenolowych w ziarnie. Genotypy alternatywne zwiększyły stężenie kwasu protokatechowego w ziarnie, natomiast *H. vulgare* 'Soldo' zareagował wzrostem zawartości kwasu ferulowego. W badaniach Ostrowskiej-Kołodziejczak i in. [2016] ziarno mieszanki zbożowej owsa, pszenicy i jęczmienia uprawianej w systemie ekologicznym zawierało istotnie więcej kwasów fenolowych, w szczególności kwasu ferulowego i p-kumarowego. Wpływ rolnictwa ekologicznego na zawartość związków fenolowych w produktach rolnych stał się przedmiotem metaanalizy przeprowadzonej przez Barańskiego i in. [Barański i in. 2014]. Autorzy ci na podstawie 343 recenzowanych publikacji wskazali, że stężenie kwasów fenolowych w żywności pochodzącej z rolnictwa ekologicznego jest o 19% większe w porównaniu do systemu konwencjonalnego. Większe stężenie związków fenolowych w uprawach ekologicznych może być wynikiem zwiększonego stresu biotycznego i abiotycznego występującego w takim systemie rolnictwa, ponieważ wiele związków fenolowych jest gromadzonych przez rośliny w odpowiedzi na warunki stresowe. Związki fenolowe, w tym flawonoidy, odgrywają ważną rolę biochemiczną i fizjologiczną w komórkach roślinnych, szczególnie pomagając w łagodzeniu stresu środowiskowego [Kiani i in. 2021]. Ekspresja genu HvPAL, który koduje enzym amoniaku fenyloalaniny, była zwiększona w jęczmieniu tolerującym sól, podczas gdy była zmniejszona w jęczmieniu wrażliwym na stres solny [Garaghanipor i in. 2022]. Według Przybylskiej-Balcerek i in. [2022] kwas ferulowy ma właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, a efekt ten jest zwiększony w wyniku synergii połączenia tego kwasu z kwasami synapowym i galusowym oraz niektórymi flawonoidami. Nie ma jednak jednoznacznych dowodów na związek między presją szkodników a stężeniem polifenoli w uprawach ekologicznych. Z drugiej strony rośnie liczba doniesień dowodzących, że różnice w systemach nawożenia, zwłaszcza nawożenia azotem, między ekologicznymi i konwencjonalnymi systemami rolniczymi są ważnym czynnikiem wpływającym na stężenie związków fenolowych w uprawach ekologicznych [Barański i in. 2014]. W niniejszym badaniu stwierdzono również istotne różnice w sposobie nawożenia pomiędzy porównywanymi

systemami uprawy. W produkcji konwencjonalnej stosowano dawkę 60 kg N ha<sup>-1</sup> w postaci saletry amonowej, natomiast w uprawie ekologicznej nie stosowano żadnych nawozów, nawet organicznych, przed uprawą jęczmienia. Spowodowało to widoczne oznaki niedoboru azotu w okresie wegetacji. Potencjalnie mogło to przyczynić się do wzrostu różnic w stężeniu związków fenolowych pomiędzy porównywanymi systemami uprawy. Szlak metabolizmu fenylopropanoidów i różnorodność czynników indukujących ich syntezę w roślinach jest regulowany przez ekspresję wielu rodzin genów kodujących enzymy uczestniczące w tym szlaku – amoniakolizy L-fenylalaniny (PAL) i syntazy chalkonu (CHS). Różne czynniki biotyczne i abiotyczne działające na rośliny wpływają na poziom transkrypcji genów kodujących enzymy szlaku syntezy fenylopropanoidów [Matsumoto i in. 2012]. Według Ma i in. [2019] zróżnicowane genotypy jęczmienia pod wpływem stresu wykazują zmiany w poziomie akumulacji białek zaangażowanych w metabolizm wtórny - głównie liazy amoniakalnej fenyloalaniny (PAL), reduktazy izoflawonowej i O-metylotransferazy kwasu kawowego, enzymu odpowiedzialnego za przekształcanie kwasu kawowego w kwas ferulowy. Aminokwasy z kolei charakteryzują się wysoką mobilnością i łatwym transportem w roślinach. Dzięki temu oraz swojej aktywności biologicznej wpływają na syntezę substancji białkowych w roślinach, co przekłada się również na wzrost aktywności enzymów i produkcję związków fenolowych [Hammad i Ali 2014].

Ciemne ziarna zawierały również znaczne ilości fitomelaniny. Oprócz czynników genetycznych wpływ na zawartość tego związku miały również czynniki rolnicze. Ziarno pochodzące z rolnictwa ekologicznego zawierało o 16% więcej tego związku w porównaniu z konwencjonalnym systemem. Jednakże zastosowanie nalistne biostymulatora aminokwasowego miało znacznie silniejszy wpływ na zawartość fitomelaniny, której zawartość kilkukrotnie zwiększyła się w ziarnach *H. v. nigricans* i *H. v. rimpaii*. Melanina jest biopolimerem o ciemnej pigmentacji, który jest szeroko rozpowszechniony wśród organizmów żywych i nadaje im ciemny kolor [Shoeva i in. 2020]. Fitomelaniny są syntetyzowane przez enzymatyczne utlenianie prostych prekursorów fenolowych, takich jak tyrozyna, kwas cynamonowy i pochodne kwasu cynamonowego [Glagoleva i in. 2022]. Biosynteza fitomelaniny jest kontrolowana przez gen B1p1 zlokalizowany w locus 0,8 Mb na chromosomie 1H [Glagoleva i in. 2017]. Badane czynniki agrotechniczne wpłynęły na zawartość fitomelaniny w podobny sposób jak stężenie kwasów fenolowych, co zdaje się potwierdzać doniesienia o syntezie tego związku z pochodnych kwasu cynamonowego. Twierdzenie to jest również poparte wysokim współczynnikiem korelacji pomiędzy zawartością fitomelaniny a stężeniem kwasów fenolowych i flawonoidów. Aktywność antyoksydacyjna ABTS<sup>+</sup> w znacznym stopniu zależała od czynnika genetycznego. Genotypy alternatywne charakteryzowały się większą zdolnością do usuwania wolnych rodników niż *H. vulgare*, co wynikało ze znacznie większego stężenia związków bioaktywnych. Wykazano silną pozytywną korelację pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną ABTS<sup>+</sup> a stężeniem kwasu syringowego, naringeniny, kwercetyny, luteoliny i fitomelaniny. Według innych badaczy [Glagoleva i in. 2022], kwasy hydroksycynamonowe charakteryzują się wyższą aktywnością przeciwutleniającą niż kwasy hydroksybenzoesowe. Według Chen i in. [2020], oprócz podstawowej struktury, na moc wychwytywania wolnych rodników przez poszczególne kwasy fenolowe wpływa również ich struktura, w szczególności obecność grup hydroksylowych i metoksyloowych. W badaniu Chen i wsp. [2020] dihydroksykwas (kwas kawowy i protokatechowy) miały wyższą aktywność przeciwutleniającą niż inne kwasy fenolowe, z wyjątkiem kwasów o największej liczbie grup metoksyloowych (kwas synapowy i syringowy). Według tych autorów, w grupie pochodnych kwasu benzoowego największą zdolność do

usuwania wolnych rodników ma kwas syringowy, którego potencjał antyoksydacyjny jest dziesiątki tysięcy razy większy niż w przypadku kwasu 4-hydroksybenzoesowego. Raporty te wyjaśniają silną korelację pomiędzy zawartością kwasu syringowego, a aktywnością przeciwutleniającą obserwowaną w badaniach własnych. Spośród kwasów fenolowych występujących w ziarnach, kwasy syringowy i kawowy są związkami o największej zdolności do usuwania wolnych rodników. Tylko kwas syringowy ma większy potencjał, ale był obecny w ziarnach w ilości kilkakrotnie mniejszej od kwasów syringowego i kawowego. Jego szczególnie wysokie stężenie stwierdzono w ziarnach genotypów alternatywnych. Ziarniaki te zawierały również znacznie więcej innych kwasów o silnym działaniu antyoksydacyjnym (kawowy i protokatechowy) niż *H. vulgare* 'Soldo'.

W niniejszym badaniu analiza korelacji wykazała również silny związek między aktywnością antyoksydacyjną ABTS<sup>+</sup> a zawartością flawonoidów (naringeniny, kwercetyny i luteoliny) w ziarnach. Flawonoidy charakteryzują się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym, co wynika z ich struktury chemicznej [Pietta i in. 2000]. Kwercetynę i luteolinę można wskazać jako najsilniejsze przeciwutleniacze spośród związków wykrywanych w badanych ziarnach jęczmienia. W badaniu Chena i in. [2022] na kolorowych odmianach ryżu aktywność przeciwutleniająca była silnie skorelowana z zawartością naringeniny. Jeśli chodzi o kwasy fenolowe i flawonoidy, niniejsze badanie wykazało również silny pozytywny związek między ABTS<sup>+</sup> i zawartością fitomelaniny. Jednakże w literaturze brakuje informacji na temat właściwości przeciwutleniających tego związku. Potwierdzono również związek między zawartością fitomelaniny a zawartością kwasu syringowego, kwercetyny, naringeniny i luteoliny. Wiadomo również, że fitomelanina powstaje z utlenionych związków fenolowych [Glagoleva i in. 2022]. Korelacja pomiędzy zawartością fitomelaniny a aktywnością przeciwutleniającą była więc prawdopodobnie związana ze stężeniem i utlenianiem wspomnianych związków fenolowych. W badaniach Yang i in. [2022] ciemno zabarwione genotypy jęczmienia charakteryzowały się wyższym potencjałem antyoksydacyjnym, co wiązało się z zawartością związków fenolowych. Wielu autorów uzyskało podobną wysoką korelację aktywności antyoksydacyjnej i zawartości związków fenolowych w genotypach barwnego jęczmienia [Lin i in. 2018; Suriano i in. 2018; Dang i in. 2022]. Wyniki te wskazują zatem, że oprócz całkowitej zawartości kwasów fenolowych, skład związków fenolowych ma również duże znaczenie dla aktywności przeciwutleniającej ziarna. Podobieństwo dwóch badanych czarnych genotypów (*H. v. nigricans* i *H. v. rimpau*) oraz różnica między współczesną odmianą żółto-ziarnistą pod względem składu związków bioaktywnych i aktywności antyoksydacyjnej została również potwierdzona przez analizę skupisk aglomeracji. Równie silnym czynnikiem różnicowania wartości tych zmiennych było zastosowanie biostymulatora.



## 8. Wnioski

1. W warunkach suszy w okresie początkowego wzrostu roślin (faza siewki) *Hordeum vulgare* var. *rimpau* Wittm charakteryzował się istotnie większymi wartościami wskaźników świadczących o efektywności funkcjonowania fotosyntezy w porównaniu z odmianą współczesną 'Soldo' oraz *Hordeum vulgare* var. *nigricans* (Ser.) Korn, co może wskazywać na genetycznie uwarunkowaną, zwiększoną tolerancję tego genotypu na niedobór wody.
2. Odmiana współczesna 'Soldo' jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) w większym stopniu wykorzystywała swój potencjał genetyczny do wysokiego plonowania w optymalnych warunkach pogodowych; przy długotrwałym niedoborze wody plon ziarna tej odmiany był istotnie większy jedynie w porównaniu z *H. v. var. nigricans*.
3. Większy potencjał produkcyjny odmiany współczesnej jęczmienia w stosunku do obu genotypów alternatywnych wynikał z większej masy tysiąca ziaren oraz istotnie większej w porównaniu z *H. v. var. nigricans* liczby ziaren w kłosie oraz płodnych pędów generatywnych na 1 m<sup>2</sup>.
4. W roku o optymalnych warunkach hydrotermicznych alternatywne genotypy jęczmienia tworzyły większą powierzchnię asymilacyjną (LAI) w fazie liścia flagowego i kłoszenia w porównaniu z odmianą 'Soldo', ale charakteryzowały się jednocześnie mniejszymi wartościami wskaźników funkcjonowania PSII i indeksem zieloności (SPAD) liścia podflagowego. W roku suchym wartości LAI i SPAD były zbliżone u wszystkich badanych genotypów.
5. Ziarno genotypów alternatywnych *H. v. var. rimpau* i *H. v. var. nigricans* zawierało istotnie więcej związków fenolowych (kwasów fenolowych, flawonoidów i antocyjanidyn) a także wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu z odmianą współczesną 'Soldo' *H. vulgare*.
6. Genotypy alternatywne charakteryzowały się istotnie większą koncentracją luteiny i  $\beta$ -karotenu w ziarnie w porównaniu z odmianą współczesną. Nie wykazano jednak różnic w zawartości karotenoidów ogółem, z uwagi na wyższą koncentrację zeaksantyny w ziarniakach odmiany 'Soldo'.
7. Aplikacja nalistna biostymulatora aminokwasowego zwiększyła koncentrację karotenoidów w ziarnie wszystkich badanych genotypów, a także zawartość związków fenolowych, w tym kwasów fenolowych i flawonoidów w ziarnie *H. v. var. rimpau* i *H. v. var. nigricans*. Ziarno roślin nie poddanych aplikacji charakteryzowało się jednak większym udziałem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w ogólnej sumie kwasów tłuszczowych.
8. Produkcyjność współczesnego jak i alternatywnych genotypów jęczmienia była większa w uprawie konwencjonalnej. Ekologiczny system uprawy sprzyjał jednak większej koncentracji związków bioaktywnych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w ziarnie.
9. Analizowane genotypy jęczmienia różniły się między sobą pod względem profilu związków fenolowych. Odmiana 'Soldo' zawierała istotnie najwięcej kwasu galusowego i chlorogenowego oraz witaksyny. *H. v. var. rimpau* charakteryzował się natomiast większą niż pozostałe genotypy koncentracją kwasu 2,5-dihydroksybenzoesowego, protokatechowego, syryngowego, kawowego, synapowego

i ferulowego, a także naringeniny i apigeniny. Genotyp ten zawierał także więcej luteoliny niż odmiana współczesna.

10. Najsilniejszy wpływ nalistnej aplikacji biostymulatora aminokwasowego na akumulację związków bioaktywnych w ziarnie obserwowano u *H. v. var. rimpaii*, w którym zabieg ten stymulował syntezę fitomelaniny i flawonoidów (naringeniny, witaksyny, apigeniny, kampferolu i luteoliny), a także kwasów fenolowych – kawowego i ferulowego.
11. Ziarno alternatywnych genotypów jęczmienia w porównaniu z odmianą współczesną charakteryzowało się większą aktywnością przeciwutleniającą ABTS<sup>+</sup>, która była dodatnio skorelowana z zawartością kwasu syringowego, naringeniny, kwercetyny luteoliny i fitomelaniny, co potwierdza silne właściwości przeciwutleniające tych związków.
12. Wykazana w badaniach podwyższona koncentracja związków bioaktywnych w ziarnie alternatywnych genotypów jęczmienia *H. v. var. rimpaii* i *H. v. var. nigricans* wskazuje na ich przydatność do produkcji żywności funkcjonalnej. Dalsze prace badawcze powinny być ukierunkowane na rozpoznanie molekularnych podstaw zwiększonej syntezy związków fenolowych w ziarnie oraz odporności na abiotyczne czynniki stresowe.

## Literatura

1. Abd EL-Satar, M.A.; Ahmed, A.A.E.H.; Hassan, T.H.A. Response of seed yield and fatty acid compositions for some sunflower genotypes to plant spacing and nitrogen fertilization. *Inf. Process. Agric.* 2017, 4, 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2017.05.003>
2. Abdel-Aal EM., Choo TM, Dhillon S., Rabalski I. Free and Bound Phenolic Acids and Total Phenolics in Black, Blue, and Yellow Barley and Their Contribution to Free Radical Scavenging Capacity. *Cereal Chemistry*. 2012; 89(4), 198–204.
3. Abdelhamid, A.S.; Martin, N.; Bridges, C.; Brainard, J.S.; Wang, X.; Brown, T.J.; Hanson, S.; Jimoh, O.F.; Ajabnoor, S.M.; Deane, K.H.; et al. Polyunsaturated Fatty Acids for the Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018, 11, CD012345. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012345.pub3>
4. Alqudah, A.M.; Schnurbusch, T. Barley Leaf Area and Leaf Growth Rates Are Maximized during the Pre-Anthesis Phase. *Agronomy* 2015, 5, 107–129. <https://doi.org/10.3390/agronomy5020107>
5. Arab, M.M.; Askari, H.; Aliniaiefard, S.; Mokhtassi-Bidgoli, A.; Estaji, A.; Sadat-Hosseini, M.; Sohrabi, S.S.; Mesgaran, M.B.; Leslie, C.A.; Brown, P.J.; et al. Natural variation in photosynthesis and water use efficiency of locally adapted Persian walnut populations under drought stress and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* 2023, 201, 107859. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107859>
6. Asami DK., Hong YJ., Barrett DM., Mitchell AE. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J Agric Food Chem.* 2003; 51:1237–41. pmid:12590461
7. Ashraf M.Y., Azhar N., Hussain M. Indole acetic acid (IAA) induced changes in growth, relative water contents and gas exchange attributes of barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under water stress conditions *Pl. Growth. Regul.* 2006, 50: 85-90
8. Baker BP., Meints BM., Hayes PM. Organic barley producers' desired qualities for crop improvement. *Org. Agr.* 2020; 10(1), p. 35–42. <https://doi.org/10.1007/s13165-020-00299-y>
9. Barański M., Średnicka-Tober D., Volakakis N., Seal C., Sanderson R., Stewart GB., et al. Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review and meta-analyses. *British Journal of Nutrition.* 2014; 112(5), 794–811. pmid:24968103
10. Bassolino, L.; Petroni, K.; Polito, A.; Marinelli, A.; Azzini, E.; Ferrari, M.; Ficco, D.B.M.; Mazzucotelli, E.; Tondelli, A.; Fricano, A.; et al. Does Plant Breeding for Antioxidant-Rich Foods Have an Impact on Human Health? *Antioxidants* 2022, 11, 794. <https://doi.org/10.3390/antiox11040794>
11. Bellido, G.G.; Beta, T. Anthocyanin Composition and Oxygen Radical Scavenging Capacity (Orac) of Milled and Pearled Purple, Black, and Common Barley. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1022–1028. <https://doi.org/10.1021/jf802846x>
12. Bhattacharya, A.; Sood, P.; Citovsky, V. The Roles of Plant Phenolics in Defence and Communication during Agrobacterium and Rhizobium Infection. *Mol. Plant Pathol.* 2010, 11, 585–719. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x>
13. Brown, P.; Saa, S. Biostimulants in Agriculture. *Front. Plant Sci.* 2015, 6, 671. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00671>
14. Buczek, J.; Jańczak-Pieniżek, M.; Harasim, E.; Kwiatkowski, C.A.; Kapusta, I. Effect of Cropping Systems and Environment on Phenolic Acid Profiles and Yielding of Hybrid Winter Wheat Genotypes. *Agriculture* 2023, 13, 834. <https://doi.org/10.3390/agriculture13040834>
15. Cai S., Han Z., Huang Y., Chen ZH., Zhang G., Dai F. Genetic diversity of individual phenolic acids in barley and their correlation with barley malt quality. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63, 7051–7057. pmid:26173650

16. Chen J., Yang J., Ma L., Li J., Shahzad N., Kim CK. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Scientific Reports*. 2020; 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59451-z>
17. Chen J., Yang Y., Yang X., Zhu G., Lu X., Jia F., et al. Investigation of flavonoid components and their associated antioxidant capacity in different pigmented rice varieties. *Food Research International*. 2022 161. pmid:36192868
18. Chen, T.; Li, C.; White, J.; Nan, Z. Effect of the fungal endophyte *Epichloë bromicola* on polyamines in wild barley (*Hordeum brevisubulatum*) under salt stress. *Plant Soil* 2019, 436, 29–48. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03913-x>
19. Choo TM., Vigier B., Savard ME., Blackwell B., Martin R., Wang JM., et al. Black Barley as a Means of Mitigating Deoxynivalenol Contamination. *Crop Science*. 2015; 55(3), 1096–1103.
20. COBORU. Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2018 – zboża jare. Słupia Wielka 2018.
21. COBORU. Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2023 – zboża jare. Słupia Wielka 2023.
22. Czembor E., Kaczmarek Z., Pilarczyk W., Mańkowski D., Czembor JH. Simulating Spring barley Yield under Moderate Input Management System in Poland. *Agriculture*. 2022; 12(8), 1091. <https://doi.org/10.3390/agriculture12081091>
23. Dai, F.; Nevo, E.; Wu, D.; Comadran, J.; Zhou, M.; Qiu, L.; Chen, Z.; Beiles, A.; Chen, G.; Zhang, G. Tibet is one of the centers of domestication of cultivated barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 16969–16973. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215265109>
24. Dang, B.; Zhang, W.-G.; Zhang, J.; Yang, X.-J.; Xu, H.-D. Evaluation of Nutritional Components, Phenolic Composition, and Antioxidant Capacity of Highland Barley with Different Grain Colors on the Qinghai Tibet Plateau. *Foods* 2022, 11, 2025. <https://doi.org/10.3390/foods11142025>
25. Di Silvestro, R.; Di Loreto, A.; Bosi, S.; Bregola, V.; Marotti, I.; Benedettelli, S.; Segura-Carretero, A.; Dinelli, G. Environment and Genotype Effects on Antioxidant Properties of Organically Grown Wheat Varieties: A 3-Year Study. *J. Sci. Food Agric*. 2017, 97, 641–649. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7782>
26. Dufossé, L. Microbial Pigments from Bacteria, Yeasts, Fungi, and Microalgae for the Food and Feed Industries. In *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*; Handbook of Food Bioengineering; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 7, pp. 113–132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811518-3.00004-1>
27. Elakhdar, A.; Slaski, J.; Kubo, T.; Hamwieh, A.; Hernandez-Ramirez, G.; Beattie, A.D.; Capochichi, L.J.A. Genome—Wide association analysis provides insights into the genetic basis of photosynthetic responses to low-temperature stress in spring barley. *Front. Plant Sci*. 2023, 14, 1159016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1159016>
28. El-Hashash EF., El-Absy KM. Barley (*Hordeum vulgare* L.) breeding. *Advances in Plant Breeding Strategies*. *Cereals*. 2019; 5, p. 1–45.
29. Ertani A., Pizzeghello D., Francioso O., Sambo P., Sanchez-Cortes S., Nardi S. Capsicum chinensis L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a longterm period: Chemical and metabolomic approaches. *Frontiers in Plant Science*. 2014; 5, 375. pmid:25136346
30. European Biostimulants Industry Council (EBIC). Multiple-Use Components in Plant Biostimulants. 2021. Available online: [https://biostimulants.eu/wp-content/uploads/2021/11/20211104-EBIC-MultipleUse-Position-v11\\_final.pdf](https://biostimulants.eu/wp-content/uploads/2021/11/20211104-EBIC-MultipleUse-Position-v11_final.pdf).
31. Fang, H.; Baret, F.; Plummer, S.; Schaeppman-Strub, G. An overview of global leaf area index (LAI): Methods, products, validation, and applications. *Rev. Geophys*. 2019, 57, 739–799. <https://doi.org/10.1029/2018RG000608>
32. Fares, C.; Menga, V.; Codianni, P.; Russo, M.; Perrone, D.; Suriano, S.; Savino, M.; Rascio, A. Phenolic Acids Variability and Grain Quality of Organically and Conventionally Fertilised Old Wheats under a Warm Climate. *J. Sci. Food Agric*. 2019, 99, 4615–4623. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9701>

33. Faseela, P.; Sinisha, A.K.; Brestič, M.; Puthur, J.T. Chlorophyll a fluorescence parameters as indicators of a particular abiotic stress in rice. *Photosynthetica* 2019, *57*, 108–115. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.147>
34. Ficco, D.B.M.; Mastrangelo, A.M.; Trono, D.; Borrelli, G.M.; De Vita, P.; Fares, C.; Beleggia, R.; Platani, C.; Papa, R. The Colours of Durum Wheat: A Review. *Crop Pasture Sci.* 2014, *65*, 1–15. <https://doi.org/10.1071/CP13293>
35. Food and Agriculture Organization of the United Nation. FAOSTAT 2023: Crops and Livestock Products. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
36. Gałazka, A. Conversion of phenolic compounds and the role of L-phenylalanine ammonia lyase (PAL) in the induction of plant defense mechanism. *Pol. J. Agron.* 2011, *15*, 83–88.
37. Garaghanipor N., Arzani A., Rahimmalek M., Ravash R. Physiological and Transcriptome Indicators of Salt Tolerance in Wild and Cultivated Barley. *Front. Plant Sci.* 2022; *14*:13:819282. pmid:35498693
38. Ge, X.; Jing, L.; Zhao, K.; Su, C.; Zhang, B.; Zhang, Q.; Han, L.; Yu, X.; Li, W. The Phenolic Compounds Profile, Quantitative Analysis and Antioxidant Activity of Four Naked Barley Grains with Different Color. *Food Chem.* 2021, *335*, 127655. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127655>
39. Geng, L.; Li, M.; Zhang, G.; Ye, L. Barley: A Potential Cereal for Producing Healthy and Functional Foods. *Food Qual. Saf.* 2022, *6*, fyac012. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyac012>
40. Glagoleva A., Kukueva T., Mursalimov S., Khlestkina E., Shoeva O. Effects of Combining the Genes Controlling Anthocyanin and Melanin Synthesis in the Barley Grain on Pigment Accumulation and Plant Development. *Agronomy.* 2022; *12*, 112. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010112>
41. Glagoleva A., Shmakov N., Shoeva O., Vasiliev G., Shatskaya N., Börner A., et al. Metabolic pathways and genes identified by RNA-seq analysis of barley near-isogenic lines differing by allelic state of the *Black lemma and pericarp* (Blp) gene. *BMC Plant Biology.* 2017; *17*(Suppl 1):182. pmid:29143606
42. Glenn E.P., Huete A.R., Nelson P.L., Nelson S.G. Relationship between Remotely-sensed Vegetation Indices, canopy attributes and plant physiological processes: What Vegetation Indices Can and Cannot Tell Us About the Landscape. *Sensors.* 2008, *8*: 2136-2160.
43. Gong, L. Barley. In *Bioactive Factors and Processing Technology for Cereal Foods*; Wang, J., San, B., Tsao, R., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2019.
44. Gordeeva, E.I.; Glagoleva, A.Y.; Kukoeva, T.V.; Khlestkina, E.K.; Shoeva, O.Y. Purple-grained barley (*Hordeum vulgare* L.): Marker-assisted development of NILs for investigating peculiarities of the anthocyanin biosynthesis regulatory network. *BMC Plant Biol.* 2019, *19*, 49–57. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1638-9>
45. Gozdowski, D.; Mądry, W.; Wyszynski, Z.; Kalinowska-Zdun, M. Characteristics and empirical comparison of simple and complex path analysis in grain yield determination by yield—Related traits. Part II. Example on spring barley. *Biul. Inst. Hod. I Aklim. Roślin* 2008, *249*, 125–132.
46. Górny A.G., Garczyński S., Banaszak Z., Ługowska B., Grzesiak S., Bandurska H., Komosa A. 2004. Photosynthetic activity and efficiency of gas exchange of the upper leaves in field-grown cultivars of winter wheat under varied nitrogen nutrition. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 2004, *496*: 61-72.
47. Grajek, W. Przeciwnutleniające w Żywności. In *Aspekty Zdrowotne, Technologiczne, Molekularne i Analityczne*; Wydawnictwa Naukowo-Techniczne: Warszawa, Poland, 2007.
48. Grzyś E. Wpływ wybranych substancji biologicznie czynnych na kukurydze wybraną w warunkach stresu. Monografie CXLV, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław 2012.
49. Guo, T.; Horvath, C.; Chen, L.; Chen, J.; Zheng, B. Understanding the Nutrient Composition and Nutritional Functions of Highland Barley (Qingke): A Review. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, *103*, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.011>
50. Guo, Z.F.; Zhang, Z.B.; Xu, P.; Guo, Y.N. Analysis of Nutrient Composition of Purple Wheat. *Cereal Res. Commun.* 2013, *41*, 293–303. <https://doi.org/10.1556/CRC.2012.0037>

51. Haas, M.; Schreiber, M.; Mascher, M. Domestication and crop evolution of wheat and barley: Genes, genomics, and future directions. *J. Integr. Plant Biol.* 2019, *61*, 204–225. <https://doi.org/10.1111/jipb.12737>
52. Hammad SAR., Ali OAM. Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract. *Annals of Agricultural Science.* 2014; *59*(1), p. 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2014.06.018>
53. Harizanova, A.; Koleva-Valkova, L.; Vassilev, A. Effects of the Protein Hydrolysate Pretreatment on Cucumber Plants Exposed to Chilling Stress. *Acta Agrobot.* 2022, *75*, 1–8. <https://doi.org/10.5586/aa.756>
54. Hasanuzzaman, M.; Shabala, L.; Brodribb, T.J.; Zhou, M.; Shabala, S. Understanding the Role of Physiological and Agronomical Traits during Drought Recovery as a Determinant of Differential Drought Stress Tolerance in Barley. *Agronomy* 2022, *12*, 2136. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092136>
55. He, M.; Qin, C.; Wang, X.; Ding, N. Plant Unsaturated Fatty Acids: Biosynthesis and Regulation. *Front. Plant Sci.* 2020, *11*, 390. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00390>
56. Hooper, L.; Martin, N.; Jimoh, O.F.; Kirk, C.; Foster, E.; Abdelhamid, A.S. Reduction in Saturated Fat Intake for Cardiovascular Disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020, *8*, CD011737. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011737>
57. Horvat D., Šimić G., Drezner G., Lalić A., Ledencan T., Tucak M., et al. Phenolic acid profiles and antioxidants activity of major cereal crops. *Antioxidants.* 2020; *9*, 527. <https://doi.org/10.3390/antiox9060527>
58. Hussain, A.; Larsson, H.; Johansson, E. Carotenoid Extraction from Locally and Organically Produced Cereals Using Saponification Method. *Processes* 2021, *9*, 783. <https://doi.org/10.3390/pr9050783>
59. Iannucci, A.; Suriano, S.; Codianni, P. Genetic Diversity for Agronomic Traits and Phytochemical Compounds in Coloured Naked Barley Lines. *Plants* 2021, *10*, 1575. <https://doi.org/10.3390/plants10081575>
60. Idehen, E.; Tang, Y.; Sang, S. Bioactive phytochemicals in barley. *J. Food Drug Anal.* 2017, *25*, 148–161. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.08.002>
61. Ingver A., Tamm I., Tamm U., Effect of organic and conventional production on yield and the quality of spring cereals. *Latvian Journal of Agronomy.* 2008, *11*, s. 61-67.
62. Jia, Q.; Wang, Y.-P. Relationships between Leaf Area Index and Evapotranspiration and Crop Coefficient of Hilly Apple Orchard in the Loess Plateau. *Water* 2021, *13*, 1957. <https://doi.org/10.3390/w13141957>
63. Jin HM., Bin D. Wen-Gang Z., Wan-Cai Z., Xi-Juan Y. Polyphenol and anthocyanin composition and activity of highland barley with different colors. *Molecules.* 2022; *27*,(11): 3411. pmid:35684349
64. Kaur R., Das S., Bansal S., Singh G., Sardar S., Dhar H., et al. Heavy metal stress in rice: Uptake, transport, signaling, and tolerance mechanisms. *Physiologia Plantarum.* 2021; *173*(1), 430–448. pmid:34227684
65. Kaur, N.; Chugh, V.; Gupta, A.K. Essential Fatty Acids as Functional Components of Foods—A Review. *J. Food Sci. Technol.* 2014, *51*, 2289–2303. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0677-0>
66. Kiani R., Arzani A., Maibody S.A.M.M. Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Activity Involved in Salt Tolerance in Wheat, *Aegilops culindrica* and Their Amphidiploids. *Front. Plant Sci.* 2021; *12*:646221.
67. Kim, M.J.; Hyun, J.N.; Kim, J.A.E.; Park, J.C.; Kim, M.Y.; Kim, J.G.; Lee, S.J.; Chun, S.C.; Chung, I.M. Relationship between Phenolic Compounds, Anthocyanins Content and Antioxidant Activity in Colored Barley Germplasm. *J. Agric. Food Chem.* 2007, *55*, 4802–4809. <https://doi.org/10.1021/jf0701943>
68. Kobus Z., Pecyna A., Buczaj A., Krzywicka M., Przywara A., Nadulski R. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from cannabis sativa L. leaves and inflorescences using response surface methodology. *Appl. Sci.* 2022; *12*(13), 6747. <https://doi.org/10.3390/app12136747>

69. Kocira S. Effect of amino acid biostimulant on the yield and nutraceutical potential of soybean. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2019; 79(1), p 17–25.
70. Kocira S., Szparaga A., Kocira A., Czerwińska E., Wójtowicz A., Bronowicka-Mielniczuk U., et al. Modeling Biometric Traits, Yield and Nutritional and Antioxidant Properties of Seeds of Three Soybean Cultivars Through the Application of Biostimulant Containing Seaweed and Amino Acids. *Front. Plant Sci. Sec. Plant Nutrition*. 2018. pmid:29636764
71. Kocira, S.; Szparaga, A.; Hara, P.; Treder, K.; Findura, P.; Bartoš, P.; Filip, M. Biochemical and Economical Effect of Application Biostimulants Containing Seaweed Extracts and Amino Acids as an Element of Agroecological Management of Bean Cultivation. *Sci. Rep.* 2020, 10, 17759. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74959-0>
72. Kokare, A., Legzdina, L., Beinarovica, I. et al. Performance of spring barley (*Hordeum vulgare*) varieties under organic and conventional conditions. *Euphytica*. 2014, 197, 279–293. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1066-8>
73. Konopka, I.; Tańska, M.; Faron, A.; Stępień, A.; Wojtkowiak, K. Comparison of the Phenolic Compounds, Carotenoids and Tocochromanols Content in Wheat Grain under organic and Mineral Fertilization Regimes. *Molecules* 2012, 17, 12341–12356. <https://doi.org/10.3390/molecules171012341>
74. Kozłowska K., Szwed Ł., Zambold-Guła A., Liszewski M., Błażewski J. Próba prognozowania wielkości plonu i jakości ziarna jęczmienia browarnego metodami SPAD i Bishopa. [w:] Jakość i prozdrowotne cechy żywności. Pod red. Wojtanowicz M., Kawa-Rygielska J. Wrocław 2010.
75. Kuklik, M.; Baryła, R.; Czarnecki, Z.; Bochniak, A. Warunki hydrotermiczne w centralnej części rejonu kanału Wieprz-Krzna w 50-leciu (1966–2015). *Ann. UMCS Sect. E Agric.* 2016, LXXI, 1–12.
76. Lakew, B.; Eglinton, J.; Henry, R.J.; Baum, M.; Grando, S.; Ceccarelli, S. The potential contribution of wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) germplasm to drought tolerance of cultivated barley (*H. vulgare* ssp. *vulgare*). *Field Crops Res.* 2011, 120, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.09.011>
77. Lebudda M., Muszyńska E., Gietler M., Różańska E., Rybarczyk-Płońska A., Fidler J., et al. Efficient antioxidant defence systems of spring barley in response to stress induced jointly by the cyst nematode parasitism and cadmium exposure. *Plant Soil*. 2020 456, 189–206. pmid:32952222
78. Li, W.; Shan, F.; Sun, S.; Corke, H.; Beta, T. Free Radical Scavenging Properties and Phenolic Content of Chinese Black-Grained Wheat. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 8533–8536. <https://doi.org/10.1021/jf051634y>
79. Linnewiel-Hermoni, K.; Paran, E.; Wolak, T. Carotenoid Supplements and Consumption: Implications for Healthy Aging. In *Molecular Basis of Nutrition and Aging: A Volume in the Molecular Nutrition Series*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 473–489. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801816-3.00034-0>
80. Litman, B.J.; Niu, S.L.; Polozova, A.; Mitchell, D.C. The Role of Docosahexaenoic Acid Containing Phospholipids in Modulating G Protein-Coupled Signaling Pathways: Visual Transduction. *J. Mol. Neurosci.* 2001, 16, 237–242. <https://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:237>
81. Liu, K. Comparison of Lipid Content and Fatty Acid Composition and Their Distribution within Seeds of 5 Small Grain Species. *J. Food Sci.* 2011, 76, 334–342. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02038.x>
82. Liu, X.-J.; Qiang, C.; Yuan, Z.-F.; Xia, L.; Wang, X.-L.; Tian, Y.-C.; Cao, W.-X.; Yan, Z. Leaf area index based nitrogen diagnosis in irrigated lowland rice. *J. Integr. Agric.* 2018, 17, 111–121. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61714-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61714-3)
83. Luo, H.; Merope, T.; Zhang, Y.; Zhang, W. Combining gas exchange and chlorophyll a fluorescence measurements to analyze the photosynthetic activity of drip-irrigated cotton under different soil water deficits. *J. Integr. Agric.* 2016, 15, 1256–1266. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61270-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61270-9)
84. Ma Y., Wang P., Zhou T., Chen Z., Gu Z. and Yang R. Role of Ca<sup>2+</sup> in phenolic compound metabolism of barley (*Hordeum vulgare* L.) sprouts under NaCl stress. *J. Sci. Food Agric.* 2019;

- 99:5176–5186. <https://doi-org-1nfhz5so10754.han.pbs.edu.pl/10.1002/jsfa.9764> pmid:31021402
85. Malik, A.H. Governing Grain Protein Concentration and Composition in Wheat and Barley: Use of Genetic and Environmental Factors. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2012.
  86. Masisi, K.; Diehl-Jones, W.L.; Gordon, J.; Chapman, D.; Moghadasian, M.H.; Beta, T. Carotenoids of Aleurone, Germ, and Endosperm Fractions of Barley, Corn and Wheat Differentially Inhibit Oxidative Stress. *J. Agric. Food Chem.* 2015, *63*, 2715–2724. <https://doi.org/10.1021/jf5058606>
  87. Matsumoto S., Mizutani M., Sakata K., Shimizu BI. Molecular cloning and functional analysis of the ortho-hydroxylases of p-coumaroyl coenzyme A/feruloyl coenzyme A involved in formation of umbelliferone and scopoletin in sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Phytochemistry*. 2012; *74*, 49–57. pmid:22169019
  88. Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 2000, *51*, 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
  89. Mińkowski, K. Związki Enolowe Surowców Oleistych—Występowanie oraz Znaczenie Biologiczne—Żywieniowe. *Postępy Nauk. Technol. Przemysłu Rolno-Spożywczego* 2013, *68*, 109–121.
  90. Moregan, J.A.; LeCain, D.R.; Wells, R. Semi-dwarfing genes concentrate photosynthetic machinery and affect leaf gas exchange of wheat. *Crop Sci.* 1990, *30*, 602–608. <https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000030027xa>
  91. Mpai S., Mokganya LM., Raphoko L., Masoko P., Ndhkala AR. Untargeted metabolites and chemometric approach to elucidate the response of growth and yield attributes on different concentrations of an amino acid based biostimulant in two lettuce cultivars. *Scientia Horticulturae*, 2022; 306.
  92. Nyi, N.; Sridokchan, W.; Chai-arree, W.; Srinives, P. Nondestructive measurement of photosynthetic pigments and nitrogen status in *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) by chlorophyll meter. *Phillipp. Agric. Sci.* 2012, *95*, 83–89.
  93. Ostrowska-Kołodziejczak A., Stuper-Szablewska K., Kulik T., Buśko M., Rissmann I., Wiwart M., et al. Concentration of fungal metabolites, phenolic acids and metals in mixtures of cereals grown in organic and conventional farms. *J. Anim. Feed Sci.* 2016; *25*(1):74–81. <https://doi.org/10.22358/jafs/65590/2016>
  94. Oukarroum, A.; El Madidi, S.; Schansker, G.; Strasser, R.J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environ. Exp. Bot.* 2007, *60*, 438–446 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.01.002>
  95. Özberk, F.; Ozberk, I.; Bayhan, M.; Odabaşoğlu, C. Black Barley Marketing Prices and Profitability vs. White from 2005 to 2015 in South-East Anatolia. *Transylv. Rev.* 2015, *XXIV*, 1–10.
  96. Pandino, G.; Mattiolo, E.; Lombardo, S.; Lombardo, G.M.; Mauromicale, G. Organic Cropping System Affects Grain Chemical Composition, Rheological and Agronomic Performance of Durum Wheat. *Agriculture* 2020, *10*, 46. <https://doi.org/10.3390/agriculture10020046>
  97. Panizo-Casado, M.; Déniz-Expósito, P.; Rodríguez-Galdón, B.; Afonso-Morales, D.; Ríos-Mesa, D.; Díaz-Romero, C.; Rodríguez-Rodríguez, E.M. The chemical composition of barley grain (*Hordeum vulgare* L.) landraces from the Canary Islands. *J. Food Sci.* 2020, *85*, 1725–1734. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15144>
  98. Pascoalino, L.A.; Reis, F.S.; Barros, L.; Rodrigues, M.Â.; Correia, C.M.; Vieira, A.L.; Ferreira, I.C.F.R.; Barreira, J.C.M. Effect of Plant Biostimulants on Nutritional and Chemical Profiles of Almond and Hazelnut. *Appl. Sci.* 2021, *11*, 7778. <https://doi.org/10.3390/app11177778>
  99. Pecio, A.; Wach, D. Grain yield and yield components of spring barley genotypes as the indicators of their tolerance to temporal drought stress. *Pol. J. Agron.* 2015, *21*, 19–27.



100. Pereira-Caro, G.; Cros, G.; Yokota, T.; Crozier, A. Phytochemical Profiles of Black, Red, Brown, and White Rice from the Camargue Region of France. *J. Agric. Food Chem.* 2013, *61*, 7976–7989. <https://doi.org/10.1021/jf401937b>
101. Petrova, I.; Ivanova, S.; Stoyanova, S.; Mincheva, R.; Pavlova, M. Influence of Biostimulants and Humic Extracts Treatment on the Fatty Acid Profile of the Spring Oilseed Rape Variety. *J. Agric. Sci. Technol.* 2023, *15*, 52–59. <https://doi.org/10.15547/ast.2023.01.006>
102. Pietta PG. Flavonoids and Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000; *63*, 1035–1042. pmid:10924197
103. Posmyk, M.M.; Szafrńska, K. Biostimulators: A New Trend towards Solving an Old Problem. *Front. Plant Sci.* 2016, *7*, 748. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00748>
104. Przybylska-Balcerek A., Szablewski T., Cegielska-Radziejewska R., Góral T., Kurasiak-Popowska D., Stuper-Szablewska K. Assessment of antimicrobial Properties of Phenolic Acid Extracts from Grain Infected with Fungi from the Genus *Fusarium*. *Molecules.* 2022; *27*(5), 1741; pmid:35268842
105. Qian, J.; Jiang, S.; Su, W.; Gao, P. Characteristics of Oil from Hulless Barley (*Hordeum vulgare* L.) Bran from Tibet. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2009, *86*, 1175. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1463-7>
106. Relina, L.I.; Suprun, O.H.; Boguslavskiy, R.L.; Didenko, S.Y.; Vecherska, L.A.; Golik, O.V. Fatty Acid Composition of Oil from Grain of Some Tetraploid Wheat Species. *Biotechnol. Acta* 2020, *13*, 56–64. <https://doi.org/10.15407/biotech13.02.056>
107. Roostaeia, M.; Mohammadi, S.A.; Amri, A.; Majidi, E.; Nachit, M.; Haghparast, R. Chlorophyll Fluorescence Parameters and Drought Tolerance in a Mapping Population of Winter Bread Wheat in the Highlands of Iran. *Russ. J. Plant Physiol.* 2011, *58*, 351–358. <https://doi.org/10.1134/S102144371102018X>
108. Rouphael, Y.; Formisano, L.; Ciriello, M.; Cardarelli, M.; Luziatelli, F.; Ruzzi, M.; Ficca, A.G.; Bonini, P.; Colla, G. Natural Biostimulants as Upscale Substitutes to Synthetic Hormones for Boosting Tomato Yield and Fruits Quality. *Italus Hortus* 2021, *28*, 88–99. <https://doi.org/10.26353/j.itahort/2021.1.8899>
109. Rybka K., Nita Z. Nowoczesne fenotypy zbóż do uprawy na obszarach zagrożonych suszą. *Biul. IHAR*, 2014 *273*: 55 — 72.
110. Saini, P.; Kumar, N.; Kumar, S.; Mwaurah, P.W.; Panghal, A.; Attkan, A.K.; Singh, V.K.; Garg, M.K.; Singh, V. Bioactive Compounds, Nutritional Benefits and Food Applications of Colored Wheat: A Comprehensive Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2021, *61*, 3197–3210. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793727>
111. Sakellariou, M.; Mylona, P.V. New Uses for Traditional Crops: The Case of Barley Biofortification. *Agronomy* 2020, *10*, 1964. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121964>
112. Sánchez-Reinoso, A.D.; Ligarreto-Moreno, G.A.; Restrepo-Díaz, H. Chlorophyll  $\alpha$  Fluorescence Parameters as an Indicator to Identify Drought Susceptibility in Common Bush Bean. *Agronomy* 2019, *9*, 526. <https://doi.org/10.3390/agronomy9090526>
113. Selyaninov, G.T. On the agricultural estimation of climate. *Tr. Po Sel'skokhozyaistvennoi Meteorol.* 1928, *20*, 165–177.
114. Shangguan Z.P., Shao M.G., Dyckmans J. Effects of nitrogen nutrition and water deficit on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in winter wheat. *J. Plant Phys.* 2000, *156*: 46–51.
115. Shen, Y.; Zhang, H.; Cheng, L.; Wang, L.; Qian, H.; Qi, X. In Vitro and In Vivo Antioxidant Activity of Polyphenols Extracted from Black Highland Barley. *Food Chem.* 2016, *194*, 1003–1012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.083>
116. Shoeva OY., Mursalimov S., Gracheva NV., Glagoleva AY., Börner A., Khlestkina EK. Melanin formation in barley grain occurs within plastids of pericarp and husk cells. *Scientific Reports.* 2020; *10*(179). pmid:31932698
117. Shoeva, O.Y.; Mock, H.-P.; Kukoeva, T.V.; Börner, A.; Khlestkina, E.K. Regulation of the Flavonoid Biosynthesis Pathway Genes in Purple and Black Grains of *Hordeum vulgare*. *PLoS ONE* 2016, *11*, e0163782. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163782>

118. Siebenhandl, S.; Grausgruber, H.; Pellegrini, N.; Del Rio, D.; Fogliano, V.; Pernice, R.; Berghofer, E. Phytochemical Profile of Main Antioxidants in Different Fractions of Purple and Blue Wheat, and Black Barley. *J. Agric. Food Chem.* 2007, *55*, 8541–8547. <https://doi.org/10.1021/jf072021j>
119. Simpson, P.G.; Siddique, K.H.M. Soil Type Influences Relative Yield of Barley and Wheat in a Mediterranean-type Environment. *J. Agron. Crop Sci.* 1994, *172*, 147–160. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.1994.tb00161.x>
120. Singh, H.; Kumar, D.; Soni, V. Performance of chlorophyll a fuorescence parameters in Lemna minor under heavy metal stress induced by various concentration of copper. *Sci. Rep.* 2022, *12*, 10620. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14985-2>
121. Starck Z. Mechanizmy integracji procesów fotosyntezy i dystrybucji biomasy w niekorzystnych warunkach środowiska. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 2002, *481*: 111-123
122. Stracke, B.A.; Eitel, J.; Watzl, B.; Mäder, P.; Rüfer, C.E. Influence of the Production Method on Phytochemical Concentrations in Whole Wheat (*Triticum aestivum* L.): A Comparative Study. *J. Sci. Food Agric.* 2009, *57*, 10116–10121. <https://doi.org/10.1021/jf901267z>
123. Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, in: Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation. Taylor and Francis 2000, London and New York. M. Yunus, U. Pathre and P. Mohanty (Eds.): 445-483.
124. Strygina, K.V.; Börner, A.; Khlestkina, E.K. Identification and Characterization of Regulatory Network Components for Anthocyanin Synthesis in Barley Aleurone. *BMC Plant Biol.* 2017, *17*, 184. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1122-3>
125. Stuper-Szablewska K., Kurasiak-Popowska D., Nawracała J., Perkowski J. Quantitative profile of phenolic acids and antioxidant activity of wheat grain exposed to stress. *Eur. Food Res. Technol.* 2019; *245*, 1595–1603. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03262-8>
126. Suriano S., Iannucci A., Codianni P., Fares C., Russo M., Pecchioni N., et al. Phenolic acids profile, nutritional and phytochemical compounds, antioxidant properties in colored barley grown in southern Italy. *Food Res. Int.* 2018; *113*, 221–233. pmid:30195516
127. Swapnil, P.; Meena, M.; Singh, S.K.; Dhuldhaj, U.P.; Harish; Marwal, A. Vital Roles of Carotenoids in Plants and Humans to Deteriorate Stress with its Structure, Biosynthesis, Metabolic Engineering and Functional Aspects. *Curr. Plant Biol.* 2021, *26*, 100203. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100203>
128. Szczepanek, M.; Lemańczyk, G.; Nowak, R.; Graczyk, R. Response of Indian Dwarf Wheat and Persian Wheat to Sowing Density and Hydrothermal Conditions of the Growing Seasons. *Agriculture* 2022, *12*, 205. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020205>
129. Szparaga, A.; Kocira, S.; Findura, P.; Kapusta, I.; Zagała, G.; Świeca, M. Uncovering the Multi-Level Response of *Glycine max* L. to the Application of Allelopathic Biostimulant from *Levisticum officinale* Koch. *Sci. Rep.* 2021, *11*, 15360. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94774-5>
130. Szpunar-Krok, E.; Depciuch, J.; Drygaś, B.; Jańczak-Pieniążek, M.; Mazurek, K.; Pawlak, R. The Influence of Biostimulants Used in Sustainable Agriculture for Antifungal Protection on the Chemical Composition of Winter Wheat Grain. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, *19*, 12998. <https://doi.org/10.3390/ijerph192012998>
131. Tanumihardjo, S.A. Carotenoids: Health Effects. In *Encyclopedia of Human Nutrition*, 3rd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp. 292–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00045-3>
132. Tian, W.; Jaenisch, B.; Gui, Y.; Hu, R.; Chen, G.; Lollato, R.P.; Li, Y. Effect of Environment and Field Management Strategies on Phenolic Acid Profiles of Hard Red Winter Wheat Genotypes. *J. Sci. Food Agric.* 2022, *102*, 2424–2431. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11581>
133. Tousi, P.; Tajbakhsh, M.; Esfahani, M. Effect of Spray Application of Nano-Fe Chelate, Amino Acid Compounds and Magnetic Water on Protein Content and Fatty Acids Composition

- of Oil of Soybean (*Glycine max*) in Different Harvest Time. *Iran. J. Crop Sci.* 2014, *16*, 125–136.
134. Ukozehasi, C.; Ober, E.S.; Griffiths, H. The Other Mechanisms by Which the Rht Genes Improve the Harvest Index of Wheat. *Plants* 2022, *11*, 2837. <https://doi.org/10.3390/plants11212837>
  135. Ullah, S.; Khan, M.N.; Lodhi, S.S.; Ahmad, I.; Tayyab, M.; Mehmood, T.; Din, I.U.; Khan, M.; Sohali, Q.; Akram, M. Targeted metabolomics reveals fatty acid abundance adjustments as playing a crucial role in drought-stress response and post-drought recovery in wheat. *Front. Genet. Sec. Plant Genom.* 2022, *13*, 972696. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.972696>
  136. Watanabe, N.; Naruse, J.; Austin, B.; Morgan, C.L. Variation in thylakoid proteins and photosynthesis in Syrian landraces of barley. *Euphytica* 1995, *82*, 213–220. <https://doi.org/10.1007/BF00029563>
  137. Wu, K.; Wang, S.; Song, W.; Zhang, J.; Wang, Y.; Liu, Q.; Yu, J.; Ye, Y.; Li, S.; Chen, J.; et al. Enhanced sustainable green revolution yield via nitrogen-responsive chromatin modulation in rice. *Science* 2020, *367*, eaaz2046. <https://doi.org/10.1126/science.aaz2046>
  138. Xu, F.; Dang, B.; Yang, X.; Wu, K.; Chi, D. Evaluation of Nutritional Quality of Different Hullless Barleys. *J. Triticeae Crops* 2016, *36*, 1249–1257. <https://doi.org/10.7606/j.issn.1009-1041.2016.09.17>
  139. Yang, X.J.; Dang, B.; Fan, M.T. Free and bound phenolic compound content and antioxidant activity of different cultivated blue highland barley varieties from the Qinghai-Tibet Plateau. *Molecules* 2018, *23*, 879. <https://doi.org/10.3390/molecules23040879>
  140. Youssefian, S.; Kirby, E.J.M.; Gale, M.D. Pleiotropic effects of the GA insensitive Rht dwarfing genes in wheat. II. Effects on leaf, stem, ear, and floret growth. *Field Crops Res.* 1992, *28*, 191–210. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(92\)90040-G](https://doi.org/10.1016/0378-4290(92)90040-G)
  141. Zalewski D., Liszewski M., Kozłowska K. Plonowanie jęczmienia jarego przy zróżnicowanym poziomie agrotechniki na glebie kompleksu pszennego dobrego. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu: Rolnictwo, 2016, Issue 599, p63
  142. Zhang, R.; Yang, P.; Liu, S.; Wang, C.; Liu, J. Evaluation of the Methods for Estimating Leaf Chlorophyll Content with SPAD Chlorophyll Meters. *Remote Sens.* 2022, *14*, 5144. <https://doi.org/10.3390/rs14205144>
  143. Zhou J., Diao X., Wang T., Chen G., Lin Q., Yang X., et al. Phylogenetic diversity and antioxidant activities of culturable fungal endophytes associated with the mangrove species *Rhizophora stylosa* and *R. mucronata* in the South China Sea. *PloS One.* 2018; *13*(6), pmid:29897911
  144. Zhu Y., Li T., Fu X., Abbasi AM., Zheng B., Liu RH. Phenolics content, antioxidant and antiproliferative activities of dehulled highland barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Functional Foods.* 2015; *19*, 439–450.
  145. Zreckova M., Capouchova I., Eliášová M., Paznocht L., Pazderů K., Dvořák P., et al. The effect of genotype, weather conditions and cropping system on antioxidant activity and content of selected antioxidant compounds in wheat with coloured grain. *Plant Soil Environ.* 2018; *64*, 530–538. <https://doi.org/10.17221/430/2018-PSE>.

## STRESZCZENIE

**Biologiczne i agrotechniczne uwarunkowania plonowania oraz wartości użytkowej ziarna alternatywnych genotypów jęczmienia *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Korn i *Hordeum vulgare* L. var. *rimpau* Wittm**

**mgr inż. Rafał Nowak**

**Słowa kluczowe:** biologia plonowania, plon ziarna, genotypy jęczmienia, związki bioaktywne, systemy gospodarowania, aplikacja biostymulatorów

Właściwości dietetyczne i prozdrowotne spowodowały wzrost znaczenia konsumpcyjnego ziarna jęczmienia. W związku z tym poszukuje się genotypów i metod uprawy gwarantujących wysoką wartość użytkową ziarna. Alternatywne genotypy jęczmienia tworzące ziarniaki o ciemnym zabarwieniu, z uwagi na zwiększoną zawartość związków bioaktywnych mogą być cennym surowcem do produkcji żywności funkcjonalnej. Przywrócenie ich do uprawy powinno być jednak poprzedzone identyfikacją cech determinujących produktywność oraz wartość użytkową ziarna, rozumianą jako przydatność do produkcji żywności prozdrowotnej oraz nutraceutyków. Przeprowadzono dwa ściśle dwuletnie doświadczenia polowe, w warunkach ekologicznego i konwencjonalnego systemu gospodarowania. Czynnikiem doświadczalnym były trzy zróżnicowane genotypy jęczmienia oraz aplikacja nalistna biostymulatora aminokwasowego w trakcie wegetacji. Celem pracy była identyfikacja parametrów biometrycznych i fizjologicznych decydujących o plonowaniu alternatywnych genotypów jęczmienia *Hordeum vulgare* var. *nigricans* i *H. v. var. rimpau* oraz porównanie ich z odmianą współczesną jęczmienia zwyczajnego (*H. vulgare*), w zróżnicowanych warunkach hydrotermicznych dwóch sezonów wegetacyjnych 2021 i 2022. Ziarno zebrane z poletek doświadczalnych poddano laboratoryjnej analizie składu chemicznego w celu oceny zawartości związków fenolowych, barwników roślinnych i kwasów tłuszczowych, a także aktywności przeciwutleniającej ziarna tych genotypów. Badania wykazały, że poszczególne genotypy różnią się od siebie pod względem parametrów fizjologicznych i biometrycznych w ocenianych etapach rozwoju i w zróżnicowany sposób reagują na stres abiotyczny. *H. v. rimpau* wykazywał większe wartości parametrów wskazujących na efektywność funkcjonowania fotosyntezy ( $F_v/F_M$ ,  $F_v/F_0$  i  $PI_{ABS}$ ) w fazie siewki podczas suszy, a *H. v. nigricans* wykazywał w takich warunkach większe wartości  $F_v/F_M$  i  $F_v/F_0$  w fazie liścia

flagowego. Ponadto *H. v. var. rimpai* wyróżniał się wysoką biomasą pędów ( $726 \text{ g m}^{-2}$ ) i plonem słomy ( $5,04 \text{ t ha}^{-1}$ ), a *H. v. var. nigricans* wykazywał dużą skłonność do tworzenia kłosów płonnych ( $103 \text{ szt. m}^{-2}$  w suchym roku 2022). Alternatywne genotypy wytworzyły, w korzystnym pod względem warunków hydrotermicznych roku istotnie większą powierzchnię asymilacyjną od odmiany 'Soldo', ale charakteryzowały się mniejszymi wartościami wskaźnika SPAD i  $PI_{ABS}$ , mierzonymi na liściu podflagowym. *H. v. rimpai* i *H. v. nigricans*, zarówno w ekologicznym jak i konwencjonalnym systemie plonowały na istotnie niższym poziomie niż odmiana współczesna, szczególnie w roku o optymalnych opadach. W roku suchym różnice pomiędzy *H. v. rimpai*, a odmianą 'Soldo' nie były istotne. Wyższy potencjał produkcyjny odmiany współczesnej był związany z większą masą tysiąca ziaren (MTZ), a także większą w porównaniu z *H. v. var. nigricans* liczbą ziaren w kłosie i płodnych pędów generatywnych na  $1 \text{ m}^2$ . Ciemno zabarwione ziarno genotypów alternatywnych zawierało istotnie więcej kwasów fenolowych i flawonoidów oraz więcej nienasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu z żółtym ziarnem odmiany współczesnej. Zastosowanie biostymulatora istotnie zwiększyło stężenie związków fenolowych w ziarnach, zwłaszcza genotypów alternatywnych, ale nie miało wpływu na wielkość plonu. Wyniki wskazują również na większą aktywność przeciwutleniającą i większe stężenie fitomelaniny w ziarnie genotypów alternatywnych. Aktywność przeciwutleniająca była skorelowana z zawartością kwasu syringinowego, naryngeniny, kwercetyny, luteoliny i fitomelaniny. Uprawa ekologiczna i nalistna aplikacja biostymulatora aminokwasowego poprawiły właściwości użytkowe ziarna jęczmienia, w szczególności genotypów alternatywnych. Dalsze badania powinny być ukierunkowane na szczegółowe rozpoznanie reakcji alternatywnych genotypów jęczmienia na stresy abiotyczne. Celowe jest również określenie sposobów zwiększenia liczby ziaren w kłosie i masy 1000 ziaren genotypów alternatywnych w celu zwiększenia ich potencjału plonotwórczego.

## ABSTRACT

**Biological and agrotechnical determinants of productivity and utility value of grain of alternative barley genotypes *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Korn i *Hordeum vulgare* var. *rimpau* Wittm**

**mgr inż. Rafał Nowak**

**Key words:** Yield biology, grains yield, barley genotypes, bioactive compounds, farming systems, aminoacids biostimulant

The dietary and health-promoting properties of barley grain have led to an increase in its importance for consumption. Consequently, genotypes and cultivation methods are being sought to guarantee a high utility value of the grain. Alternative barley genotypes that form black-coloured grains, due to their increased content of bioactive compounds, can be a valuable raw material for the production of functional foods. However, their reintroduction into cultivation should be preceded by the identification of traits determining the productivity and use value of the grain, understood as suitability for the production of health-promoting foods and nutraceuticals. Two-year field experiments were conducted, under organic and conventional farming system conditions. The experimental factors comprised three different barley genotypes and the foliar application of an amino acid biostimulant during vegetation period. The aim of this study was to identify the biometric and physiological parameters determining the yield of alternative barley genotypes *Hordeum vulgare* var. *nigricans* and *H. v. var. rimpau* and to compare them with a modern variety of barley (*H. vulgare*), under varying hydrothermal conditions of the two growing seasons of 2021 and 2022. The grain collected from the experimental plots was subjected to laboratory analysis of chemical composition in order to assess the content of phenolic compounds, plant pigments and fatty acids, as well as the antioxidant activity of the grain of these genotypes. The study demonstrated that the various genotypes differed in their physiological and biometric parameters at the developmental stages assessed, and exhibited divergent responses to abiotic stress. *H. v. rimpau* showed higher values for parameters indicative of the efficiency of photosynthetic function ( $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$  and  $PI_{ABS}$ ) at the seedling stage during drought, while *H. v. nigricans* demonstrated higher  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$  values at the flag leaf stage under such conditions. Furthermore, *H. v. var. rimpau* was distinguished by its high shoot biomass ( $726 \text{ g m}^{-2}$ ) and straw yield ( $5.04 \text{ t ha}^{-1}$ ), while *H. v. var. nigricans* exhibited a high proclivity for the formation of waste ears ( $103 \text{ pcs m}^{-2}$  in the

dry year 2022). In a hydrothermally favorable year, alternative genotypes produced a significantly higher assimilative area than 'Soldo', but were characterized by lower SPAD and  $PI_{ABS}$  index values measured on the subflag leaf. *H. v. rimpai* and *H. v. nigricans*, cultivated in organic and conventional systems, yielded at a significantly lower level than the modern variety, particularly in the year with optimal rainfall. In the dry year, the differences between *H. v. rimpai* and the cultivar 'Soldo' were not significant. The higher production potential of the modern variety was associated with a higher thousand-grain weight (TGW), as well as a greater number of grains per spike, and fertile generative shoots per 1 m<sup>2</sup> compared to *H. v. var. nigricans*. The black-coloured grain of the alternative genotypes exhibited significantly higher levels of phenolic acids and flavonoids and a greater proportion of unsaturated fatty acids compared to the yellow grain of the modern variety. The application of the biostimulant resulted in a notable increase in the concentration of phenolic compounds in the grains, with the greatest impact observed in alternative genotypes. However, no discernible effect of the treatment on yield was observed. Furthermore, the outcomes revealed elevated antioxidant efficacy and a higher concentration of phytomelanin in the grain of the alternative genotypes. The antioxidant activity was found to be correlated with the content of syringic acid, naringenin, quercetin, luteolin and phytomelanin. Organic cultivation and foliar application of an amino acid biostimulant has been demonstrated to enhance the functional properties of barley grain, particularly in alternative genotypes. Further research should be directed towards the detailed identification of the responses of alternative barley genotypes to abiotic stresses. It is similarly recommended to identify strategies for enhancing the number of grains per ear and the thousand-grain weight of alternative genotypes in order to increase their yield potential.

## Article

# Physiological and Agronomic Characteristics of Alternative Black Barley Genotypes (*Hordeum vulgare* var. *nigricans* and *H. v.* var. *rimpau*) under Different Hydrothermal Conditions of the Growing Seasons

Małgorzata Szczepanek \*, Rafał Nowak and Karolina Błaszczyk

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture and Biotechnology, Bydgoszcz University of Science and Technology, Prof. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, Poland; rafnow003@pbs.edu.pl (R.N.); karbla005@pbs.edu.pl (K.B.)

\* Correspondence: malgorzata.szczepanek@pbs.edu.pl; Tel.: +48-602502165

**Abstract:** Black-seeded barley can be a valuable raw material for functional food. However, its restoration to cropping should be preceded by the identification of the characteristics determining productivity. The field study was conducted to identify specific parameters of the black-seeded barley genotypes (*Hordeum vulgare* var. *nigricans* and *H. v.* var. *rimpau*) and compare them with common barley (*H. vulgare*) under the different hydrothermal conditions of the two growing seasons of 2021 and 2022. Our research has shown that each genotype has a set of specific characteristics that best describe it at a given developmental stage. *H. v. rimpau* was well characterized by chlorophyll fluorescence parameters such as  $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ , and  $PI_{ABS}$  at the seedling stage and *H. v. nigricans* by  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$  at the flag leaf stage. Moreover, *H. v.* var. *rimpau* was distinguished by a high biomass of shoot ( $726 \text{ g m}^{-2}$ ) and straw yield ( $5.04 \text{ t ha}^{-1}$ ) but *H. v.* var. *nigricans* by a high number of sterile generative tillers ( $103 \text{ m}^{-2}$  in the dry year 2022). Further research should focus on the response of black-seeded barley genotypes to abiotic stresses, while in agronomic practice, efforts should be made to increase the number of grains per ear and 1000-grain weight.

**Keywords:** chlorophyll fluorescence; black barley; PCA; LAI; SPAD; grain yield; yield components



**Citation:** Szczepanek, M.; Nowak, R.; Błaszczyk, K. Physiological and Agronomic Characteristics of Alternative Black Barley Genotypes (*Hordeum vulgare* var. *nigricans* and *H. v.* var. *rimpau*) under Different Hydrothermal Conditions of the Growing Seasons. *Agriculture* **2023**, *13*, 2033. <https://doi.org/10.3390/agriculture13102033>

Academic Editor: Peng Zhang

Received: 11 September 2023

Revised: 18 October 2023

Accepted: 19 October 2023

Published: 22 October 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Barley, like emmer or einkorn wheat, is one of the earliest domesticated species (12,000 BC). Its native place of origin is the Fertile Crescent region, spanning southwestern Iran, through the Zagros and Taurus Mountains in Iran, Iraq, and Turkey to central Anatolia, northern Syria, and Palestine [1,2]. The genus barley (*Hordeum* spp.) includes over 30 species found in temperate, tropical, and equatorial climate zones. Currently, it is one of the most important field crops. The global sown area of barley in 2021 was 48.9 million hectares, which gives it fifth place after wheat, rice, corn, and soybeans [3]. The most important species of the genus *Hordeum* is common barley (*Hordeum vulgare*). This species occurs in both winter and spring forms. Its genetic diversity is manifested, among others, in rowing (two-, four-, or six-row spike) or hulling (husked or naked grain) [4]. Among the genotypes of barley, there are also forms with awns transformed into hoods (hooded barley). Barley grain can be yellow, blue, purple, and even black [5]. The color of grains results from plant pigments accumulated in the aleurone layer of the grain [6]. The black color of grain is due to the presence of several chemical compounds, including phytomelanins and phenolic compounds [7]. The black barley group includes the species *H. vulgare* var. *nigricans*, also known as *H. distichon* var. *nigricans* (Global Biodiversity Information Facility), which can be found in several regions of the world as a niche local variety, especially in Iraq, Syria, and Turkey [8]. Hooded barley *H. vulgare* var. *rimpau* may also have black-colored grains.



Barley grain is used for the production of fodder and alcoholic beverages [9]. However, in Asia (mainly Tibet, China), barley is one of the basic food raw materials [10]. The beneficial dietary and health-promoting qualities of barley have influenced the increasing consumption importance of this species in recent years. The high dietary quality of barley grain results, among others, from the content of bioactive substances with antioxidant properties [11,12]. Previous research indicates that some primary barley genotypes (especially those with dark-colored grains) have particularly high antioxidant potential [13–15]. These genotypes are characterized by a higher antioxidant activity and higher concentration of phenolic acids, flavonoids, phytomelanin, lutein, and anthocyanidins than common barley and can be valuable raw materials for the production of functional food [16,17]. The condition for the implementation of these valuable genotypes for cultivation and further consumption use is the recognition of characteristics determining growth, development, and yield in various agroclimatic conditions.

Proper growth and development of plants can be inhibited by biotic and abiotic stresses. Ongoing monitoring of the physiological state of plants and diagnosis of the impact of stresses on plant growth is possible thanks to the use of chlorophyll fluorescence. This phenomenon informs, among other things, the physiological state of plants under abiotic stress conditions (high or low temperature, water shortages or excesses, etc.) at an early stage of their occurrence. The chlorophyll molecule is fluorescent, making it possible to determine the photochemical activity of the plant by detecting photon scattering, which is closely related to changes in electron transport on chloroplast membranes [18]. This disturbance causes a decrease in the photosynthesis activity of the whole plant [19]. By measuring chlorophyll fluorescence, disturbances in the photosynthetic activity of the plant can be detected without disturbing the tissues of the tested plants [18]. The specific features of the parameters describing the fluorescence of chlorophyll, including the most widely used indices  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$ , have made them more and more popular in the diagnosis of the condition of agricultural crops [20]. The  $F_V/F_M$  ratio (a parameter that represents the conversion efficiency of primary light energy in the center of PS II) and  $F_V/F_0$  ratio (which represents the photochemical and non-photochemical use of light energy in the reaction center) are the important parameters used as stress indicators in a large number of photosynthetic studies. However, because they depend on the initial ( $F_0$ ) and maximum ( $F_M$ ) levels of fluorescence, they may not be sensitive enough to detect variation between samples [21]. In many studies, the performance index ( $PI_{ABS}$ ) is also presented as a relevant parameter to measure photosynthesis efficiency. The PI is an integrative parameter calculated based on primary photochemistry, the density of the active reaction center per chlorophyll, and the efficiency of electron. As a result, if any of these components is affected by stress, the effect will be visible in the PI [19,21]. For many different plants, the parameters  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$  as measured under non-stress conditions are almost constant and amount to 0.80–0.83 and 4–6, respectively [22]. However, PI does not have a specific value, but it is assumed that for plants subjected to stress, the values of this parameter are much lower than for plants free from abiotic stresses [23,24].

The amount of biomass produced during vegetation and the useful yield of plants also depend on proper nutrition, which can be indirectly assessed by measuring leaf chlorophyll content by SPAD meters using the emission of light of various wavelengths through the plant leaf [25]. The final SPAD value is determined on the basis of the difference between the absorption of red and infrared light waves. The higher the value of this parameter, the more chlorophyll molecules in the plant leaf [26]. Another parameter related to the size of the yield is the leaf area index (LAI), which tells about the leaf area that captures the solar energy that is necessary for plant photosynthesis [27]. It is well known, however, that the final yield of cereal grains is directly influenced by the size and interdependence of structural yielding components such as generative fertile tillers per  $m^2$ , number of grain per spike, and 1000-grain weight [28].

The aim of the research was to identify the physiological and agronomic parameters of the alternative black barley genotypes (*H. v. var. nigricans* and *H. v. var. rimpau*) and

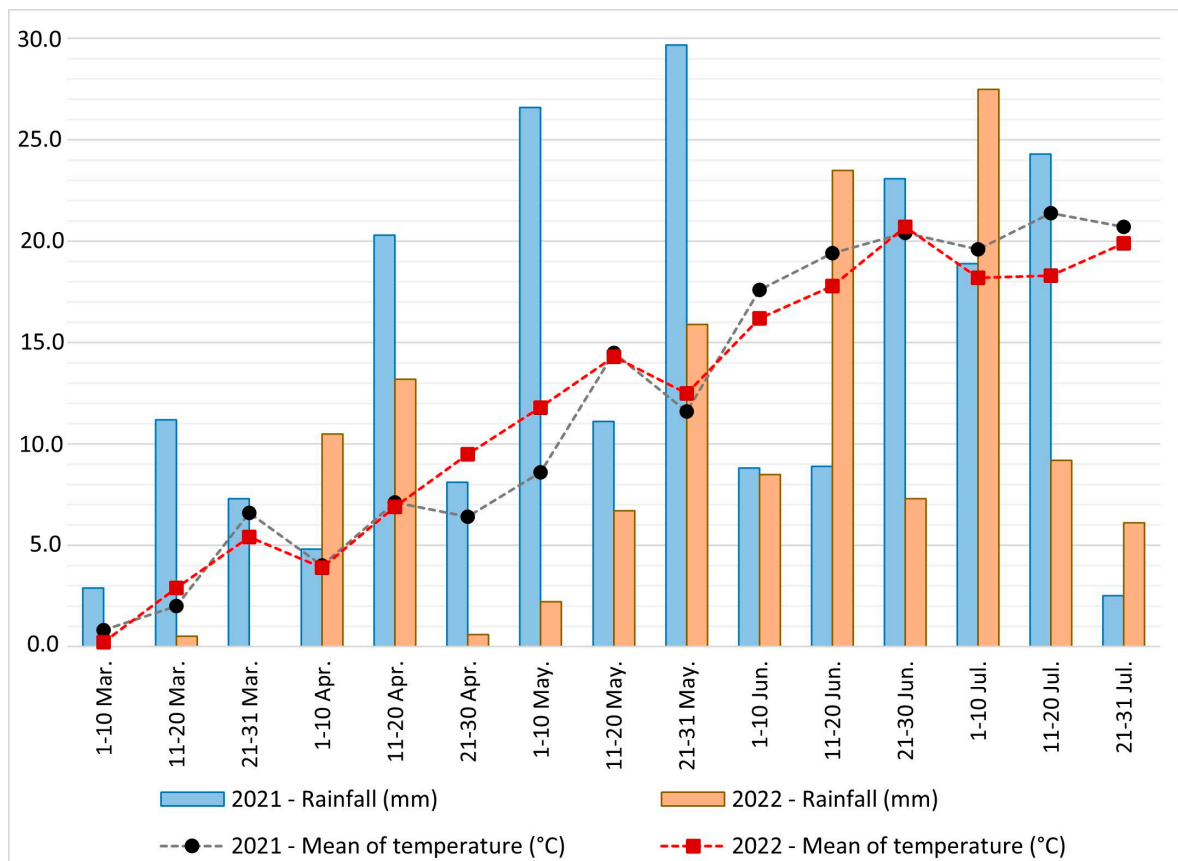
compare them with common barley (*H. vulgare*) under the different hydrothermal conditions of the growing seasons. The results of our study can be used as a theoretical basis for the growing management of black-seeded barley and indicate further research directions.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Site Description

Field experiments were conducted in Minikowo, Kuyavian-Pomeranian Voivodeship, central Poland (53°10'2" N 17°44'22" E), over two growing seasons (2021 and 2022). The soil at the experimental site is characterized by an acidic soil pH of 4.7 and has a content of 7.1 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 100 g<sup>-1</sup> soil, 17.1 mg K<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup> soil, and 4.5 mg MgO 100 g<sup>-1</sup> soil.

Weather conditions during the barley-growing period varied in the years of the study. It was noticeably cooler in the period from 21 April to 10 May and warmer in the periods from 1 June to 20 and from 1 July to 20 in 2021 compared to 2022 (Figure 1). In the 2nd and 3rd ten-day periods of April 2021, strong drops in temperature at the ground were observed, reaching −7.0 °C during emergence (Supplementary Materials, Table S2). In 2022, in the same period, the minimum air temperature near the ground oscillated between −2.1 and 6.2 °C.



**Figure 1.** Hydrothermal conditions (air temperature and rainfall) during spring barley-growing seasons, 2021 and 2022.

The total amount of precipitation in the growing season (March–July) in 2021 amounted to 208.5 mm, while in 2022, it was only 131.7 mm. In March 2021, the total precipitation amounted to 21.4 mm, while in the same month of 2022, it was only 0.5 mm. The period from 21 April to 31 May 2022 was also characterized by a clear rainfall deficit in which the total precipitation amounted to only 25.4 mm. In the same period of 2021, the precipitation was almost three times higher and amounted to 75.5 mm. Before the harvest of barley (21–31 June), rainfall in both years did not exceed 6 mm.

The hydrothermal conditions of the growth season (March–July) were developed on the basis of precipitation sums and air temperature in the years 2021–2022. The sum of average daily air temperatures and the sum of precipitation for individual decades were calculated, which were used to calculate the Sielianinov coefficient ( $k$ ) [29] for individual years (Supplementary Materials, Table S1) according to the following formula:

$$k = \frac{P \cdot 10}{\Sigma t}$$

where:

$P$ —total precipitation in mm for a decade;

$\Sigma t$ —sum of average daily air temperatures  $> 0$  °C for the ten-day period.

The hydrothermal coefficient (Sielianinov coefficient) determines the relationship between precipitation and evaporation and characterizes the moisture conditions for plant growth. Based on the value of the coefficient, the periods were classified in four groups after Kuklik et al. [30]:

- Extremely dry or very dry— $k \leq 0.7$ ;
- Dry or quite dry— $0.7 < k \leq 1.3$ ;
- Optimal or quite moist— $1.3 < k \leq 2.0$ ;
- Humid, very humid, or extremely humid— $k > 2.0$ .

## 2.2. Subject of Research and Agronomic Practice

Two primary barley (*H. vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn (*H. v. nigricans*) and *H. vulgare* L. var. *rimpau* Wittm (*H. v. rimpau*)) and one common barley (*H. vulgare* var. *vulgare* (*H. vulgare*) cultivar ‘Soldo’) were studied. The first two genotypes are two-rows, spring, and are characterized by dark pigmentation of husk, fruit, and seed coat of grain. The common barley ‘Soldo’, being a modern, spring, two-row variety with yellow grains, served as a comparative genotype for two primary forms. *H. v. rimpau* is also distinguished by reduced awns, i.e., the so-called hoods (hooded barley), while *H. nigricans* and *H. vulgare* have spikes with fully developed awns.

The experiment was conducted in a completed randomized block design in three replications in plot areas of 24 m<sup>2</sup>. Barley was sown with a row spacing of 12.5 cm and a density of 350 grains m<sup>-2</sup> in the 3rd week of March in both years. The fertilizer was applied before sowing at rates of 70 kg N ha<sup>-1</sup>, 40 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>, and 70 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup>. The weeds were chemically controlled using a mixture of 2,4-D, florasulam, and pinoxaden at rates of 180 g, 3.75 g, and 40 g a.i. ha<sup>-1</sup> at the end of tillering. Fungicides were applied twice: tiophanate-methyl in a dose of 700 g a.i. ha<sup>-1</sup> at the beginning of the stem-elongation stage and a mixture of tebuconazole and prothioconazole in doses 125 g a.i. and 125 g a.i. ha<sup>-1</sup>, respectively, at the flag leaf stage. The cereal leaf beetle was controlled with cypermethrin in a dose of 25 g a.i. ha<sup>-1</sup> at the flag leaf stage. Grain was harvested in both years between 21st and 31st of July when the grain had 14% of water content.

## 2.3. Measurement of Physiological, Biometric, and Agronomic Features

### 2.3.1. Chlorophyll Fluorescence

Measurements of direct fluorescence of chlorophyll in barley plants were carried out at three dates: I—at the second true leaf stage (BBCH 12) in the third decade of April; II—at the flag leaf stage (BBCH 39) in the third week of May; and III—at full heading (BBCH 55) in the second week of June. The tests were performed using the Pocket PEA fluorimeter (Pocket Plant Efficiency Analyzer) (Hansatech Instruments, Norfolk, UK). Measurements of direct chlorophyll fluorescence were carried out on samples with an area of 4 mm<sup>2</sup> on the middle part of the mature leaf blade; on the youngest fully developed leaf, i.e., the first leaf at the BBCH 12 stage; on the subflag leaf at the BBCH 39 stage; and on the flag leaf at the BBCH 55 stage. Special clips were used to extinguish the light phase of photosynthesis and blocked the light supply to the test sample for 30 min before the

measurement. The measurement was carried out according to the recommendations of the device manufacturer, with a light pulse intensity of  $3500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and a duration of 1 s. The fluorescent signal was initially sampled at 10  $\mu\text{s}$  intervals for the first 300  $\mu\text{s}$ . Depending on the date, 60–80 measurements were made in a series for each genotype. The following parameters were measured:  $F_0$ —initial fluorescence;  $F_M$ —maximum fluorescence;  $F_V = F_M - F_0$ —variable fluorescence;  $F_V/F_M$ —maximum PSII performance;  $PI_{\text{ABS}}$  (PI)—PSII functioning index; Area—surface area above the chlorophyll fluorescence induction curve. A detailed analysis of the measured chlorophyll fluorescence signals was also carried out using the OJIP test, which was used to determine phenomenological energy fluxes per excited cross section (CS):

- $ABS/CS_0$ —energy absorption by excited photosynthesizing sample (CS) at time zero ( $t = 0$ );
- $TR_0/CS_0 = \phi P_0(ABS/CS_X)$ —capacity of absorbed excitation energy by PSII photosynthesizing sample (CS) at time zero ( $t = 0$ );
- $ET_0/CS_0 = \phi E_0(ABS/CS_X)$ —electron transport of PSII of photosynthesizing sample (CS) at time zero ( $t = 0$ );
- $DI_0/CS_0 = (ABS/CS_0) - (TR_0/CS_0)$ —energy amount dissipated as heat by PSII photosynthesizing sample (CS) at  $t = 0$ ;
- $Plabs$ —an indicator of the functioning of PSII in relation to absorption.

### 2.3.2. Leaf Area Index (LAI) and Chlorophyll Index (SPAD)

During the growing period, the LAI (leaf area index) was measured twice, at the flag leaf stage (BBCH 39) and at the full heading stage (BBCH 55), using the SunScan Canopy Analysis System device (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK). The device's 1 m long probe of the device, equipped with 64 PAR sensors, was placed in the plant canopy just above the soil surface. At the same time, a second sensor measuring direct and diffuse radiation was placed above the plant canopy. The radiation measurements were transmitted from the probe and sensor to a PDA terminal, which converted and recorded the radiation quantum values into leaf area, expressed in  $\text{m}^2$  of leaf area  $\text{m}^{-2}$  of soil.

On these dates as well as at the second true leaf stage (BBCH 12), the SPAD index was determined on the 30 youngest leaves in 16 repetitions for each genotype, using the Minolta N-tester (Konica Minolta, Osaka, Japan). The central part of the leaf blade was placed in the clip of the device, which was equipped with a light source on one side and a photodetector on the other side of the leaf blade. When the clip was closed, the light source shone through the leaf, and the amount of light at 650 nm and 940 nm that passed through the leaf blade was read by the photodetector, which indicated the amount of light absorbed by chlorophyll and other components of the system. On this basis, the instrument calculated the amount of chlorophyll in the test sample expressed in conventional units.

### 2.3.3. Biometric and Agronomic Features

At the flowering stage (BBCH 59), the dry weight of shoots was determined on subsequent plants collected in a row with a length corresponding to an area of  $0.5 \text{ m}^2$  in each plot. Then, at the full maturity stage (BBCH 89), an area of  $1 \text{ m}^2$  was marked on each experimental plot, and the number of fertile generative spikes (with kernels) and sterile generative spikes (without kernels) was determined. At the same development stage, 30 spikes were randomly collected from each plot, and the number of grains per spike was calculated. Plants from experimental plots with an area of  $24 \text{ m}^2$  were harvested using a Winterstaiger Classic plot harvester (Winterstaiger, Ried im Innkreis, Austria). Grain yield and straw yield were determined using the weighing method after harvest, and then, based on these parameters, the above-ground biomass at full maturity stage and the ratio of grain yield to above-ground biomass yield were calculated, presented as the harvest index (HI). The 1000-grain weight was determined on samples taken after achieving constant grain moisture of 12%, based on 500 grains, in two repetitions of each treatment.

#### 2.4. Statistical Analysis

The results were analyzed using a two-way analysis of variance. Differences between means were tested using Tuckey's HSD test at  $p = 0.05$ . Pearson's simple correlation analysis was also performed within each genotype, as was the principal component analysis. All statistical calculations were performed in the Statistica 13.0 PL statistical package (Statsoft, Kraków, Poland). The radar plot was prepared using the Grapher 21 (Golden Softwear, Golden, CO, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Physiological Features

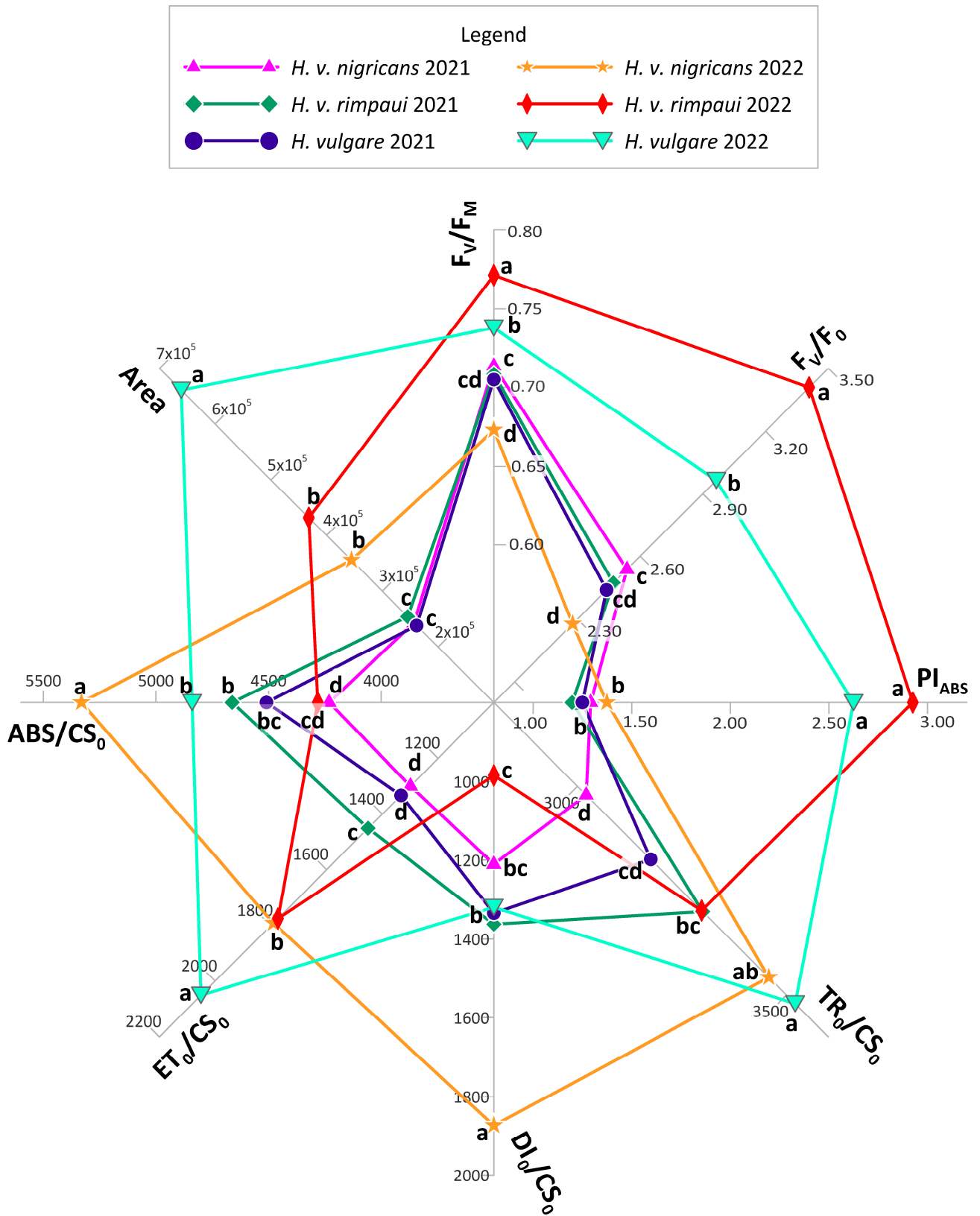
##### 3.1.1. Chlorophyll Fluorescence

The first measurement of chlorophyll fluorescence carried out on barley seedlings at the BBCH 12 stage indicated significant differences in the efficiency of the photosynthetic apparatus influenced by the interaction of year and genotype ( $p \leq 0.0005$ ; Supplementary Materials, Table S3). In the first season of the study, for most parameters determined at the seedling stage, no significant differences were noted between *H. vulgare* and alternative barley genotypes (*H. v. var. nigricans* and *H. v. var. rimpaii*). Significant differences were observed only in the  $ET_0/CS_0$  index, which was significantly higher in *H. v. var. rimpaii* than in the other genotypes. Additionally, black-seeded genotypes differed from each other in 2021 in terms of  $ABS/CS_0$  and  $TR_0/CS_0$  parameters, which were significantly higher in *H. v. var. rimpaii* than in *H. v. var. nigricans* (Figure 2).

In the second year of the study, much greater variation between genotypes was observed. Higher values of  $F_V/F_0$ ,  $F_V/F_M$ , and  $PI_{ABS}$  indices in 2022 were noted in *H. v. var. rimpaii*. The first two parameters were significantly higher in *H. v. var. rimpaii* than in the other genotypes, while  $PI_{ABS}$  was significantly higher in *H. v. var. rimpaii* only in comparison with *H. v. var. nigricans*. In the second year of the study, the conventional barley genotype was characterized by significantly higher area,  $ET_0/CS_0$ , and  $TR_0/CS_0$  than the black-seeded genotypes. *H. v. var. nigricans* in 2022 showed the highest values of the  $DI_0/CS_0$  and  $ABS/CS_0$  indices compared with the other genotypes. The values of these parameters were significantly higher for this genotype by 42.1% and 10.2% compared to *H. vulgare* and 90.3% and 24.5% than in *H. v. var. rimpaii* (Figure 2).

The chlorophyll fluorescence of subflag and flag leaves, described by parameters such as  $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ , or  $PI_{ABS}$ , was influenced by the year–genotype interaction ( $p \leq 0.0005$ ; Supplementary Materials, Table S4). In 2021, the  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$  values assessed on the subflag leaf were significantly higher in *H. vulgare* than in alternative barley genotypes (*H. v. var. nigricans* and *H. v. var. rimpaii*) (Table 1). In 2022, only  $F_V/F_0$  had a significantly higher value in *H. vulgare* than in *H. v. var. rimpaii*. In 2021, the  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$  indices of the primary genotypes were similar, while in 2022, *H. v. var. nigricans* was characterized by higher values of these parameters compared to *H. v. var. rimpaii*.

Analysis of the  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$  indices on the flag leaf showed a different ranking of genotypes than previously described for the parameters measured on the subflag leaf (Table 1). In 2021, black-seeded barley genotypes were characterized by higher values of the  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$  parameters than common barley (*H. vulgare*). In 2022, the values of these indices were similar in *H. v. var. nigricans* and *H. vulgare*. In the same year, the value of the  $F_V/F_0$  parameter in hooded barley (*H. v. var. rimpaii*) was the lowest, and the value of the  $F_V/F_M$  index was significantly lower only when compared to *H. vulgare* (Table 1).



**Figure 2.** Chlorophyll fluorescence at seedling stage of *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii*, and *H. vulgare*. a–d—the mean values with different letters are significantly different at the significance level  $p < 0.05$ .

**Table 1.** Chlorophyll fluorescence on subflag and flag leaf of *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaui*, and *H. vulgare*.

Year	Genotype	F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub> Mean ± SD	F <sub>V</sub> /F <sub>0</sub> Mean ± SD	PI <sub>ABS</sub> Mean ± SD
<b>Subflag leaf</b>				
2021	<i>H. v. nigricans</i>	0.789 <sup>c</sup> ± 0.007	3.78 <sup>c</sup> ± 0.172	2.05 <sup>d</sup> ± 0.163
	<i>H. v. rimpaui</i>	0.789 <sup>c</sup> ± 0.013	3.84 <sup>c</sup> ± 0.183	1.93 <sup>d</sup> ± 0.266
	<i>H. vulgare</i>	0.806 <sup>ab</sup> ± 0.014	4.25 <sup>ab</sup> ± 0.176	3.96 <sup>c</sup> ± 0.518
2022	<i>H. v. nigricans</i>	0.815 <sup>a</sup> ± 0.004	4.42 <sup>a</sup> ± 0.118	5.14 <sup>b</sup> ± 0.635
	<i>H. v. rimpaui</i>	0.797 <sup>bc</sup> ± 0.013	3.96 <sup>c</sup> ± 0.288	4.04 <sup>c</sup> ± 0.714
	<i>H. vulgare</i>	0.806 <sup>ab</sup> ± 0.009	4.18 <sup>b</sup> ± 0.234	5.82 <sup>a</sup> ± 1.28
<b>Flag leaf</b>				
2021	<i>H. v. nigricans</i>	0.835 <sup>a</sup> ± 0.015	4.94 <sup>a</sup> ± 0.076	5.10 <sup>c</sup> ± 0.583
	<i>H. v. rimpaui</i>	0.827 <sup>ab</sup> ± 0.006	4.79 <sup>a</sup> ± 0.188	5.90 <sup>bc</sup> ± 1.09
	<i>H. vulgare</i>	0.805 <sup>cd</sup> ± 0.009	4.16 <sup>c</sup> ± 0.234	4.84 <sup>c</sup> ± 0.422
2022	<i>H. v. nigricans</i>	0.808 <sup>cd</sup> ± 0.007	4.25 <sup>bc</sup> ± 0.220	6.36 <sup>b</sup> ± 1.06
	<i>H. v. rimpaui</i>	0.790 <sup>d</sup> ± 0.029	3.71 <sup>d</sup> ± 0.421	5.08 <sup>c</sup> ± 1.44
	<i>H. vulgare</i>	0.811 <sup>bc</sup> ± 0.026	4.47 <sup>b</sup> ± 0.250	7.51 <sup>a</sup> ± 1.39

<sup>a–d</sup>—the mean values in columns with different letters are significantly different at the significance level  $p < 0.05$ . “±” relates to the standard deviation.

Performance index (PI<sub>ABS</sub>) measurements on the subflag leaf in 2021 and the subflag and flag leaves in 2022 showed an increased value of this index in common barley (*H. vulgare*) compared to alternative barley genotypes (*H. v. var. nigricans* and *H. v. var. rimpaui*) (Table 1). *H. v. rimpaui* was characterized significantly by the lowest PI<sub>ABS</sub> values of the subflag and flag leaves in 2022. There were no differences in the PI<sub>ABS</sub> parameter between genotypes in the 2021 flag leaf analysis (Table 1).

### 3.1.2. Leaf Area Index (LAI) and Chlorophyll Index (SPAD)

Our study showed that LAI tested at the BBCH 35 and BBCH 57 stages was on average 71.4 and 19.9% higher, respectively, in 2021 compared to 2022 (Table 2). Thus, we observed the influence of year–genotype interaction for leaf area index (LAI) ( $p < 0.0001$ ; Supplementary Materials, Table S5).

**Table 2.** Leaf area index (LAI) of *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaui*, and *H. vulgare* at subflag leaf stage (BBCH 35) and heading stage (BBCH 57).

Year	Genotype	LAI at BBCH 35 Mean ± SD	LAI at BBCH 57 Mean ± SD
2021	<i>H. v. nigricans</i>	3.49 <sup>b</sup> ± 0.733	3.00 <sup>b</sup> ± 0.515
	<i>H. v. rimpaui</i>	4.51 <sup>a</sup> ± 0.516	3.14 <sup>a</sup> ± 0.598
	<i>H. vulgare</i>	2.50 <sup>c</sup> ± 0.539	2.34 <sup>c</sup> ± 0.268
2022	<i>H. v. nigricans</i>	1.76 <sup>de</sup> ± 0.261	2.44 <sup>c</sup> ± 0.530
	<i>H. v. rimpaui</i>	2.03 <sup>d</sup> ± 0.382	2.55 <sup>bc</sup> ± 0.421
	<i>H. vulgare</i>	1.46 <sup>e</sup> ± 0.253	2.08 <sup>c</sup> ± 0.560

<sup>a–e</sup>—the mean values in columns with different letters are significantly different at the significance level  $p < 0.05$ . “±” relates to the standard deviation.

In 2021, the LAI of hooded barley (*H. v. var. rimpaui*) was higher compared to *H. v. nigricans* and *H. vulgare* at the subflag leaf stage (BBCH 35) as well as at the heading stage (BBCH 57) (Table 2). In 2022, the LAI value of *H. v. var. rimpaui* was significantly higher only when compared to ‘Soldo’ *H. vulgare* at the subflag leaf stage (BBCH 35) (Table 2). In 2022, the LAI of the compared black barley genotypes did not differ significantly in both analyzed development stages of barley.

The chlorophyll index (SPAD) measured in 2022 was, on average for genotypes, higher than in 2021 by 10.3% at the seedling stage, 36.1% at the subflag leaf stage, and 38.1% at the heading stage (Table 3).

**Table 3.** Chlorophyll index (SPAD) at seedling stage (BBCH 12), subflag leaf stage (BBCH 35), and heading stage (BBCH 57) of *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpau*, and *H. vulgare*.

Year	Genotype	SPAD at BBCH 12 Mean $\pm$ SD	SPAD at BBCH 35 Mean $\pm$ SD	SPAD at BBCH 57 Mean $\pm$ SD
2021	<i>H. v. nigricans</i>	345.9 <sup>b</sup> $\pm$ 75.6	310.3 <sup>c</sup> $\pm$ 7.83	457.4 <sup>b</sup> $\pm$ 21.76
	<i>H. v. rimpau</i>	285.6 <sup>c</sup> $\pm$ 53.13	324.0 <sup>c</sup> $\pm$ 13.4	470.9 <sup>b</sup> $\pm$ 20.7
	<i>H. vulgare</i>	381.4 <sup>b</sup> $\pm$ 52.4	404.4 <sup>b</sup> $\pm$ 13.1	370.8 <sup>c</sup> $\pm$ 85.1
2022	<i>H. v. nigricans</i>	383.1 <sup>b</sup> $\pm$ 37.6	470.7 <sup>a</sup> $\pm$ 25.1	590.9 <sup>a</sup> $\pm$ 59.00
	<i>H. v. rimpau</i>	352.3 <sup>b</sup> $\pm$ 46.4	456.7 <sup>a</sup> $\pm$ 29.4	571.5 <sup>a</sup> $\pm$ 47.1
	<i>H. vulgare</i>	465.9 <sup>a</sup> $\pm$ 35.9	486.3 <sup>a</sup> $\pm$ 56.3	590.1 <sup>a</sup> $\pm$ 48.9

<sup>a-c</sup>—the mean values in columns with different letters are significantly different at the significance level  $p < 0.05$ . “ $\pm$ ” relates to the standard deviation.

In both in 2021 and 2022, *H. vulgare* at the seedling stage (BBCH 12) was characterized by higher values of the SPAD parameter than *H. v. var rimpau* (Table 3). At the subflag leaf stage (BBCH 35) and the heading stage (BBCH 57), a genotype–year interaction was demonstrated ( $p < 0.0001$ ; Supplementary Materials, Table S5). In 2021, SPAD at the subflag leaf stage (BBCH 35) was significantly higher in common barley (*H. vulgare*) as compared to *H. v. var. nigricans* and *H. v. rimpau* (Table 3). In turn, measurement in the same year at BBCH 57 indicated significantly lower values of this index in *H. vulgare* as compared to black-seeded barley. SPAD analysis in 2022 at both plant development stages (BBCH 35 and BBCH 57) showed no significant differences between genotypes.

### 3.2. Biometric and Agronomic Features

In 2021, the amount of dry matter of shoots at the flowering stage of all analyzed genotypes was similar and significantly higher (by 28.5%) compared to 2022. The amount of accumulated shoot mass of alternative black barley genotypes (*H. v. var. nigricans* and *Hordeum v. var. rimpau*) in 2022 was generally higher than the shoot biomass of *H. vulgare* cv. ‘Soldo’, the difference being statistically significant only for *H. v. rimpau* (Table 4).

**Table 4.** Shoot biomass at the flowering stage, number of generative tillers, and sterile generative tillers of *H. vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpau*, and *Hordeum vulgare*.

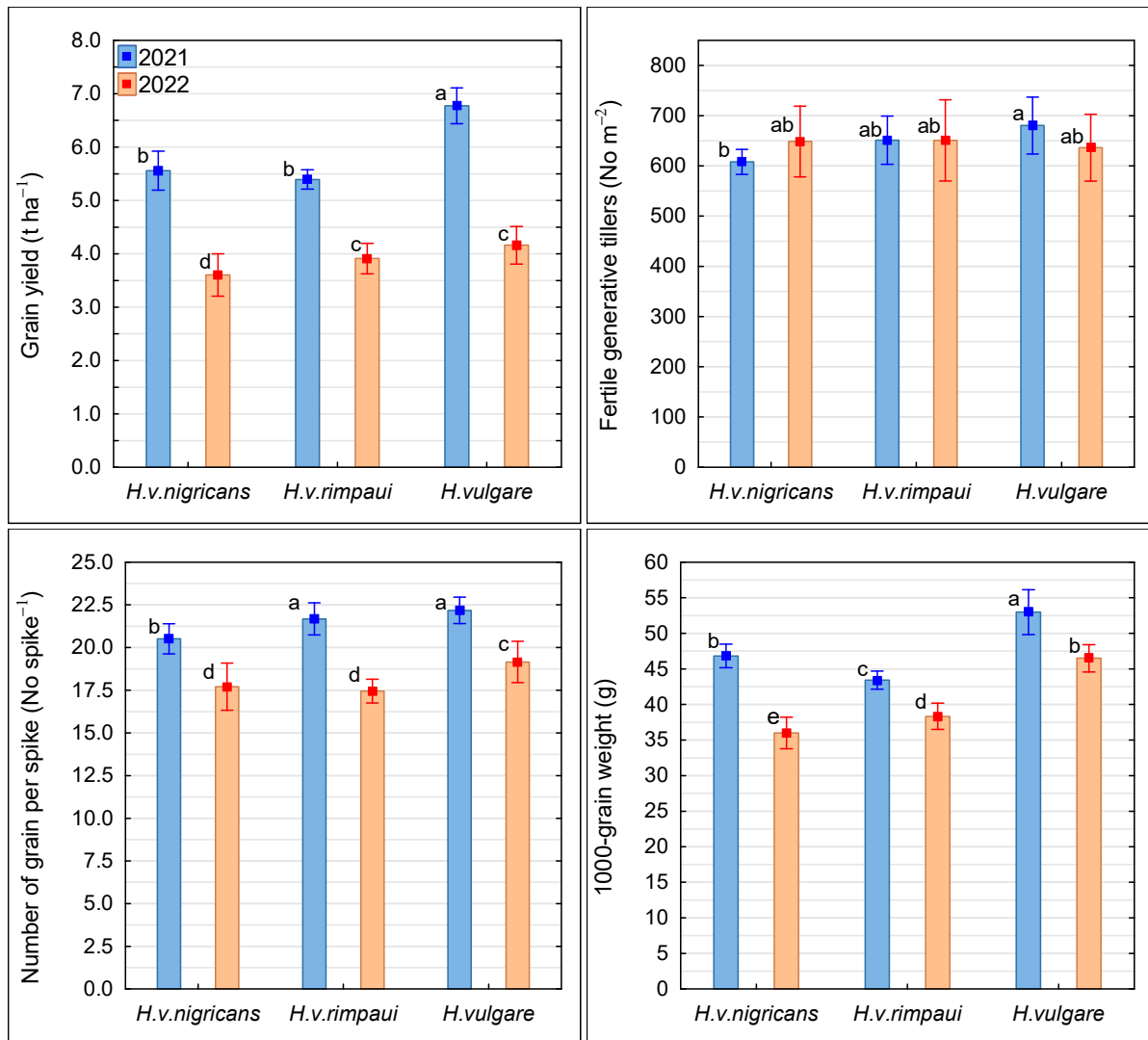
Year	Genotype	Dry Matter of Shoot g m <sup>-2</sup>	Generative Tillers No Plant <sup>-1</sup>	Sterile Generative Tillers No m <sup>-2</sup>
2021	<i>H. v. nigricans</i>	728.2 <sup>a</sup> $\pm$ 98.5	2.05 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.217	8.06 <sup>c</sup> $\pm$ 8.13
	<i>H. v. rimpau</i>	776.8 <sup>a</sup> $\pm$ 129.5	2.16 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.250	2.56 <sup>c</sup> $\pm$ 3.27
	<i>H. vulgare</i>	775.2 <sup>a</sup> $\pm$ 111.0	2.36 <sup>a</sup> $\pm$ 0.192	1.75 <sup>c</sup> $\pm$ 1.57
2022	<i>H. v. nigricans</i>	575.1 <sup>bc</sup> $\pm$ 79.4	1.68 <sup>d</sup> $\pm$ 0.208	103.44 <sup>a</sup> $\pm$ 46.32
	<i>H. v. rimpau</i>	678.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 145.9	1.87 <sup>cd</sup> $\pm$ 0.271	68.88 <sup>b</sup> $\pm$ 31.73
	<i>H. vulgare</i>	558.0 <sup>c</sup> $\pm$ 127.4	1.77 <sup>d</sup> $\pm$ 0.278	75.63 <sup>b</sup> $\pm$ 26.75

<sup>a-d</sup>—the mean values in columns with different letters are significantly different at the significance level  $p < 0.05$ . “ $\pm$ ” relates to the standard deviation.

There were more generative tillers from plants of individual genotypes in 2021 than those in 2022 (Table 4). The analysis of the genotype  $\times$  year interaction ( $p = 0.0152$ ; Supplementary Materials, Table S6) showed that in 2021, cultivar ‘Soldo’ *H. vulgare* developed significantly more generative tillers per plant compared to *H. v. var. nigricans*, while in 2022, they were similar in the three compared genotypes.



The number of fertile generative tillers per  $m^2$  in individual genotypes was similar in both years of the study and was an average of 684.2 in *H. v. var. nigricans*, 684.9 in *H. v. var. rimpaii*, and 695.3 in *H. vulgare* cv. ‘Soldo’ in the two years of the study (Figure 3). The analysis of the genotype  $\times$  year interaction ( $p = 0.0194$ ; Supplementary Materials, Table S6) showed that in 2021, the modern barley cultivar developed significantly more fertile generative tillers per  $m^{-2}$  compared to *H. v. var. nigricans*.



**Figure 3.** Grain yield and yield components of *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii*, and *H. vulgare*. Error bars indicate standard deviation. a–e—mean values followed by different letters indicate significant differences  $p < 0.05$ .

In 2021, almost all generative tillers (99.4% on average) developed spikes with grains. In 2022, some of the generative tillers (11.4% on average) had empty spikes (without grains). An increase in the number of such tillers (sterile generative tillers per  $m^2$ ) in 2022 compared to 2021 was recorded for each genotype. Primary barley *H. v. var. nigricans* usually developed more such tillers than other genotypes, but the difference was statistically significant only in 2022 (Table 4).

Dry matter of shoot and the number of generative tillers of *H. v. nigricans*, *H. v. rimpaii*, and *H. vulgare* showed lower variability in 2021 than in 2022 (Table 4). The coefficients of variation of the number of sterile generative tillers per  $m^2$  were high, especially in 2021, when plants produced a small number of such tillers. In both years, alternative

barley genotypes were characterized by much greater variability in the number of sterile generative tillers than *H. vulgare*.

The number of grains per spike was significantly lower in 2022 than in 2021 (by 15.6% on average for genotypes). The genotype  $\times$  year interaction ( $p < 0.0001$ ; Supplementary Materials, Table S6) indicates that in 2021, the number of grains per spike of *H. v. var. rimpaii* and the modern cultivar ‘Soldo’ *H. vulgare* was similar and significantly higher compared to *H. v. var. nigricans* (Figure 3). However, in 2022, both alternative black barley genotypes (*H. v. var. nigricans* and *H. v. var. rimpaii*) developed significantly fewer grains per spike compared to *H. vulgare*.

The 1000-grain weight was lower for each of the tested genotypes in 2022 compared to that in 2021 (by 15.6% on average). A genotype–year interaction was thus demonstrated ( $p < 0.0001$ ; Supplementary Materials, Table S6). In 2021, the 1000-grain weight of *H. v. var. nigricans* was higher than in *H. v. var. rimpaii*; in contrast, in 2022, the grain of *H. v. var. rimpaii* was characterized by a higher weight. In both years of the study, the 1000-grain weight in the modern cultivar ‘Soldo’ *H. vulgare* was higher than that of the alternative black barley genotypes (*H. v. var. nigricans* and *H. v. var. rimpaii*) (Figure 3).

For each genotype, the grain yield in 2021 was lower (by 34% on average) compared with that in 2022. The genotype  $\times$  year interaction ( $p < 0.0001$ ; Supplementary Materials, Table S6) indicated that in 2021, the modern cultivar ‘Soldo’ *H. vulgare* produced a significantly higher grain yield compared to the alternative black barley genotypes. However, in 2022, the grain yields of *H. v. var. rimpaii* and *H. vulgare* were similar and significantly higher than that of *H. v. var. nigricans* (Figure 3).

The straw yield as well as the grain yield of each genotype were lower in 2022 compared to that in 2021 (on average by 28%). In 2021, the straw mass of *H. v. var. rimpaii* was significantly higher than that of *H. v. var. nigricans*; however, in 2022 there were no significant differences in primary genotypes. In each year of the study, the straw yield was the lowest in the modern cultivar ‘Soldo’ *H. vulgare*.

A genotype–year interaction was demonstrated ( $p = 0.0027$ ; Supplementary Materials, Table S6) as affecting the harvest index value. In 2021, it was significantly higher in comparison with 2022 in *H. vulgare* cv. ‘Soldo’ and *H. v. var. nigricans* (Table 5). In both years, the harvest index value in *H. vulgare* cv. ‘Soldo’ was significantly higher than in the primary genotypes. Only in 2021 was it significantly higher in *H. v. var. nigricans* than in *H. v. rimpaii*. There were no major genotypic differences in the coefficient of variation of straw yield or harvest index.

**Table 5.** Straw yield and harvest index of *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii*, and *H. vulgare*.

Year	Genotype	Straw Yield t ha <sup>-1</sup>	Harvest Index
2021	<i>H. v. nigricans</i>	5.35 <sup>b</sup> $\pm$ 0.549	0.510 <sup>c</sup> $\pm$ 0.028
	<i>H. v. rimpaii</i>	5.87 <sup>a</sup> $\pm$ 0.415	0.478 <sup>d</sup> $\pm$ 0.015
	<i>H. vulgare</i>	4.69 <sup>c</sup> $\pm$ 0.511	0.591 <sup>a</sup> $\pm$ 0.028
2022	<i>H. v. nigricans</i>	3.84 <sup>d</sup> $\pm$ 0.268	0.484 <sup>d</sup> $\pm$ 0.032
	<i>H. v. rimpaii</i>	4.22 <sup>d</sup> $\pm$ 0.357	0.481 <sup>d</sup> $\pm$ 0.018
	<i>H. vulgare</i>	3.35 <sup>e</sup> $\pm$ 0.334	0.555 <sup>b</sup> $\pm$ 0.013

<sup>a–e</sup>—the mean values in columns with different letters are significantly different at the significance level  $p < 0.05$ . “ $\pm$ ” relates to the standard deviation.

### 3.3. Relationship of Physiological, Biometric, and Agronomic Features

In our research, the correlations (Pearson’s coefficient) between chlorophyll fluorescence parameters ( $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ , and  $PI_{ABS}$ ) and chlorophyll index (SPAD) were calculated (Table 6). The correlation coefficient for the SPAD and the  $PI_{ABS}$  parameter, both at the BBCH 35 and BBCH 57 stages, for all three genotypes was positive except for *H. v. rimpaii* at the BBCH 57 stage, for which the correlation was not significant.

**Table 6.** Relationship between chlorophyll index (SPAD) at subflag leaf stage (BBCH 35) and at heading stage (BBCH 57) and chlorophyll fluorescence parameters ( $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ , and  $PI_{ABS}$ ) for *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii*, and *H. vulgare* (Pearson's correlation coefficients).

Traits		<i>H. v. nigricans</i>	<i>H. v. rimpaii</i>	<i>H. vulgare</i>
SPAD				
BBCH 35	$F_V/F_M$	0.902 *	0.292	−0.007
	$F_V/F_0$	0.884 *	0.261	−0.275
	$PI_{ABS}$	0.925 *	0.853 *	0.381 *
SPAD				
BBCH 57	$F_V/F_M$	−0.585 *	−0.620 *	0.240
	$F_V/F_0$	−0.738 *	−0.752 *	0.615 *
	$PI_{ABS}$	0.488 *	−0.314	0.677 *

\*—significant at the level of  $p < 0.05$ .

The relationship between the  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$  parameters and SPAD varied among genotypes. In both black-seeded barley genotypes at the BBCH 57 stage, the correlation for  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$  and SPAD was negative (Table 6). However, measurement at the earlier stage (BBCH 35) indicated a significant, positive correlation between these indices only in *H. v. nigricans*.

Correlation coefficients were also calculated for the leaf area index (LAI), biometric and agronomic features, and grain yield of each genotype (Table 7). The LAI parameter, determined at the subflag leaf stage (BBCH 35), showed a significantly strong, positive correlation with the grain yield of all analyzed genotypes. However, at the later stage of plant development (BBCH 57), this correlation was significant only for alternative barley genotypes.

**Table 7.** Relationship between grain yield and leaf area index (LAI) and biometric and agronomic features of *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii*, and *H. vulgare* (Pearson's correlation coefficients).

Traits	<i>H. v. var. nigricans</i>	<i>H. v. var. rimpaii</i>	<i>H. vulgare</i>
LAI at BBCH 35	0.779 *	0.917 *	0.737 *
LAI at BBCH 57	0.469 *	0.561 *	0.221
Shoot biomass at the flowering stage ( $g\ m^{-2}$ )	0.667 *	0.378 *	0.711 *
Fertile generative tillers ( $No\ m^{-2}$ )	−0.248	−0.011	0.364 *
1000-grain weight (g)	0.917 *	0.852 *	0.827 *
Number of grains per spike ( $No\ spike^{-1}$ )	0.834 *	0.722 *	0.915 *

\*—significant at the level of  $p < 0.05$ .

A positive correlation between the shoot biomass at the flowering stage and the final grain yield was shown for both black-seeded barley and *H. vulgare*, although these relationships were moderately strong (Table 7). Calculated correlation coefficients for the main yield components, such as 1000-grain weight and the number of grains per spike for *H. v. var. nigricans*, *H. v. var. rimpaii*, and *H. vulgare* show a significantly strong or very strong positive relationship between these parameters and grain yield. The number of fertile generative tillers per  $m^2$ , for which the only significant, weak correlation with grain yield was shown for common barley, is distinctive among the yield structure components (Table 7).

### 3.4. Principal Component Analysis (PCA)

In order to evaluate the correlations between genotypes and analyzed parameters such as chlorophyll fluorescence, LAI, SPAD, or agronomic and biometric parameters, a principal component analysis (PCA) was conducted. For the seedling stage (BBCH 12) analysis, the biplot PCA explained 76.32% of the first principal component (PC1) and 23.68% of the second principal component (PC2) from 100% of total variance. For the analysis at subflag leaf stage (BBCH 35) and heading stage (BBCH 57) from the 100% of total variance, the PC1 defined 74.66% and PC2 25.34% (Figure 4A,B). The variances obtained for PC2, both in the seedling stage and in BBCH 35 or BBCH 57, were influenced to the greatest extent by the PI parameter (Figure 4A,B). During the analyses of plants in the seedling stage, the area parameter had the greatest impact on the PC1 variance, while in the later measurements, the parameters  $F_V/F_M$  (BBCH 57) and  $F_V/F_0$  (BBCH 57) had the greatest contribution to the variance for PC1 (Figure 4A,B).

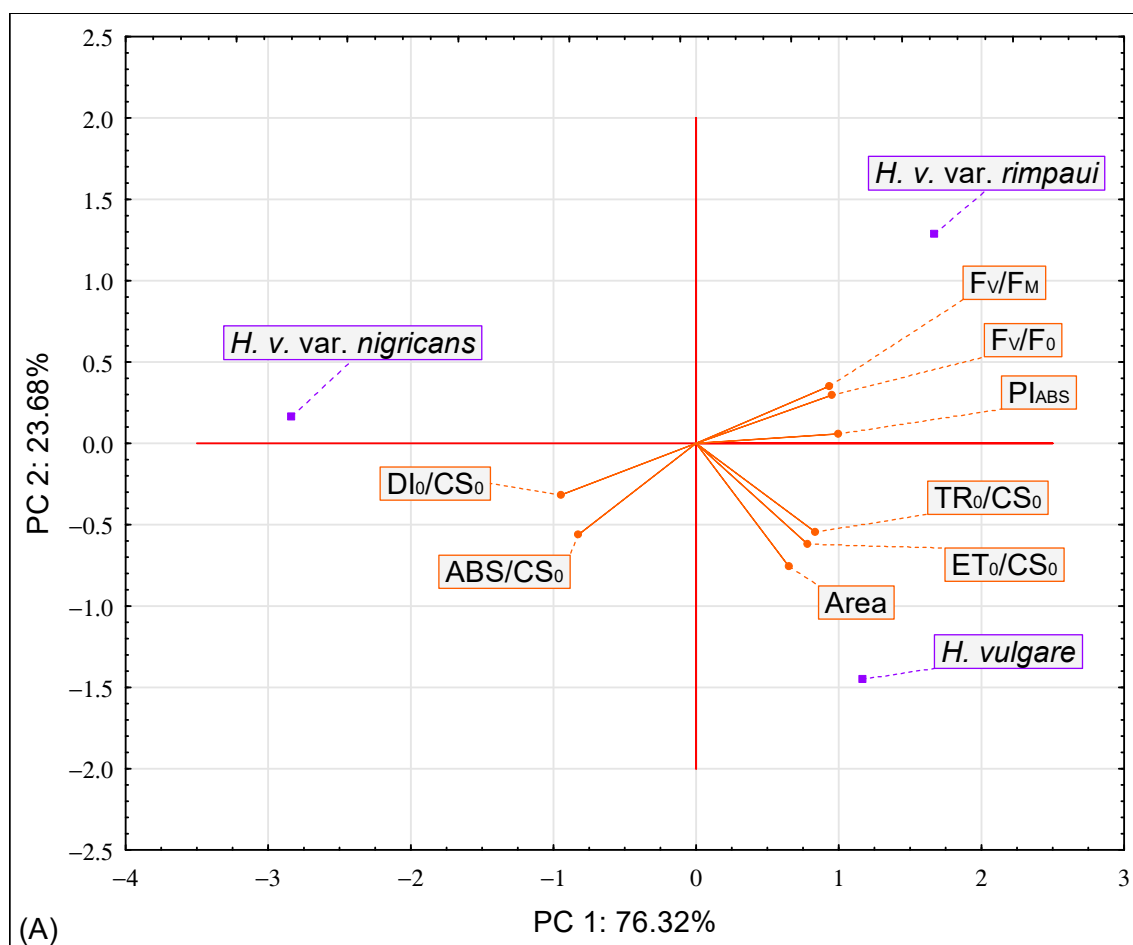
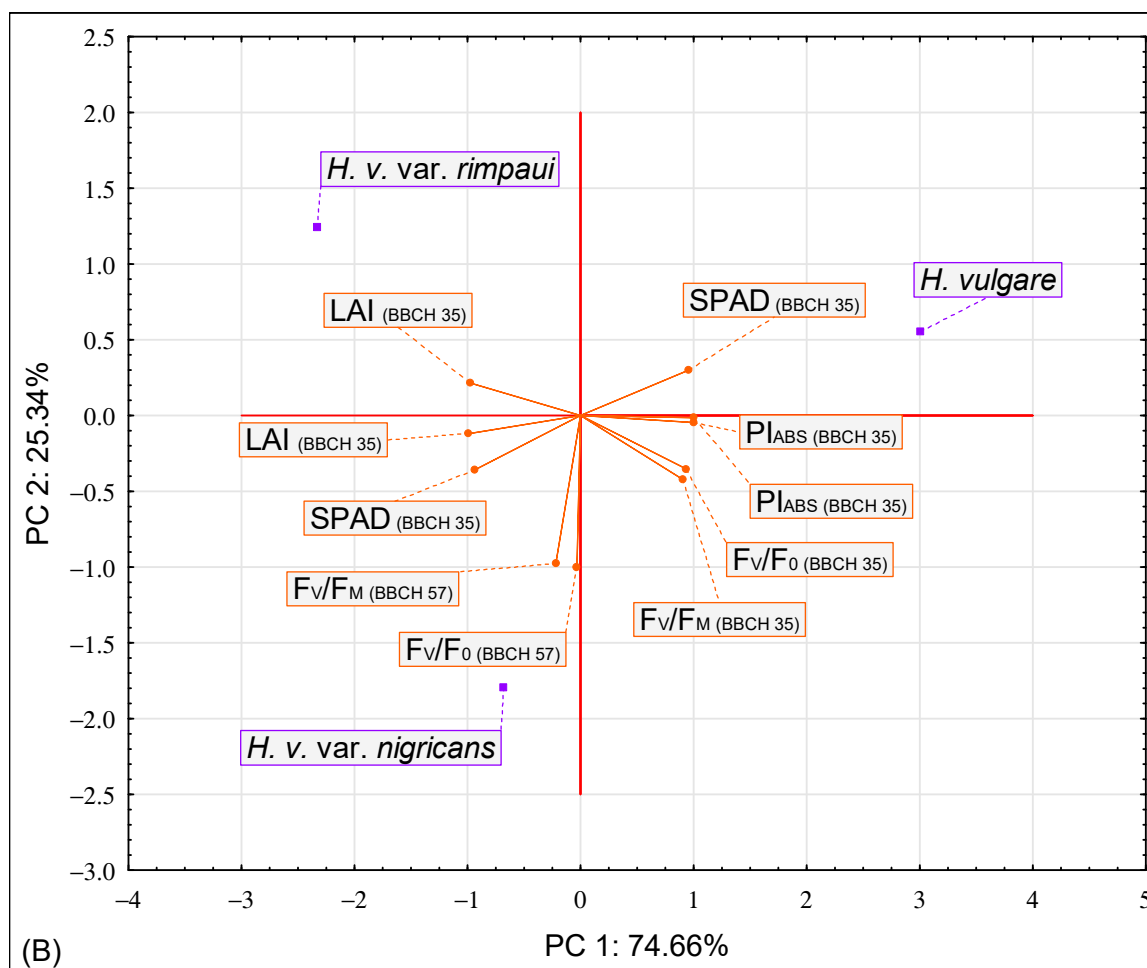


Figure 4. Cont.



**Figure 4.** Biplot principal component analysis (PCA) of fluorescence parameters LAI and SPAD of *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpai*, and *H. vulgare* at (A) seedling stage (BBCH 12), (B) subflag leaf stage BBCH (35), and heading stage BBCH (57).

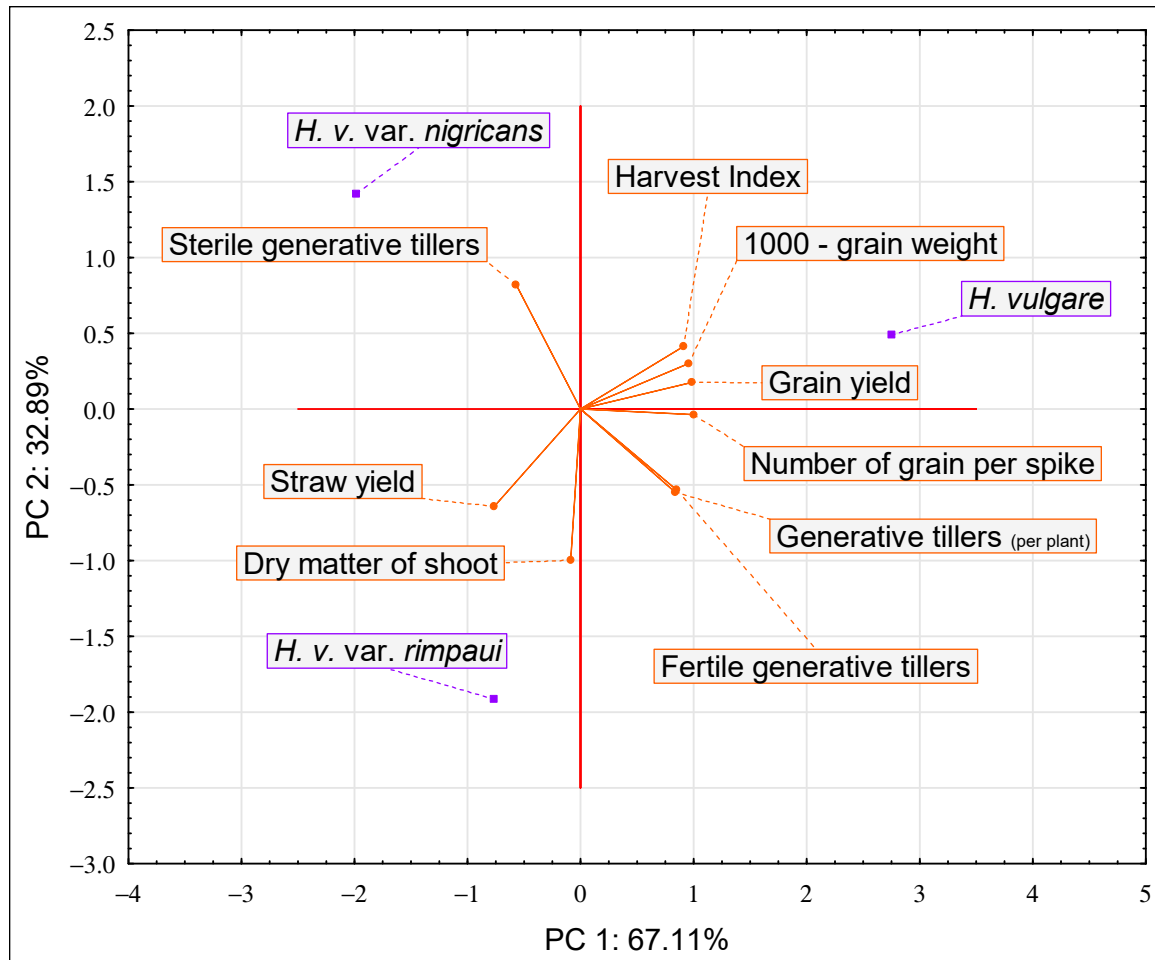
In both biplots, the angles between  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$  at each measurement time are very narrow, which indicates their strong correlation (Figure 4A,B). In Figure 4A, narrow angles can also be observed between  $TR_0/CS_0$ ,  $ET_0/CS_0$ , and area, but in Figure 4B a strong correlation appears between  $PI_{ABS}$  measured in BBCH 35 and  $PI_{ABS}$  in BBCH 57. The other directions and wide angles between  $DI_0/CS_0$  and  $ABS/CS_0$  or  $LAI_{(BBCH\ 35)}$  and  $SPAD_{(BBCH\ 35)}$  suggest they are not correlated with the rest of the dependents.

In the PCA analysis, most parameters ( $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ ,  $PI_{ABS}$ ,  $TR_0/CS_0$ ,  $ET_0/CS_0$ , and area) at the seedling stage (BBCH 12) and  $SPAD_{(BBCH\ 35)}$ ,  $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ , and  $PI_{ABS}$  all in both growing stages (BBCH 35 and BBCH 57) are better described by PC1. On the contrary,  $DI_0/CS_0$  and  $ABS/CS_0$  at BBCH 12 as well as  $LAI_{(BBCH\ 35)}$ ,  $LAI_{(BBCH\ 57)}$ , and  $SPAD_{(BBCH\ 57)}$  are better represented by PC2.

At the seedling stage, *H. v. var. rimpai* was characterized well by  $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ , and  $PI_{ABS}$  and the common barley by  $TR_0/CS_0$ ,  $ET_0/CS_0$ , and area. On the other hand, at subsequent measurement dates, the biplot had a different layout. Hooded barley was distinguished only by LAI at BBCH 35. Common barley was characterized well by SPAD at the subflag leaf stage and slightly by  $PI_{ABS}$  at the subflag and flag leaf stages; however, *H. v. nigricans* was mainly described by  $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ , and SPAD at the flag leaf stage (BBCH 57).

The total variance of PCA for agronomic and biometric parameters was described 100% by PC1 (67.11%) and PC2 (32.89%). The variance obtained for PC2 was influenced to the greatest extent by the parameter of number of grains per spike and the variance for

PC1 by dry matter of shoot (Figure 5). Very narrow angles between grain yield, 1000-grain weight, and harvest index of the fertile generative tillers and generative tillers per plant indicated their high correlation (Figure 5).



**Figure 5.** Biplot principal component analysis (PCA) of agronomic and biometric parameters of *Hordeum vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpai*, and *H. vulgare*.

The wide angles and other directions between straw yield and dry matter of shoot or sterile generative tillers suggested they had no relationship with other dependents (Figure 5). Straw yield and sterile generative tillers were the only dependents described better by PC1; the rest of the analyzed parameters were described mainly by PC2. In the PCA, it was shown that *H. vulgare* was characterized by the high grain yield, 1000-grain weight, and harvest index. However, *H. v. var. nigricans* was distinguished by high dry matter of shoot and straw yield and *H. v. var. rimpai* by the increased number of sterile generative tillers.

#### 4. Discussion

Our research showed a diverse response of chlorophyll fluorescence indicators to the hydrothermal conditions of the growing seasons. The assessment of these parameters at the seedling stage indicated the lower-efficiency photosynthesis of barley in 2021. This could have resulted from negative temperatures during germination and emergence (Supplementary Materials, Table S2). All parameters related to the performance of photosystem II (PS II), including  $F_V/F_M$ ,  $F_V/F_0$ , and  $PI_{ABS}$ , were indicative of plant stress. There were no significant differences between genotypes in these parameters. According to Elakhdar et al. [31], young barley plants exposed to negative temperatures exhibited significantly

reduced PS II performance, which was manifested by lower  $F_V/F_0$  and  $F_V/F_M$  values. However, our research showed that in 2021, *H. v. var. rimpaii* was characterized by higher values of  $ET_0/CS_0$ ,  $TR_0/CS_0$ , and  $ABS/CS_0$  (indices related to photosynthetic electron transport and absorption) than *H. v. var. nigricans*. This might indicate a slightly higher tolerance of this genotype to stress associated with the occurrence of negative temperatures. Efficient electron transport may reduce the risk of damage from the overexcitation of centers and due to a lower amount of antenna chlorophyll [32].

In 2022, during the period of measurements on seedlings (BBCH 12), air temperatures were not as low as in 2021, which excluded the occurrence of strong thermal stress in plants. However, barley seedlings could have been exposed to water stress associated with extremely low rainfall (Figure 1). The occurrence of drought in this period was also indicated by the very low hydro-thermal coefficient of Sielianinow in April (Supplementary Materials, Table S1). Hydrothermal conditions in 2022 did not disturb the functioning of PS II as strongly as those in 2021, which is indicated by the much higher values of most chlorophyll fluorescence parameters. However, the response of the plants depended significantly on the genotype. Parameters showing the function of PS II indicated that *H. v. rimpaii* showed greater tolerance to water deficiency at the seedling stage than the other genotypes. This genotype was characterized by significantly higher values of the  $F_V/F_0$ ,  $F_V/F_M$ , and  $PI_{ABS}$  parameters. Similar results in terms of PS II efficiency in barley seedlings subjected to drought stress were obtained by Oukarroum et al. [33]. According to that study, the  $PI_{ABS}$  index was differentiated by changing humidity conditions, as drought could affect various stages of the photosynthesis process.

In our research, values of the  $F_V/F_M$  and  $F_V/F_0$  for the subflag and flag leaves significantly differed depending on the genotype and year of the study (Table 1). However, it was noticed that all the results oscillated around the values considered appropriate for non-stressed plants [24]. When analyzing the  $PI_{ABS}$  of the subflag and flag leaves (Table 1), higher values were usually observed in 2022 than in 2021, although 2022 was less favorable for the growth and yield of barley (Figures 1 and 3; Supplementary Materials, Table S1). Higher  $PI_{ABS}$  values in 2022 were most likely due to the hydrothermal conditions at the dates of the measurements. In 2022 (Supplementary Materials, Table S1), at the first and second measurement dates (3rd week of May for subflag leaf and 2nd of June for flag leaf), the weather conditions were optimal or close to optimal for plants (Sielianinow coefficient 1.16 and 1.32, respectively). However, in 2021, the Sielianinow coefficients at both measurement dates (1st week of June for subflag leaf and 2nd of June for flag leaf) indicated the occurrence of water stress (Sielianinow coefficient 0.50 and 0.46, respectively) [30].

In our study, the chlorophyll index (SPAD value) depended mainly on the development phase of plants and the hydrothermal conditions of the growing season. Measurements taken at the seedling stage, when the young leaves were starting to develop, showed a lower value than measurements taken on the flag leaf (Table 3). This parameter varied depending on the genotype, but the year of study seemed to have a greater impact on the SPAD value, which was higher in 2022 than in 2021. In 2022, where the weather conditions during the growing season were less favorable, plants produced less leaf area (Table 2) and total biomass (Table 4), which in turn contributed to a higher concentration of chlorophyll molecules in leaves and higher SPAD values. A similar view was presented by Hasanuzzama et al. [34] in their research on barley and drought stress.

In our study, an analysis of the correlation between SPAD and chlorophyll fluorescence parameters was presented (Table 6), which is a novel approach and not commonly presented in the literature so far. Generally, a significant, positive relationship was found between the  $PI_{ABS}$  index and the SPAD value for the three analyzed genotypes in both measurement growing stages (BBCH 35 and BBCH 57). The relationship allowed the conclusion that with an increase in the concentration of chlorophyll molecules on the leaf surface, the unit efficiency of photosynthesis increases, which is described by the  $PI_{ABS}$  parameter, a commonly used indicator during abiotic stresses [35].

In years with favorable weather conditions for plant productivity (in our study, 2021) (Figure 1), the chlorophyll content may be lower; however, it is usually compensated by a larger leaf area, which allows to maintain high productivity [36]. Our results are in line with this view, as we observed a higher leaf area ratio (LAI) in 2021 than in 2022 for the genotypes analyzed (Table 2).

In 2021, at both stages of development (BBCH 37 and 57), common barley cv. ‘Soldo’ had a lower LAI than *H. v. var. rimpaii* and *H. v. var. nigricans* (Table 2). This finding corroborated with Alqudah et al.’s [37] findings that lower LAI values in modern cereal varieties were due to plant breeding. One of the goals of these processes was to grow plants that produce shorter and narrower leaves for better adaptation to different environmental conditions. *H. v. rimpaii* and *H. v. nigricans*, as representatives of ancient cereals, have not undergone any improvement and are characterized by a higher LAI, especially hooded barley. However, under less favorable weather conditions (as in 2022 in our study), black-seeded barley does not develop a significantly larger leaf area (LAI), which in drought stress allows for reducing evapotranspiration [38].

The leaf area index (LAI), which is the area of green leaves per unit area, on the agronomic level, is analyzed primarily in terms of its impact on the final yield [39]. Our study showed a significant strong correlation between the leaf area index and grain yield for all three barley genotypes tested (Table 7), mainly at the stage of intensive development of photosynthetic organs and accumulation of aboveground biomass (BBCH 35). On the other hand, the lack of a relationship between grain yield and LAI in the later stages of common barley development may also be explained by the breeding process. One of the biggest milestones in cereal breeding was the introgression of *Rht* genes, which are responsible for shortening the height of the straw [40]. In previous studies, it was observed that cereals with active *Rht* genes (the majority of modern wheat and barley genotypes) have smaller leaf areas, but the photosynthetic capacity is even higher than among wild grains [41]. The implementation of these genes into plants also affected other traits. One of the primary effects was a reduction in straw yield and shoot biomass, which agreed with our results (Tables 4 and 5). It is also believed that *Rht* genes have an influence on kernels by increasing their weight, which in turn increases the final grain yield. Besides the higher grain yield and lower straw yield, the harvest index (HI) is also a parameter that benefited from the shortening process [42], which in our research was significantly higher for *H. vulgare* than for alternative genotypes of barley (Table 5). In addition, some studies indicated that the *Rht* genes affected the number of grains per spike by reducing the demand for assimilates by shoots and by increasing the transport of assimilates from shoots to developing spikes, resulting in the higher fertility of florets [43]. However, in 2021, there was no significant difference in the number of grains per spike between common barley and *H. v. var. rimpaii* (the primary form of barley) (Figure 3). This indicated the ability of some primary genotypes to produce a similar number of grains per spike as the modern barley.

Common barley to a greater extent has genetically determined production potential in favorable weather conditions (2021), mainly due to the increase in 1000-grain weight compared to both primary genotypes as well as the number of grain per spike and fertile generative tillers per m<sup>2</sup> compared to *H. v. var. nigricans* (Figure 5). In turn, no differences in grain yield in 2022 between *H. v. var. rimpaii* and *H. vulgare* were found, which might be related to the number of fertile generative tillers per m<sup>2</sup> and indirectly through generative tillers per plant (Table 4, Figures 4 and 5). It is worth noticing that in unfavorable weather conditions (2022), no differences were found between any of the analyzed genotypes (primary and modern) in the number of fertile generative tillers per m<sup>2</sup>. This is in line with Yessen et al. [44], who claimed that black barley growing under low soil matric potential (which points to low water availability for plants) produced even more tillers than *H. vulgare*.

In our research, some generative tillers developed spikes without kernels (sterile generative tillers) (Table 4). The number of such tillers was closely related to environmental



conditions. The largest number of generative tillers remained unproductive under the rainfall deficit in 2022. This is in line with previous research [45], which showed an increase in the number of sterile generative tillers in spring wheat under drought during the growing season. In the current study, *H. v. var. nigricans* was observed to have the largest number of spikes without kernels (Table 4, Figure 5). According to Pecio et al. [46], spring barley genotypes differed in their responses to water deficiency, resulting in a different number of spikes with fully developed grains.

## 5. Conclusions

At the seedling stage, *H. v. var. rimpaii* was characterized by higher chlorophyll fluorescence parameters such as  $ET_0/CS_0$ ,  $TR_0/CS_0$ , and  $ABS/CS_0$  than *H. v. var. nigricans*. This may indicate greater tolerance to stress associated with negative temperatures. Moreover, seedlings of this barley genotype had increased parameters, showing the functioning of PS II ( $F_V/F_0$ ,  $F_V/F_M$ ), which might indicate increased tolerance to water deficiency. In turn, in the flag leaf stage, under conditions of periodic water shortages, higher abiotic stress indicators (performance index ( $PI_{ABS}$ ) and  $F_V/F_0$ ) were shown in *H. v. var. nigricans* compared to *H. v. var. rimpaii*.

Common barley made greater use of its genetically determined production potential in favorable weather conditions (2021), mainly due to the increase in 1000-grain weight compared to both black barley genotypes as well as the number of grain per spike and fertile generative tillers per  $m^2$  compared to *H. v. var. nigricans*.

Further studies should focus on the response of black barley genotypes to induced abiotic stresses at the seedling stage of *H. v. var. rimpaii* and at the flag leaf stage of *H. v. var. nigricans*. However, in agronomic practice, the number of grains per spike and 1000-grain weight should be increased.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agriculture13102033/s1>, Table S1: Sielaninov index (hydrothermal coefficient) from April to June 2021 and 2022 (recorded at the agrometeorological station in Minikowo, Poland); Table S2: Meteorological data from 11 to 30 of April 2021 and 2022; Table S3: Analysis of variance ANOVA for chlorophyll fluorescence at seedling stage of barley genotypes (*H. vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii*, and *H. vulgare*), growing in 2021 and 2022; Table S4: Analysis of variance ANOVA for chlorophyll fluorescence at subflag leaf stage (BBCH 35) and heading stage (BBCH 57) of barley genotypes (*H. vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii*, and *H. vulgare*), growing in 2021 and 2022; Table S5: Analysis of variance (ANOVA) for SPAD and LAI at seedling stage (BBCH 12), at subflag leaf stage (BBCH 35), and heading stage (BBCH 57) of barley genotypes (*H. vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii*, and *H. vulgare*), growing in 2021 and 2022; Table S6: Analysis of variance (ANOVA) for grain yield, straw yield, harvest index, shoot biomass at the flowering stage, number of grains per spike, 1000-grain weight, generative tillers ( $No\ Plant^{-1}$ ), fertile generative tillers ( $No\ m^{-2}$ ), and sterile generative tillers ( $No\ m^{-2}$ ) of barley genotypes (*H. vulgare* var. *nigricans*, *H. vulgare* var. *rimpaii*, and *H. vulgare*), growing in 2021 and 2022.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.S.; methodology, M.S. and R.N.; software, K.B.; validation, M.S., R.N. and K.B.; formal analysis, M.S.; investigation, R.N. and M.S.; resources, M.S.; data curation, R.N.; writing—original draft preparation, M.S., K.B. and R.N.; writing—review and editing, M.S., K.B. and R.N.; visualization, K.B.; supervision, M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Dai, F.; Nevo, E.; Wu, D.; Comadran, J.; Zhou, M.; Qiu, L.; Chen, Z.; Beiles, A.; Chen, G.; Zhang, G. Tibet is one of the centers of domestication of cultivated barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16969–16973. [CrossRef]
2. Haas, M.; Schreiber, M.; Mascher, M. Domestication and crop evolution of wheat and barley: Genes, genomics, and future directions. *J. Integr. Plant Biol.* **2019**, *61*, 204–225. [CrossRef]
3. Food and Agriculture Organization of the United Nation. FAOSTAT: Crops and Livestock Products. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (accessed on 1 June 2022).
4. Gong, L. Barley. In *Bioactive Factors and Processing Technology for Cereal Foods*; Wang, J., San, B., Tsao, R., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2019.
5. Gordeeva, E.I.; Glagoleva, A.Y.; Kukoeva, T.V.; Khlestkina, E.K.; Shoeva, O.Y. Purple-grained barley (*Hordeum vulgare* L.): Marker-assisted development of NILs for investigating peculiarities of the anthocyanin biosynthesis regulatory network. *BMC Plant Biol.* **2019**, *19*, 49–57. [CrossRef]
6. Strygina, K.V.; Börner, A.; Khlestkina, E.K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone. *BMC Plant Biol.* **2017**, *17*, 184. [CrossRef]
7. Shoeva, O.Y.; Mock, H.-P.; Kukoeva, T.V.; Börner, A.; Khlestkina, E.K. Regulation of the Flavonoid Biosynthesis Pathway Genes in Purple and Black Grains of *Hordeum vulgare*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163782. [CrossRef] [PubMed]
8. Özberk, F.; Ozberk, I.; Bayhan, M.; Odabaşoğlu, C. Black Barley Marketing Prices and Profitability vs. White from 2005 to 2015 in South-East Anatolia. *Transylv. Rev.* **2015**, *XXIV*, 1–10.
9. Idehen, E.; Tang, Y.; Sang, S. Bioactive phytochemicals in barley. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*, 148–161. [CrossRef] [PubMed]
10. Sakellariou, M.; Mylona, P.V. New Uses for Traditional Crops: The Case of Barley Biofortification. *Agronomy* **2020**, *10*, 1964. [CrossRef]
11. Horvat, D.; Šimić, G.; Drezner, G.; Lalić, A.; Ledencan, T.; Tucak, M.; Plavšić, H.; Andrić, L.; Zdunić, Z. Phenolic acid profiles and antioxidants activity of major cereal crops. *Antioxidants* **2020**, *9*, 527. [CrossRef]
12. Panizo-Casado, M.; Déniz-Expósito, P.; Rodríguez-Galdón, B.; Afonso-Morales, D.; Ríos-Mesa, D.; Díaz-Romero, C.; Rodríguez-Rodríguez, E.M. The chemical composition of barley grain (*Hordeum vulgare* L.) landraces from the Canary Islands. *J. Food Sci.* **2020**, *85*, 1725–1734. [CrossRef]
13. Kim, M.J.; Hyun, J.N.; Kim, J.A.E.; Park, J.C.; Kim, M.Y.; Kim, J.G.; Lee, S.J.; Chun, S.C.; Chung, I.M. Relationship between Phenolic Compounds, Anthocyanins Content and Antioxidant Activity in Colored Barley Germplasm. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4802–4809. [CrossRef]
14. Abdel-Aal, E.S.M.; Choo, T.M.; Dhillon, S.; Rabalski, I. Free and bound phenolic acids and total phenolics in black, blue, and yellow barley and their contribution to free radical scavenging capacity. *Cereal Chem.* **2012**, *89*, 198–204. [CrossRef]
15. Yang, X.J.; Dang, B.; Fan, M.T. Free and bound phenolic compound content and antioxidant activity of different cultivated blue highland barley varieties from the Qinghai-Tibet Plateau. *Molecules* **2018**, *23*, 879. [CrossRef] [PubMed]
16. Nowak, R.; Szczepanek, M.; Kobus-Cisowska, J.; Stuper-Szablewska, K.; Dziedziński, M.; Błaszczuk, K. Profile of phenolic compounds and antioxidant activity of organically and conventionally grown black-grain barley genotypes treated with biostimulant. *PLoS ONE* **2023**, *18*, e0288428. [CrossRef] [PubMed]
17. Nowak, R.; Szczepanek, M.; Błaszczuk, K.; Kobus-Cisowska, J.; Przybylska-Balcerek, A.; Stuper-Szablewska, K.; Pobereżny, J.; Hassanpouraghdam, M.B.; Rasouli, F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. *Agronomy* **2023**, *13*, 1852. [CrossRef]
18. Sánchez-Reinoso, A.D.; Ligarreto-Moreno, G.A.; Restrepo-Díaz, H. Chlorophyll  $\alpha$  Fluorescence Parameters as an Indicator to Identify Drought Susceptibility in Common Bush Bean. *Agronomy* **2019**, *9*, 526. [CrossRef]
19. Faseela, P.; Sinisha, A.K.; Brestič, M.; Puthur, J.T. Chlorophyll a fluorescence parameters as indicators of a particular abiotic stress in rice. *Photosynthetica* **2019**, *57*, 108–115. [CrossRef]
20. Roostaeia, M.; Mohammadi, S.A.; Amri, A.; Majidi, E.; Nachit, M.; Haghparast, R. Chlorophyll Fluorescence Parameters and Drought Tolerance in a Mapping Population of Winter Bread Wheat in the Highlands of Iran. *Russ. J. Plant Physiol.* **2011**, *58*, 351–358. [CrossRef]
21. Singh, H.; Kumar, D.; Soni, V. Performance of chlorophyll a fluorescence parameters in Lemna minor under heavy metal stress induced by various concentration of copper. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 10620. [CrossRef]
22. Roháček, K. Chlorophyll fluorescence parameters: The definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* **2002**, *40*, 13–29. [CrossRef]
23. He, L.; Yu, L.; Li, B.; Du, N.; Guo, S. The effect of exogenous calcium on cucumber fruit quality, photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and fast chlorophyll fluorescence during the fruiting period under hypoxic stress. *BMC Plant Biol.* **2018**, *18*, 180. [CrossRef]
24. Luo, H.; Merope, T.; Zhang, Y.; Zhang, W. Combining gas exchange and chlorophyll a fluorescence measurements to analyze the photosynthetic activity of drip-irrigated cotton under different soil water deficits. *J. Integr. Agric.* **2016**, *15*, 1256–1266. [CrossRef]
25. Zhang, R.; Yang, P.; Liu, S.; Wang, C.; Liu, J. Evaluation of the Methods for Estimating Leaf Chlorophyll Content with SPAD Chlorophyll Meters. *Remote Sens.* **2022**, *14*, 5144. [CrossRef]
26. Nyi, N.; Sridokchan, W.; Chai-arree, W.; Srinives, P. Nondestructive measurement of photosynthetic pigments and nitrogen status in *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) by chlorophyll meter. *Phillipp. Agric. Sci.* **2012**, *95*, 83–89.

27. Fang, H.; Baret, F.; Plummer, S.; Schaepman-Strub, G. An overview of global leaf area index (LAI): Methods, products, validation, and applications. *Rev. Geophys.* **2019**, *57*, 739–799. [[CrossRef](#)]
28. Gozdowski, D.; Mądry, W.; Wyszynski, Z.; Kalinowska-Zdun, M. Characteristics and empirical comparison of simple and complex path analysis in grain yield determination by yield—Related traits. Part II. Example on spring barley. *Biul. Inst. Hod. I Aklim. Roślin* **2008**, *249*, 125–132.
29. Selyaninov, G.T. On the agricultural estimation of climate. *Tr. Po Sel'skokhozyaistvennoi Meteorol.* **1928**, *20*, 165–177.
30. Kuklik, M.; Baryła, R.; Czarnecki, Z.; Bochniak, A. Warunki hydrotermiczne w centralnej części rejonu kanału Wieprz-Krzna w 50-leciu (1966–2015). *Ann. UMCS Sect. E Agric.* **2016**, *LXXI*, 1–12.
31. Elakhdar, A.; Slaski, J.; Kubo, T.; Hamwieh, A.; Hernandez-Ramirez, G.; Beattie, A.D.; Capo-Chichi, L.J.A. Genome—Wide association analysis provides insights into the genetic basis of photosynthetic responses to low-temperature stress in spring barley. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*, 1159016. [[CrossRef](#)]
32. Watanabe, N.; Naruse, J.; Austin, B.; Morgan, C.L. Variation in thylakoid proteins and photosynthesis in Syrian landraces of barley. *Euphytica* **1995**, *82*, 213–220. [[CrossRef](#)]
33. Oukarroum, A.; El Madidi, S.; Schansker, G.; Strasser, R.J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environ. Exp. Bot.* **2007**, *60*, 438–446. [[CrossRef](#)]
34. Hasanuzzaman, M.; Shabala, L.; Brodribb, T.J.; Zhou, M.; Shabala, S. Understanding the Role of Physiological and Agronomical Traits during Drought Recovery as a Determinant of Differential Drought Stress Tolerance in Barley. *Agronomy* **2022**, *12*, 2136. [[CrossRef](#)]
35. Arab, M.M.; Askari, H.; Aliniaefard, S.; Mokhtassi-Bidgoli, A.; Estaji, A.; Sadat-Hosseini, M.; Sohrabi, S.S.; Mesgaran, M.B.; Leslie, C.A.; Brown, P.J.; et al. Natural variation in photosynthesis and water use efficiency of locally adapted Persian walnut populations under drought stress and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* **2023**, *201*, 107859. [[CrossRef](#)]
36. Eliş, S.; Yıldırım, M. Yield and quality changes in barley genotypes during high temperature stress caused by late sowing. *Rom. Agric. Res.* **2023**, *40*, 139–150. [[CrossRef](#)]
37. Alqudah, A.M.; Schnurbusch, T. Barley Leaf Area and Leaf Growth Rates Are Maximized during the Pre-Anthesis Phase. *Agronomy* **2015**, *5*, 107–129. [[CrossRef](#)]
38. Jia, Q.; Wang, Y.-P. Relationships between Leaf Area Index and Evapotranspiration and Crop Coefficient of Hilly Apple Orchard in the Loess Plateau. *Water* **2021**, *13*, 1957. [[CrossRef](#)]
39. Liu, X.-J.; Qiang, C.; Yuan, Z.-F.; Xia, L.; Wang, X.-L.; Tian, Y.-C.; Cao, W.-X.; Yan, Z. Leaf area index based nitrogen diagnosis in irrigated lowland rice. *J. Integr. Agric.* **2018**, *17*, 111–121. [[CrossRef](#)]
40. Wu, K.; Wang, S.; Song, W.; Zhang, J.; Wang, Y.; Liu, Q.; Yu, J.; Ye, Y.; Li, S.; Chen, J.; et al. Enhanced sustainable green revolution yield via nitrogen-responsive chromatin modulation in rice. *Science* **2020**, *367*, eaaz2046. [[CrossRef](#)]
41. Moregan, J.A.; LeCain, D.R.; Wells, R. Semi-dwarfing genes concentrate photosynthetic machinery and affect leaf gas exchange of wheat. *Crop Sci.* **1990**, *30*, 602–608. [[CrossRef](#)]
42. Ukozehasi, C.; Ober, E.S.; Griffiths, H. The Other Mechanisms by Which the Rht Genes Improve the Harvest Index of Wheat. *Plants* **2022**, *11*, 2837. [[CrossRef](#)]
43. Youssefian, S.; Kirby, E.J.M.; Gale, M.D. Pleiotropic effects of the GA insensitive Rht dwarfing genes in wheat. II. Effects on leaf, stem, ear, and floret growth. *Field Crops Res.* **1992**, *28*, 191–210. [[CrossRef](#)]
44. Yasseen, B.T.; Al-Maamari, B.K.S. Further Evaluation of the Resistance of Black Barley to Water Stress: Preliminary Assessment for Selecting Drought Resistant Barley. *J. Agron. Crop Sci.* **1995**, *174*, 9–19. [[CrossRef](#)]
45. Szczepanek, M.; Lemańczyk, G.; Nowak, R.; Graczyk, R. Response of Indian Dwarf Wheat and Persian Wheat to Sowing Density and Hydrothermal Conditions of the Growing Seasons. *Agriculture* **2022**, *12*, 205. [[CrossRef](#)]
46. Pecio, A.; Wach, D. Grain yield and yield components of spring barley genotypes as the indicators of their tolerance to temporal drought stress. *Pol. J. Agron.* **2015**, *21*, 19–27.

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

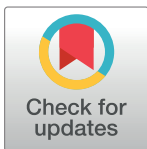
## RESEARCH ARTICLE

# Profile of phenolic compounds and antioxidant activity of organically and conventionally grown black-grain barley genotypes treated with biostimulant

Rafał Nowak<sup>1\*</sup>, Małgorzata Szczepanek<sup>1</sup>, Joanna Kobus-Cisowska<sup>2</sup>, Kinga Stuper-Szablewska<sup>3</sup>, Marcin Dziedziński<sup>2</sup>, Karolina Błaszczuk<sup>1</sup>

**1** Department of Agronomics, Faculty of Agriculture and Biotechnology, Bydgoszcz University of Science and Technology, Bydgoszcz, Poland, **2** Department of Gastronomy Sciences and Functional Foods, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland, **3** Department of Chemistry, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland

\* rafnow003@pbs.edu.pl



## OPEN ACCESS

**Citation:** Nowak R, Szczepanek M, Kobus-Cisowska J, Stuper-Szablewska K, Dziedziński M, Błaszczuk K (2023) Profile of phenolic compounds and antioxidant activity of organically and conventionally grown black-grain barley genotypes treated with biostimulant. PLoS ONE 18(7): e0288428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428>

**Editor:** Umakanta Sarker, Bangabandhu Sheikh Mujibur Rahman Agricultural University, BANGLADESH

**Received:** February 1, 2023

**Accepted:** June 27, 2023

**Published:** July 12, 2023

**Copyright:** © 2023 Nowak et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

**Funding:** The author(s) did not receive any specific funding for this work.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Beneficial dietary and pro-health values, have resulted in the increasing consumption importance of barley. Therefore, genotypes and cultivation methods are sought that guarantee high functional value of grain. The aim of the study was to assess the content of phenolic acids, flavonoids, chlorophylls, anthocyanidins, phytomelanin and antioxidant activity of grain of three barley genotypes depending on agricultural technology. Two of them are primary genotypes with dark grain pigmentation *Hordeum vulgare* L. var *nigricans* and *H. vulgare* L. var. *rimpai*, the third is a modern cultivar 'Soldo' *H. vulgare* with yellow grain, which is the control sample. Evaluated the effect of foliar application of a amino-acids biostimulant on the functional properties of grain under the conditions of organically and conventionally cultivations. The results indicated a higher antioxidant activity and the concentration of phenolic acids, flavonoids and phytomelanin in the black-grain genotypes. Organic cultivation and application of amino acids had increased the content of phenolic compounds in grain. The antioxidant activity was correlated with the content of syringic acid, naringenin, quercetin, luteolin and phytomelanin. Organically cultivation and the foliar application of an amino acid biostimulant improved the functional properties of barley grain, in particular the original, black-grained genotypes.

## Introduction

The genus barley (*Hordeum* spp.) belonging to the tribe *Triticeae* includes more than 30 species found in temperate climate as well as dry and low-fertile regions of the world. The most economically important species of this genus is common barley (*Hordeum vulgare*). It is the fourth crop after wheat, rice and maize in terms of economic importance. It is used for fodder purposes, in the brewing industry and in human nutrition [1]. In recent years, the

consumption importance of barley has increased due to its health-promoting properties. The high dietary values of barley grain result, among other things, from the content of bioactive substances with antioxidant properties, mainly phenolic compounds such as phenolic acids, flavonols or anthocyanins [2]. Antioxidants reduce oxidative stress by scavenging free radicals, thanks to which they have a protective effect on the body cells and reduce the risk of neurodegenerative diseases, e.g. Alzheimer's and Parkinson's and heart diseases. Antioxidants also protect the cells of organisms from the harmful effects of heavy metals by chelating them [3]. Antioxidants also have a protective effect on the plant itself, limiting the effects of abiotic and biotic stress [4]. For example, they reduce the infestation of barley by pathogenic fungi and can reduce the amount of mycotoxins produced by pathogens [5]. The concentration of antioxidants in the green parts of plants, as well as in the cereal grain itself, depends on environmental and genetic factors as well as cultivation technology [6]. Some primary or close to primary barley genotypes show high antioxidant potential, especially those with black-colored grains [7]. Barley grain can be yellow, purple, blue or black. The first three colors result from the content of flavonoids, while the black color is caused by phytomelanins which are formed from oxidized and polymerized phenolic compounds [8]. It can therefore be assumed that the black-colored seed of the primary barley genotypes: *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn and *H. vulgare* L. var. *rimpaii* Wittm. can be a valuable raw material for the production of functional food.

According to Baker et al. [9], breeding and development of high-quality barley, especially useful for cultivation in an organic farming system, is very important for expanding the markets and increasing the potential of barley cultivation. In the conditions of organic cultivation, there is a high exposure of plants to stress factors, which increases the production of bioactive compounds [10]. Many researchers have also proven the effect of the application of amino acid biostimulants on the increase in the content of phenolic compounds in plants, for example in soybean seeds [11, 12], pepper fruits [13] and lettuce leaves [14]. Phenolic compounds are formed in the phenylpropanoid pathway from amino acids [15]. However, the literature lacks studies on the effect of use of amino acid biostimulants on the content and composition of bioactive compounds, including phenolic compounds, in barley grain. There are also no studies on the impact of this factor on the quality characteristics of barley grain grown in organic and conventional farming systems.

Previous research on the genotypes of black-coloured barley has generally focused on the influence of genetic factors on the quality characteristics of the grain [8]. However, the impact of agrotechnical factors such as the management system and the application of biostimulants on the bioactive compound content of the grain was not considered. As suggested by the literature [7, 8, 16] it can be considered that these genotypes, due to their potentially high health value, may show great suitability for organic cultivation.

The aim of this study was to determine the differences in the profile of phenolic compounds and the antioxidant potential of barley between the primary black-grain genotypes of barley and the modern yellow-grain cultivar. The study was also to show whether the use of a biostimulant consisting of free amino acids would affect the content of phenolic compounds and the antioxidant potential of barley grain under the conditions of organic and conventional farming systems.

This research will expand the knowledge about the impact of the farming system and the application of amino acid biostimulant on the quality characteristics of barley grain. The response of the original *Hordeum vulgare* L. genotypes to agrotechnical factors will also be recognized, in the context of the quality characteristics of the grain.

## Material and methods

### Plant materials

The research material consisted of dark colored grain of two primary barley genotypes *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn and *H. vulgare* L. var. *rimpaii* Wittm and yellow grain of the modern cultivar 'Soldo' of common barley (*H. vulgare* L.) (Fig 1). The first two genotypes are spring forms of common barley, belonging to the subspecies of two-row barley—ssp. *distichon*. They form hulled grains, dark brown to black in color, set on a loose and drooping spike (var. *nutans*). *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn forms the awned spike, while *H. vulgare* L. var. *rimpaii* Wittm has awns transformed into hoods—beardless barley (var. *trifurcatum* or *furcatum*). The cultivar 'Soldo', treated in the study as the control for the two previous genotypes, is one of the very popular cultivars of spring, two-rowed barley in Europe. Its breeder is Saaten Union. It belongs to hulled cultivars, it is recommended for cultivation for consumption or fodder purposes. It is characterized by high and stable yields in conditions of high and medium level of agricultural technology. It is characterized by medium tillering and high thousand grain weight. It is a cultivar with high resistance to the most important diseases [17]. It shows also suitability for cultivation in an organic system.

### Field experiments

The grain of three tested barley genotypes subjected to analyses came from strict field experiments, established in a randomized sub-blocks design (split-plot) in 3 replicates, in which the response of barley to the foliar application of an amino acid biostimulant Naturamin WSP (Daymsa, Spain) was assessed. The main plots consisted of barley genotypes: i) *H. vulgare* L. var. *rimpaii* Wittm, ii) *H. v. L. var. nigricans* (Ser.) Körn, iii) 'Soldo' *H. vulgare*, and the sub-plots were biostimulant treatments: i) control without application, ii) a foliar application of amino acid biostimulant twice a season. The plot area in the conventional system was 24 m<sup>2</sup> (16 m x 1.5 m) and in the organic system the plot was 13.47 m<sup>2</sup> (7.7 m x 1.75 m). A 40 cm gap was applied between the plots to avoid contamination of the control objects with biostimulant. Applied biostimulant contained 12.8% of total nitrogen in organic form and about 80% of free amino acids, including about 8% Asp, 12% Glu, 15% Ser, 8% Gly, 1% His, 6% Arg, 5% Thr, 5% Ala, 13% Pro, 0.5% Tyr, 6% Val, 0.5% Met, 3% Ile, 8% Leu, 6% Phe, 2% Lys, 1% Cys. The biostimulant was applied twice during the growing season (the first application at stem elongation stage (BBCH 32) and the second at the beginning of ear emergence (BBCH 53), in rates of 0.5 kg/ha each, in the form of a 0.17% final concentration of the applied solution. The working



**Fig 1.** Grains of the barley genotypes evaluated in the research—(a) *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn, (b) *Hordeum vulgare* 'Soldo', (c) *H. vulgare* L. var. *rimpaii* Wittm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428.g001>

liquid was sprayed manually, using a plots backpack sprayer with pressure regulator. Field experiments were conducted in 2021, in a conventional and organic systems, in the central part of Poland. Conventional experiments were located in Minikowo (53° 10' 02" N, 17° 44' 22" E), in soil with pH 4.7 and the following content of absorbable forms of nutrients: 7.1 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g of soil, 17.1 mg K<sub>2</sub>O/100 g of soil, 4.5 mg MgO/100 g of soil. The experiment in the organic system was located in Luchowo (53° 15' 40" N, 17° 16' 26" E), in soil with pH 7.7 and the content of 23.7 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g of soil, 19.7 mg K<sub>2</sub>O/100 g of soil, 4.2 mg MgO/100 g of soil. The soil under the experiment was characterized by a very low mineral nitrogen content. In the conventional system, the soil contains 25.0 kg N<sub>min</sub>/ha in a layer 0–30 cm, while in the organic system it is 23.8 kg N<sub>min</sub>/ha in a layer 0–30 cm. Barley sowing in the conventional system was made between the 21st and 31st of March, and in the organic system between the 1st and 10th of April. The sowing density in both experiments was 350 grains/m<sup>2</sup> and the row spacing was 12.5 cm. No cultivation practices were performed in the organic system during growth (except for the biostimulant application in selected combinations). The conventional system, however, involved the use of typical barley cultivation technology with mineral fertilization and chemical protection. The seed was treated with triticonazole and prochloraz seed dressing in a dose of 4 g and 12 g a.i./100 kg of grain. Pre-sowing fertilization included: N- 70 kg/ha; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-40 kg/ha; K<sub>2</sub>O- 70 kg/ha. At the stem elongation stage, a mixture of 2,4-D, florasulam and pinoxaden (180 + 3.75 + 40 g a.i./ha) was applied to protect against weeds. Protection against fungal diseases included two treatments—at the first nodule stage (BBCH 31) thiophanate-methyl (700 g a.i./ha) and at the flag leaf sheath thickening (BBCH 41–49) prothioconazole and tebuconazole (125 + 125 g a.i./ha). At the flag leaf stage, cypermethrin (25 g a.i./ha) was used to control the cereal leaf beetle. Harvest was made between the 21st and 31st July, at the full maturity stage, with grain moisture below 14%.

### Determination of chlorophylls

Grain chlorophyll content was determined using the method describe earlier [18]. Chlorophyll extracts were obtained from ground grains (5 g), which were triturated with a mixture of ethanolic solution (70%). Then, after separation of the plant tissue by filtration and centrifugation, the separation of chlorophylls from the remaining dyes was carried out on solid-phase extraction (SPE) columns. The extract prepared in this way was concentrated in a vacuum evaporator at 35°C, dissolved in 1 ml of methanol (Merck) and subjected to chromatographic analysis. Chlorophyll a and chlorophyll b were determined using Acquity UPLC (Waters, USA) with a Waters Acquity PDA detector (Waters, USA). Chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC® BEH C18 column (100 mm x 2.1 mm, particle size 1.7 µm) (Waters, Ireland). Elution was carried out using solvent A—methanol and water B. A gradient (mixture of acetonitrile 0.2% (v/v) HCOOH in H<sub>2</sub>O) was used as the eluting phase was used at a flow of 0.4 ml/min. The column and samples were thermostated, the column temperature was 30°C, the test temperature was 10°C. During the analysis, the solutions were degassed in the Waters apparatus. The compounds were identified based on spectra ranging from 200 to 600 nm and retention times compared to standards.

### Determination of anthocyanidins

Grain anthocyanidins content was determined using the method describe earlier [19]. Anthocyanidin extracts were obtained from ground seeds (5 g) which were triturated with a mixture of ethanolic solution (70%) and acetone (1:1). Then, after separation of the plant tissue by filtration and centrifugation, anthocyanidins were separated from the remaining dyes on SPE columns. The extract prepared in this way was concentrated in a vacuum evaporator at 35°C,

dissolved in 1 ml of methanol (Merck) and subjected to chromatographic analysis. The following compounds were analysed: delphinidin, luteolinidin, malvidin, peonidine, petunidin, rosinidin, aurantinidin, cyanidin. Anthocyanidins were determined using Acquity UPLC (Waters, USA) with a Waters Acquity PDA detector (Waters, USA). Chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC® BEH C18 column (150 mm x 2.5 mm, particle size 1.8 µm) (Waters, Ireland). Elution was carried out using solvent A—methanol, water B and acetonitrile C. A mixture of acetonitrile 0.2% (v/v) HCOOH in H<sub>2</sub>O (gradient) was used as the eluting phase. A gradient was used at a flow of 0.4 ml/min. The column and samples were thermostated, the column temperature was 30°C, the test temperature was 10°C. During the analysis, the solutions were degassed in the Waters apparatus. The compounds were identified on the basis of spectra in the range of 200 to 600 nm. and retention times compared to standards.

### Phytomelanin analysis

The analysis of phytomelanin content was carried out based on the analytical protocol proposed by Merck (<https://www.sigmaaldrich.com>), with own modification. Phytomelanin extracts were obtained from ground seeds (5 g), which were triturated with a water solution of ethyl alcohol (60%). Then, after separation of the plant tissue by filtration and centrifugation, the separation of phytomelanin from the remaining dyes was carried out on SPE columns. The extract prepared in this way was concentrated in a vacuum evaporator at 35°C, dissolved in 1 ml of methanol (Merck) and subjected to chromatographic analysis. Phytomelanin was determined using Acquity UPLC (Waters, USA) with a Waters Acquity PDA detector (Waters, USA). Chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC® BEH C18 column (250 mm x 2.5 mm, particle size 1.5 µm) (Waters, Ireland). Elution was carried out using solvent A—methanol, water B and acetonitrile C. A gradient was used at a flow of 0.4 ml/min. The compound was identified by retention times compared to standards.

### Antiradical capacity

Free radical scavenging using ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) stable radical was performed according to a modification of the improved ABTS<sup>+</sup> method described by Zhou et al. [20]. The spectrophotometric assay was performed in 96-well plates. Extract (10 µl) or ethanol (10 µl, control) was added to 195 µl of the ABTS<sup>+</sup> radical solution and left for 30 min until a stable absorbance reading was obtained. The decrease in absorbance at 734 nm was measured relative to the blank test (ethanol).

### Determination of phenolic acids

Contents of 10 phenolic acids: gallic acid (GA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA), 4-dihydroxybenzoic acid (p-HBA), protocatechuic acid (PCA), syringic acid (SYA), p-coumaric acid (p-CA), chlorogenic acid (CGA), caffeic acid (CA), synapic acid (SA), ferulic acid (FA), were determined as described by Stuper-Szablewska et al. [21]. Ground grain samples of 0.2 g were subjected to alkaline hydrolysis in 4 mL of 2M aqueous sodium hydroxide solution, followed by acid hydrolysis in 2 mL of 6M aqueous hydrochloric acid solution. Phenolic acids were extracted from the inorganic phase with diethyl ether (2 x 2ml). Acid hydrolysis was then carried out on the ether extracts in 3 mL of 6M aqueous hydrochloric acid solution. The resulting ether extracts were evaporated to dryness in a stream of nitrogen and then dissolved in 1ml of methanol. Chromatographic analysis was performed using a Waters SDS 501 (Waters, Milford, MA, USA) high-performance liquid chromatograph with a Waters 486 Tunable Absorbance Detector (Waters, Milford, MA, USA). Chromatographic separation was performed on an RP C-18, 250 x 4 mm x 5 µm column. A mixture of acetonitrile 0.2% (v/v) HCOOH in H<sub>2</sub>O



(gradient) was used as the eluting phase. Measurement was performed at wavelength  $\lambda = 320$  and 280 nm. Identification of the compounds consisted of comparing the retention time of the tested peak with that of the standard (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland). Analysed only bound fraction of phenolic acids.

### Determination of flavonoids

Composition of flavonoids was determined using a method described by [22]. The extracted flavonoids were separated and identified by an Agilent UPLC equipped with a Nova-Pak C18 reversed-phase column ( $3.9 \times 150$  mm, 5- $\mu$ m particle size; both from Waters, Milford, MA, USA). Solvent A used was 0.3% (v/v) HCOOH in H<sub>2</sub>O, while solvent B used was acetonitrile of HPLC purity grade. The flow rate of the solvents was maintained at 1 mL/min. The gradient profile was as follows: 85% of A at 0 min and 25% of A at 40 min. The mobile phase of the gradient elution was as follows: A, acetonitrile with 0.1% formic acid; and B, 1% aqueous formic acid mixture (pH = 2). Chromatograms were recorded using a UV-Vis detector at  $\lambda = 370$  nm. The separated compounds were identified based on retention time mapping using a set of standards. The quantity of the following flavonoids was determined using standard solutions (0.001–0.01  $\mu$ g/mL) of individual compounds (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland). Was determined of seven flavonoids: naringenin, vitaxin, rutin, quercetin, apigenin, kaempferol and lutein.

### Statistical analysis

The results were subjected to multivariate ANOVA statistical analysis, according to a fixed model with three experimental errors appropriate for the split-block system. Differences between means were compared using Tuckey's HSD test at  $p = 0.05$ . Pearson's simple correlation analysis was also performed. Hierarchical cluster analysis and principal component analysis (PCA) were also performed. All calculations were performed using the statistical package Statistica PL 13.0 (StatSoft, Cracow, Poland).

## Results

### Composition of phenolic acids

Among the phenolic acids identified in the analysed grain, ferulic acid was dominant. Syringic, caffeic and 2,5-hydroxybenzoic acids were present in significantly lower amounts, while sinapic and 4-hydroxybenzoic acids were the least present (Tables 1 and 2).

*H. v. rimpaui* grain was characterized by the highest content of 2,5-hydroxybenzoic, protocatechuic, syringic, caffeic, sinapic and ferulic acids among the tested genotypes. *H. v. nigricans*, compared to *H. v. rimpaui*, contained statistically significantly less of these phenolic acids (by 19.3%, 18.3%, 19.9%, 37.5%, 61.2% and 12.3%, respectively). Genotypes with black coloured grain contained nearly twice as much 2,5-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, caffeic acid and ferulic acid, and more than eight times as much syringic acid than *H. vulgare* 'Soldo' (Tables 1 and 2). On the other hand, the modern cultivar of barley contained significantly more gallic and chlorogenic acids.

The content of the analysed phenolic acids (with the exception of 4-dihydroxybenzoic acid) was significantly higher in grain from the organic cultivation system compared to the conventional one (Tables 1 and 2). The highest increase in the content of phenolic acids in organic grain was recorded for syringic, ferulic and protocatechuic acids, by 32.2%, 50.6% and 116.1%, respectively. However, the response to the farming system varied according to the genotype. The cultivar 'Soldo' accumulated significantly more ferulic acid in grain under organic

**Table 1. Content of phenolic acids—derivatives of hydroxybenzoic acid in barley grain.**

Farming System (FS)	Genotype (G)	Treatment (T)	GA mg/kg	2,5-DHBA mg/kg	p-HBA mg/kg	PCA mg/kg	SYA mg/kg
Con	<i>H. v. nigricans</i>	B	10.2 <sup>d</sup> ± 0.58	40.1 <sup>cd</sup> ± 1.50	15.4 <sup>a-c</sup> ± 0.82	18.4 <sup>cd</sup> ± 2.16	51.3 <sup>b</sup> ± 0.88
		C	12.9 <sup>d</sup> ± 0.12	44.5 <sup>b-d</sup> ± 2.63	15.3 <sup>a-c</sup> ± 0.70	5.9 <sup>ef</sup> ± 0.61	49.4 <sup>b</sup> ± 1.04
	<i>H. v. rimpaii</i>	B	18.7 <sup>c</sup> ± 0.36	65.1 <sup>a</sup> ± 3.09	18.2 <sup>a</sup> ± 1.94	16.2 <sup>c-e</sup> ± 1.83	64.4 <sup>ab</sup> ± 11.38
		C	12.3 <sup>d</sup> ± 0.93	46.0 <sup>b-d</sup> ± 1.72	11.7 <sup>bc</sup> ± 1.68	21.3 <sup>bc</sup> ± 1.02	60.4 <sup>ab</sup> ± 1.05
	<i>H. v. 'Soldo'</i>	B	26.2 <sup>ab</sup> ± 0.95	31.5 <sup>de</sup> ± 0.99	15.4 <sup>a-c</sup> ± 1.33	5.3 <sup>f</sup> ± 0.46	6.6 <sup>c</sup> ± 0.40
		C	16.7 <sup>c</sup> ± 1.47	20.5 <sup>c</sup> ± 1.03	10.9 <sup>c</sup> ± 0.34	3.6 <sup>f</sup> ± 0.39	5.8 <sup>c</sup> ± 0.53
Org	<i>H. v. nigricans</i>	B	18.1 <sup>c</sup> ± 0.23	46.4 <sup>a-d</sup> ± 0.73	16.1 <sup>ab</sup> ± 0.25	31.2 <sup>ab</sup> ± 0.36	54.4 <sup>b</sup> ± 2.07
		C	18.9 <sup>c</sup> ± 0.76	51.6 <sup>a-c</sup> ± 2.17	16.6 <sup>ab</sup> ± 0.66	34.0 <sup>a</sup> ± 1.41	58.9 <sup>ab</sup> ± 1.88
	<i>H. v. rimpaii</i>	B	26.4 <sup>ab</sup> ± 1.53	61.4 <sup>ab</sup> ± 15.01	18.3 <sup>a</sup> ± 3.88	38.1 <sup>a</sup> ± 11.88	76.1 <sup>a</sup> ± 16.98
		C	16.9 <sup>c</sup> ± 2.50	53.9 <sup>a-c</sup> ± 2.97	14.2 <sup>a-c</sup> ± 2.87	34.0 <sup>a</sup> ± 0.60	66.4 <sup>ab</sup> ± 4.74
	<i>H. v. 'Soldo'</i>	B	29.6 <sup>a</sup> ± 1.53	38.0 <sup>de</sup> ± 2.71	15.5 <sup>a-c</sup> ± 1.34	7.4 <sup>ef</sup> ± 0.95	8.9 <sup>c</sup> ± 0.95
		C	23.34 <sup>b</sup> ± 1.64	31.1 <sup>de</sup> ± 11.60	16.3 <sup>ab</sup> ± 2.67	8.0 <sup>d-f</sup> ± 1.03	6.8 <sup>c</sup> ± 1.37
Con			16.2 <sup>b</sup> ± 5.52	41.3 <sup>b</sup> ± 14.22	14.5 <sup>a</sup> ± 2.76	11.8 <sup>b</sup> ± 7.31	39.6 <sup>b</sup> ± 25.21
Org			22.2 <sup>a</sup> ± 4.96	47.1 <sup>a</sup> ± 12.36	16.2 <sup>a</sup> ± 2.34	25.4 <sup>a</sup> ± 13.71	45.2 <sup>a</sup> ± 28.76
	<i>H. v. nigricans</i>		15.0 <sup>c</sup> ± 3.81	45.7 <sup>b</sup> ± 4.60	15.8 <sup>a</sup> ± 0.78	22.4 <sup>b</sup> ± 11.74	53.5 <sup>b</sup> ± 4.00
	<i>H. v. rimpaii</i>		18.6 <sup>b</sup> ± 5.50	56.6 <sup>a</sup> ± 10.20	15.6 <sup>a</sup> ± 3.73	27.4 <sup>a</sup> ± 10.70	66.8 <sup>a</sup> ± 10.80
	<i>H. v. 'Soldo'</i>		24.0 <sup>a</sup> ± 5.12	30.3 <sup>c</sup> ± 8.30	14.5 <sup>a</sup> ± 2.62	6.1 <sup>c</sup> ± 1.93	7.0 <sup>c</sup> ± 1.42
		B	22.0 <sup>a</sup> ± 6.07	47.1 <sup>a</sup> ± 13.75	16.5 <sup>a</sup> ± 2.12	19.4 <sup>a</sup> ± 12.91	43.6 <sup>a</sup> ± 28.24
		C	16.4 <sup>b</sup> ± 4.59	41.3 <sup>b</sup> ± 12.87	14.2 <sup>b</sup> ± 2.70	17.8 <sup>a</sup> ± 13.13	41.3 <sup>a</sup> ± 26.05
p-value	FS		0.0003	0.0009	0.1185	0.0001	0.0581
	G		0.0000	0.0000	0.2145	0.0000	0.0000
	T		0.0000	0.0046	0.0008	0.0061	0.2136
	FS x G x T		0.0106	0.4458	0.2177	0.0001	0.4565

FS—farming system, G—genotype, T—treatment, GA—gallic acid, 2,5-DHBA— 2,5-dihydroxybenzoic acid, p-HBA—4-dihydroxybenzoic acid, PCA—protocatechuic acid, SYA—syringic acid, Org/Con—two farming systems (Org—organic farming, Con—conventional farming), B/C—two biostimulant treatments (B—Biostimulant, C—control); a-f—mean values in column with common letters are not significantly different (ANOVA at the significance level  $p = 0.05$ ); data = mean ± SD (standard deviation).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428.t001>

cultivation conditions, while *H. v. nigricans* and *H. v. rimpaii* accumulated more protocatechuic acid in comparison to conventional cultivation (Tables 1 and 2).

The content of phenolic acids in the grain was also influenced by the foliar application of a biostimulant based on amino acids during the barley growing period (Tables 1 and 2). On average, for the studied genotypes, grain after biostimulant application contained significantly more gallic, 2,5-hydroxybenzoic, 4-hydroxybenzoic, chlorogenic, caffeic and ferulic acids (by 32.4%, 14.2%, 16.3%, 28.0%, 24.7% and 39.8%, respectively) compared to the control sample. The response to the biostimulant was different in barley genotypes. Both in the organic and conventional cultivation systems, the use of the biostimulant resulted in an increase in the concentration of gallic acid in the cultivar 'Soldo', and of caffeic and ferulic acid in the primary genotypes of barley (*H. v. nigricans* and *H. v. rimpaii*). The biostimulant had a beneficial effect on the concentration of sinapic acid in the grain of *H. v. nigricans* only in conventional cultivation, while *H. v. rimpaii* in organic cultivation.

### Composition of flavonoids

The dominant flavonoids in grains of *H. v. nigricans* and *H. v. rimpaii* were naringenin, quercetin, apigenin, kaempferol and luteolin. Among the flavonoids determined in grains of *H. v. 'Soldo'*, the most abundant was vitexin (Table 3). The tested genotypes were similar only in terms of rutin content. The grain of *H. v. rimpaii* compared to *H. v. nigricans* was

Table 2. Content of phenolic acids—derivatives of hydroxycinnamic acid in barley grain.

FS	G	T	p-CA mg/kg	CGA mg/kg	CA mg/kg	SA mg/kg	FA mg/kg
Con	<i>H. v. nigricans</i>	B	26.5 <sup>a</sup> ± 0.69	14.8 <sup>cd</sup> ± 0.36	61.1 <sup>c</sup> ± 0.83	7.00 <sup>b-d</sup> ± 0.61	889 <sup>c</sup> ± 38.2
		C	21.4 <sup>a</sup> ± 0.94	13.1 <sup>cd</sup> ± 0.86	15.7 <sup>c</sup> ± 0.84	1.96 <sup>f</sup> ± 0.55	677 <sup>d</sup> ± 24.4
	<i>H. v. rimpaui</i>	B	30.3 <sup>a</sup> ± 1.02	17.4 <sup>bc</sup> ± 3.71	123 <sup>a</sup> ± 3.17	7.72 <sup>b-f</sup> ± 1.52	1010 <sup>bc</sup> ± 1.5
		C	29.6 <sup>a</sup> ± 0.64	15.3 <sup>cd</sup> ± 2.43	11.5 <sup>e</sup> ± 0.91	13.7 <sup>b</sup> ± 1.67	555 <sup>de</sup> ± 59.6
	<i>H. v. 'Soldo'</i>	B	32.1 <sup>a</sup> ± 5.71	23.7 <sup>ab</sup> ± 3.07	31.1 <sup>d</sup> ± 2.97	2.16 <sup>f</sup> ± 0.36	392 <sup>f</sup> ± 3.7
		C	25.5 <sup>a</sup> ± 0.84	10.3 <sup>d</sup> ± 0.94	31.0 <sup>d</sup> ± 5.67	12.4 <sup>b-d</sup> ± 1.08	415 <sup>ef</sup> ± 6.6
Org	<i>H. v. nigricans</i>	B	29.4 <sup>a</sup> ± 0.32	15.8 <sup>cd</sup> ± 0.26	74.6 <sup>b</sup> ± 5.86	5.46 <sup>ef</sup> ± 0.46	1146 <sup>b</sup> ± 80.6
		C	31.1 <sup>a</sup> ± 1.32	16.3 <sup>cd</sup> ± 0.64	18.7 <sup>c</sup> ± 0.75	4.63 <sup>ef</sup> ± 0.42	948 <sup>c</sup> ± 23.7
	<i>H. v. rimpaui</i>	B	35.3 <sup>a</sup> ± 11.5	17.9 <sup>bc</sup> ± 3.84	121 <sup>a</sup> ± 4.19	21.1 <sup>a</sup> ± 3.19	1686 <sup>a</sup> ± 27.3
		C	31.6 <sup>a</sup> ± 0.68	13.9 <sup>cd</sup> ± 2.92	16.6 <sup>e</sup> ± 2.54	6.59 <sup>d-f</sup> ± 4.54	922 <sup>c</sup> ± 74.6
	<i>H. v. 'Soldo'</i>	B	34.6 <sup>a</sup> ± 3.40	30.0 <sup>a</sup> ± 0.68	38.3 <sup>d</sup> ± 0.84	9.29 <sup>b-c</sup> ± 0.94	633 <sup>d</sup> ± 37.1
		C	37.1 <sup>a</sup> ± 12.3	24.5 <sup>a</sup> ± 1.05	35.6 <sup>d</sup> ± 1.08	12.8 <sup>bc</sup> ± 1.40	599 <sup>d</sup> ± 72.8
Con			27.6 <sup>b</sup> ± 4.21	15.7 <sup>b</sup> ± 4.68	45.6 <sup>b</sup> ± 39.2	7.49 <sup>b</sup> ± 4.72	657 <sup>b</sup> ± 239
Org			33.3 <sup>a</sup> ± 6.48	19.7 <sup>a</sup> ± 6.08	50.8 <sup>a</sup> ± 37.9	9.98 <sup>a</sup> ± 6.19	989 <sup>a</sup> ± 378
	<i>H. v. nigricans</i>		27.3 <sup>b</sup> ± 4.14	14.98 <sup>b</sup> ± 1.38	42.5 <sup>b</sup> ± 27.0	4.77 <sup>c</sup> ± 1.97	915 <sup>b</sup> ± 179
	<i>H. v. rimpaui</i>		31.8 <sup>a</sup> ± 5.44	16.09 <sup>b</sup> ± 3.26	68.1 <sup>a</sup> ± 56.5	12.3 <sup>a</sup> ± 6.55	1043 <sup>a</sup> ± 429
	<i>H. v. 'Soldo'</i>		32.3 <sup>a</sup> ± 7.46	22.11 <sup>a</sup> ± 7.71	34.0 <sup>c</sup> ± 4.3	9.15 <sup>b</sup> ± 4.56	510 <sup>c</sup> ± 117
		B	31.4 <sup>a</sup> ± 5.54	19.91 <sup>a</sup> ± 5.88	74.8 <sup>a</sup> ± 37.4	8.80 <sup>a</sup> ± 6.26	959 <sup>a</sup> ± 422
		C	29.5 <sup>a</sup> ± 6.66	15.55 <sup>b</sup> ± 4.76	21.5 <sup>b</sup> ± 9.22	8.67 <sup>a</sup> ± 4.96	686 <sup>b</sup> ± 202
p-value	FS		0.0008	0.0147	0.0068	0.0009	0.0000
	G		0.0916	0.0014	0.0197	0.0000	0.0000
	T		0.1285	0.0000	0.0000	0.9219	0.0000
	FS x G x T		0.3222	0.0037	0.0151	0.0001	0.0085

FS—farming system, G—genotype, T—treatment, p-CA—p-coumaric acid, CGA—chlorogenic acid, CA—caffeic acid, SA—synaptic acid, FA—ferulic acid, *H. v. nigricans* / *H. v. rimpaui* / *H. v. 'Soldo'*—three genotypes of barley, Org—organic farming, Con—conventional farming, B—biostimulant, C—control; a-f—mean values in column with common letters are not significantly different (ANOVA at the significance level  $p = 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428.t002>

characterized by a significantly higher concentration of naringenin, vitexin and apigenin (by 37.6%, 38.5%, 52.1%, respectively) and significantly lower concentration of quercetin and kaempferol (by 13.2% and 9%, respectively).

On average for genotypes, grains from the organic system contained significantly more naringenin by 20.7%, quercetin by 35.3%, apigenin by 84.4%, kaempferol by 129%, luteolin by 134% and vitexin by 256.8% compared to the conventional system. However, different genotypes responded differently to farming systems. In the modern cultivar 'Soldo', the organic cultivation system favoured the concentration of vitexin, in *H. v. nigricans*, apigenin and luteolin, and in the genotype of *H. v. rimpaui*, kaempferol (Table 3).

The application of the biostimulant, on average for the tested genotypes, significantly increased the content of most flavonoids (luteolin by 13.5%, apigenin by about 15.3%, vitexin by 20.2%, kaempferol by 23.2% and naringenin by 25.1%) (Table 3). The response, however, differed by genotype and farming system. *H. v. nigricans* in organic cultivation did not show any response with the flavonoid content to the biostimulant application, while in the conventional system the application of the preparation significantly increased the content of kaempferol. In contrast, the *H. vulgare* cultivar 'Soldo' showed a positive response with flavonoid concentration (vitexin and kaempferol) to a biostimulant only in organic cultivation. *H. v. rimpaui* showed the strongest response to the biostimulant. In the conventional system, it caused an increase in the concentration of naringenin (by 39.6%), vitexin (2.5 times), apigenin (2.7 times) and luteolin (1.9 times), and in the organic system, only naringenin (by 30.7%).

Table 3. Content of flavonoids in barley grain.

FS	G	T	NGN mg/kg	VIT mg/kg	RU mg/kg	QU mg/kg	API mg/kg	KPF mg/kg	LU mg/kg
Con	<i>H. v. nigricans</i>	B	175.4 <sup>de</sup> ±6.16	2.8 <sup>f</sup> ±0.92	19.2 <sup>a</sup> ±0.68	145.9 <sup>b-d</sup> ±7.6	14.7 <sup>d-ef</sup> ±2.1	37.0 <sup>cd</sup> ±1.3	31.9 <sup>cd</sup> ±1.4
		C	159.7 <sup>e</sup> ±8.6	4.6 <sup>ef</sup> ±0.44	16.8 <sup>a</sup> ±0.47	122.3 <sup>d</sup> ±2.6	30.4 <sup>c</sup> ±1.0	17.6 <sup>ef</sup> ±1.3	29.5 <sup>cd</sup> ±1.0
	<i>H. v. rimpai</i>	B	270.5 <sup>ab</sup> ±23.7	16.4 <sup>bc</sup> ±3.95	16.5 <sup>a</sup> ±6.06	124.6 <sup>d</sup> ±3.5	77.6 <sup>a</sup> ±1.6	15.5 <sup>ef</sup> ±0.6	33.7 <sup>c</sup> ±2.9
		C	193.8 <sup>c-e</sup> ±8.8	6.7 <sup>ef</sup> ±0.30	16.2 <sup>a</sup> ±1.01	126.4 <sup>d</sup> ±9.5	28.8 <sup>cd</sup> ±1.4	7.2 <sup>f</sup> ±1.2	17.4 <sup>de</sup> ±0.8
	<i>H. v. 'Soldo'</i>	B	28.4 <sup>f</sup> ±1.2	13.3 <sup>cd</sup> ±0.80	22.0 <sup>a</sup> ±1.56	28.2 <sup>e</sup> ±3.4	3.5 <sup>f</sup> ±0.3	18.0 <sup>ef</sup> ±1.7	1.8 <sup>ef</sup> ±0.1
		C	14.9 <sup>f</sup> ±2.2	10.0 <sup>de</sup> ±0.80	15.6 <sup>a</sup> ±2.20	15.7 <sup>e</sup> ±3.9	5.2 <sup>ef</sup> ±1.1	24.1 <sup>de</sup> ±3.0	1.1 <sup>f</sup> ±0.03
Org	<i>H. v. nigricans</i>	B	209.6 <sup>cd</sup> ±9.0	17.0 <sup>bc</sup> ±0.24	17.9 <sup>a</sup> ±0.23	181.1 <sup>a-c</sup> ±4.3	55.5 <sup>b</sup> ±1.0	47.5 <sup>bc</sup> ±0.8	55.8 <sup>b</sup> ±1.0
		C	183.6 <sup>de</sup> ±4.4	17.6 <sup>bc</sup> ±0.70	18.7 <sup>a</sup> ±0.75	206.7 <sup>a</sup> ±8.9	62.0 <sup>ab</sup> ±2.6	52.8 <sup>ab</sup> ±2.2	62.4 <sup>ab</sup> ±2.6
	<i>H. v. rimpai</i>	B	304.5 <sup>a</sup> ±18.8	19.7 <sup>b</sup> ±4.03	17.8 <sup>a</sup> ±9.17	133.2 <sup>cd</sup> ±24.6	75.3 <sup>a</sup> ±16.9	63.1 <sup>a</sup> ±15.2	75.8 <sup>a</sup> ±16.9
		C	232.9 <sup>bc</sup> ±28.7	15.4 <sup>b-d</sup> ±2.71	16.6 <sup>a</sup> ±2.53	185.2 <sup>ab</sup> ±49.2	65.7 <sup>ab</sup> ±4.6	55.3 <sup>ab</sup> ±3.2	66.1 <sup>ab</sup> ±4.7
	<i>H. v. 'Soldo'</i>	B	45.3 <sup>f</sup> ±3.5	67.0 <sup>a</sup> ±1.61	23.3 <sup>a</sup> ±1.80	32.9 <sup>e</sup> ±1.4	17.5 <sup>c-f</sup> ±1.6	36.4 <sup>cd</sup> ±1.6	5.8 <sup>ef</sup> ±1.0
		C	41.5 <sup>f</sup> ±12.5	55.8 <sup>b</sup> ±3.31	20.9 <sup>a</sup> ±8.05	22.6 <sup>e</sup> ±9.2	19.4 <sup>c-e</sup> ±1.2	19.4 <sup>ef</sup> ±3.4	4.1 <sup>ef</sup> ±0.8
Con			140.4 <sup>b</sup> ±94.1	9.0 <sup>b</sup> ±5.14	17.7 <sup>a</sup> ±3.26	93.8 <sup>b</sup> ±53.3	26.7 <sup>b</sup> ±25.8	19.9 <sup>b</sup> ±9.5	19.2 <sup>b</sup> ±14.1
Org			169.6 <sup>a</sup> ±100.1	32.1 <sup>a</sup> ±21.73	19.2 <sup>a</sup> ±4.90	127.0 <sup>a</sup> ±78.1	49.2 <sup>a</sup> ±24.0	45.8 <sup>a</sup> ±15.7	45.0 <sup>a</sup> ±30.4
		<i>H. v. nigricans</i>	182.1 <sup>b</sup> ±19.8	10.5 <sup>c</sup> ±7.14	18.2 <sup>a</sup> ±1.05	164.0 <sup>a</sup> ±34.2	40.7 <sup>b</sup> ±20.0	38.8 <sup>a</sup> ±14.1	44.9 <sup>a</sup> ±15.1
	<i>H. v. rimpai</i>		250.4 <sup>a</sup> ±46.9	14.6 <sup>b</sup> ±5.69	16.8 <sup>a</sup> ±4.87	142.3 <sup>b</sup> ±35.3	61.9 <sup>a</sup> ±21.8	35.3 <sup>b</sup> ±26.2	48.3 <sup>a</sup> ±25.9
	<i>H. v. 'Soldo'</i>		32.5 <sup>c</sup> ±13.7	36.5 <sup>a</sup> ±26.38	20.5 <sup>a</sup> ±4.80	24.9 <sup>c</sup> ±8.4	11.4 <sup>c</sup> ±7.5	24.5 <sup>c</sup> ±7.9	3.2 <sup>b</sup> ±2.0
		B	172.3 <sup>a</sup> ±108.0	22.7 <sup>a</sup> ±21.22	19.4 <sup>a</sup> ±4.60	107.6 <sup>a</sup> ±59.7	40.7 <sup>a</sup> ±31.4	36.3 <sup>a</sup> ±17.68	34.15 <sup>a</sup> ±27.4
		C	137.7 <sup>b</sup> ±83.9	18.4 <sup>b</sup> ±17.90	17.5 <sup>a</sup> ±3.55	113.2 <sup>a</sup> ±77.1	35.3 <sup>b</sup> ±22.6	29.4 <sup>b</sup> ±18.80	30.10 <sup>b</sup> ±26.7
p-value	FS		0.0021	0.0000	0.2128	0.0041	0.0004	0.0001	0.0000
	G		0.0000	0.0000	0.2242	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000
	T		0.0000	0.0056	0.1791	0.7777	0.0466	0.0000	0.0001
	FS x G x T		0.4897	0.0029	0.7446	0.3001	0.0018	0.0000	0.0422

FS—farming system, G—genotype, T—treatment, NGN—naringenin, VIT—vitaxin, RU—rutin, QU—quercetin, API—apigenin, KPF—kaempferol, LU—luteolin, *H. v. nigricans* / *H. v. rimpai* / *H. v. 'Soldo'*—three genotypes of barley, Org—organic farming, Con—conventional farming, B—biostimulant, C—control; a–f—mean values in column with common letters are not significantly different (ANOVA at the significance level  $p = 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428.t003>

## Plant pigments

Chlorophyll a and chlorophyll b (Table 4) were present only in the grains of black-grained cultivars, and their concentration was significantly higher in the *H. v. nigricans* genotype. Organic farming had a positive effect on the average concentration of chlorophyll b and a negative effect on the content of chlorophyll a. The biostimulant application significantly increased the content of chlorophyll b while reducing the content of chlorophyll a in grains.

As in the case of chlorophylls, anthocyanin pigments (delphinidin, luteolinidin) were detected only in grains of primary genotypes (Table 4). Both the use of the biostimulant and cultivation in the organic system significantly increased the content of delphinidine in grain. The biostimulant, however, limited the content of luteolinidine in grain.

As in the case of chlorophylls, phytomelanin (Table 4) was found in significant amounts in black grains (*H. v. nigricans* and *H. v. rimpai*). The modern cultivar 'Soldo', with yellow grain, generally did not contain phytomelanin. Its trace amounts were detected only in grains of this cultivar from conventional cultivation. On average, for the tested genotypes, grain from the organic system contained significantly more phytomelanin (by 16%) than that from the conventional system. The application of an amino acid biostimulant also had a very strong effect on the concentration of this compound in grains. There was 3.8 times more phytomelanin in grain from plants treated with the biostimulant than in the control.

**Table 4. Content of plant colour substances in grain and antioxidant activity (ABTS<sup>+</sup>) of barley.**

FS	G	T	Chl a	Chl b	Dph	Lut	PhM	ABTS <sup>+</sup>
			mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%
Con	<i>H. v. nigricans</i>	B	0.65 <sup>d</sup> ± 0.04	0.08 <sup>b</sup> ± 0.01	1.17 <sup>de</sup> ± 0.02	0.26 <sup>cd</sup> ± 0.02	149.6 <sup>b</sup> ± 5.82	90.1 <sup>a</sup> ± 0.49
		C	2.87 <sup>a</sup> ± 0.07	0.00 <sup>c</sup>	1.26 <sup>c-e</sup> ± 0.02	0.52 <sup>b</sup> ± 0.02	34.7 <sup>d</sup> ± 4.19	87.3 <sup>a</sup> ± 2.54
	<i>H. v. rimpai</i>	B	0.82 <sup>d</sup> ± 0.05	0.06 <sup>b</sup> ± 0.01	1.72 <sup>b</sup> ± 0.05	0.17 <sup>d</sup> ± 0.02	129.0 <sup>c</sup> ± 4.12	79.4 <sup>a</sup> ± 11.52
		C	2.14 <sup>c</sup> ± 0.03	0.00 <sup>c</sup> ± 0.00	1.07 <sup>e</sup> ± 0.03	0.16 <sup>d</sup> ± 0.02	46.0 <sup>d</sup> ± 3.18	86.9 <sup>a</sup> ± 1.92
	<i>H. v. 'Soldo'</i>	B	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	61.4 <sup>a</sup> ± 2.77
		C	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	72.7 <sup>a</sup> ± 5.21
Org	<i>H. v. nigricans</i>	B	0.56 <sup>d</sup> ± 0.09	0.12 <sup>a</sup> ± 0.02	1.37 <sup>cd</sup> ± 0.10	0.22 <sup>cd</sup> ± 0.02	171.9 <sup>a</sup> ± 5.76	87.8 <sup>a</sup> ± 1.75
		C	2.66 <sup>ab</sup> ± 0.48	0.00 <sup>c</sup> ± 0.00	1.39 <sup>cd</sup> ± 0.20	0.64 <sup>a</sup> ± 0.04	40.7 <sup>d</sup> ± 7.01	86.7 <sup>a</sup> ± 6.68
	<i>H. v. rimpai</i>	B	0.47 <sup>de</sup> ± 0.03	0.11 <sup>a</sup> ± 0.02	2.27 <sup>a</sup> ± 0.18	0.28 <sup>c</sup> ± 0.08	163.5 <sup>a</sup> ± 3.32	89.8 <sup>a</sup> ± 0.73
		C	2.19 <sup>bc</sup> ± 0.14	0.00 <sup>c</sup> ± 0.00	1.48 <sup>bc</sup> ± 0.16	0.26 <sup>cd</sup> ± 0.08	39.7 <sup>d</sup> ± 2.46	90.6 <sup>a</sup> ± 0.37
	<i>H. v. 'Soldo'</i>	B	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>e</sup>	1.2 <sup>e</sup> ± 0.10	58.3 <sup>a</sup> ± 13.00
		C	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	75.8 <sup>a</sup> ± 4.16
Con			1.08 <sup>a</sup> ± 1.10	0.02 <sup>b</sup> ± 0.03	0.87 <sup>b</sup> ± 0.67	0.18 <sup>b</sup> ± 0.18	59.9 <sup>b</sup> ± 60.7	79.6 <sup>a</sup> ± 11.30
Org			0.98 <sup>b</sup> ± 1.10	0.04 <sup>a</sup> ± 0.06	1.08 <sup>a</sup> ± 0.87	0.23 <sup>a</sup> ± 0.22	69.5 <sup>a</sup> ± 73.5	81.5 <sup>a</sup> ± 12.92
	<i>H. v. nigricans</i>		1.68 <sup>a</sup> ± 1.15	0.05 <sup>a</sup> ± 0.06	1.30 <sup>b</sup> ± 0.13	0.41 <sup>a</sup> ± 0.18	99.2 <sup>a</sup> ± 65.0	88.0 <sup>a</sup> ± 3.43
	<i>H. v. rimpai</i>		1.40 <sup>b</sup> ± 0.81	0.04 <sup>b</sup> ± 0.05	1.63 <sup>a</sup> ± 0.46	0.22 <sup>b</sup> ± 0.07	94.5 <sup>a</sup> ± 55.6	86.7 <sup>a</sup> ± 6.80
	<i>H. v. 'Soldo'</i>		0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.3 <sup>b</sup> ± 0.54	67.0 <sup>b</sup> ± 9.98
		B	0.42 <sup>b</sup> ± 0.32	0.06 <sup>a</sup> ± 0.05	1.09 <sup>a</sup> ± 0.87	0.15 <sup>b</sup> ± 0.12	102.5 <sup>a</sup> ± 75.5	77.8 <sup>b</sup> ± 14.90
		C	1.64 <sup>a</sup> ± 1.23	0.00 <sup>b</sup> ± 0.00	0.87 <sup>b</sup> ± 0.65	0.26 <sup>a</sup> ± 0.25	26.8 <sup>b</sup> ± 20.1	83.3 <sup>a</sup> ± 7.62
p-value	FS		0.0031	0.0002	0.0060	0.0214	0.0040	0.5234
	G		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	T		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0172
	FS x G x T		0.0121	0.0013	0.1968	0.1704	0.0193	0.4378

FS—farming system, G—genotype, T—treatment, Chl a—chlorophyll a, Chl b—chlorophyll b, Dph—delphinidine, Lut—luteolinidine, PhM—phytomelanin, *H. v. nigricans* / *H. v. rimpai* / *H. v. 'Soldo'*—three genotypes of barley, Org—organic farming, Con—conventional farming, B—biostimulant, C—control; a-f—mean values in column with common letters are not significantly different (ANOVA at the significance level  $p = 0.05$ ).

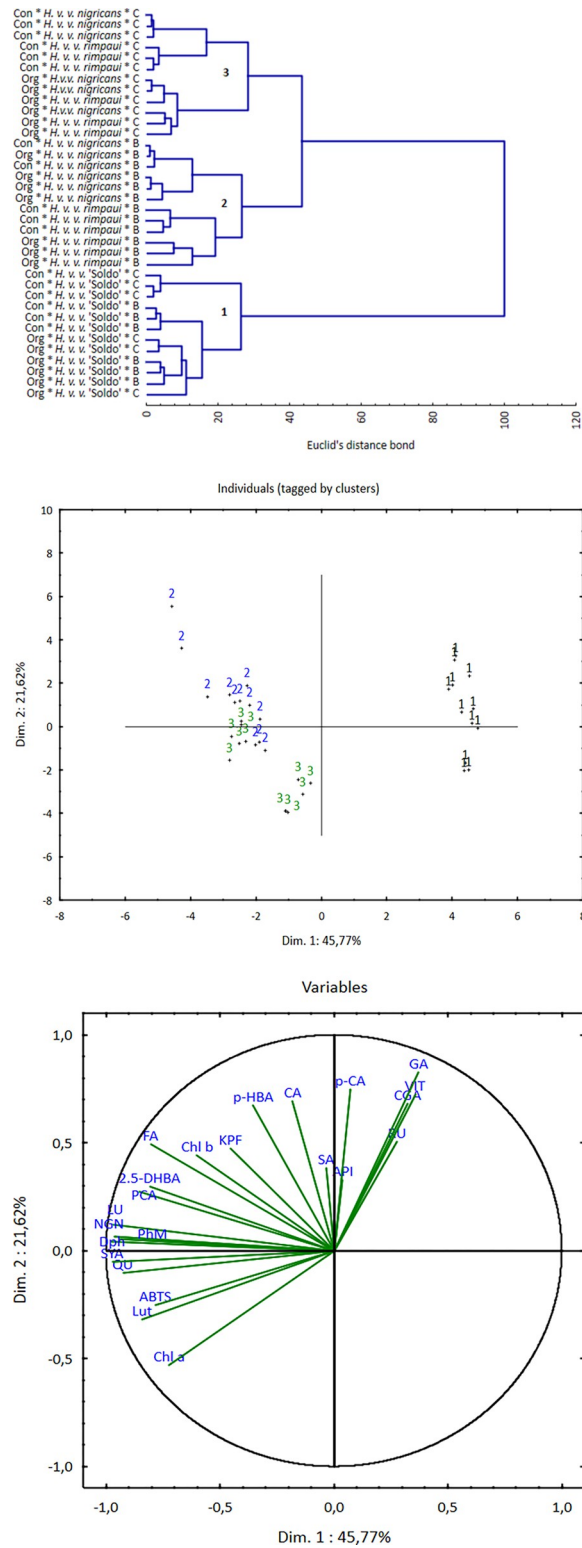
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428.t004>

ABTS<sup>+</sup> antioxidant activity was significantly differentiated depending on barley genotype. The highest ABTS<sup>+</sup> value was found in black-grained forms, which had about 20 percentage points higher potential for free radical removal than the modern yellow-grained cultivar (Table 4).

### Multivariate analysis

The hierarchical cluster analysis performed divided the analysed cases into 3 clusters (Fig 2A). All combinations with *H. vulgare* 'Soldo' were classified in cluster 1. Cluster 2 was composed of combinations that included *H. v. nigricans* and *H. v. rimpai* treated with the biostimulant. In cluster 3, there were combinations with black-grained genotypes not subjected to biostimulation.

In the analysis of principal components, two components were indicated, describing a total of 67.4% of the variance (Fig 2C). The graphs show the relationships between these components and cases grouped by clusters and qualitative variables. Lines corresponding to positively correlated variables point in the same direction, while lines corresponding to negatively correlated variables point in opposite directions. The length of the lines indicates the effect on the respective components (Fig 2B). The strongest effect on the components was exerted by naringenin, quercetin, lutein, delphinidin, syringic acid, phytomelanin, ferulic acid and gallic acid.



**Fig 2.** (a) Euclidean distance projection of the tested *H. vulgare* L. genotype, (b) principal scatter diagram of the tested parameters, and (c) principal scatter diagram of trials tagged by clusters.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428.g002>

	CA	SYA	2,5-DHBA	FA	NGN	VIT	QU	LU	PhM	ABTS <sup>+</sup>
CA		0.0793	0.2486	0.5782*	0.2256	0.2134	-0.0264	0.157	0.3824*	-0.0571
SYA	0.0793		0.8418*	0.7220*	0.9621*	-0.3739*	0.9020*	0.9241*	0.9011*	0.7593*
2,5-DHBA	0.2486	0.8418*		0.7032*	0.8754*	-0.0091	0.7096*	0.8178*	0.7372*	0.4397*
FA	0.5782*	0.7220*	0.7032*		0.7967*	0.0598	0.6200*	0.8259*	0.7834*	0.5171*
NGN	0.2256	0.9621*	0.8754*	0.7967*		-0.277	0.8467*	0.9170*	0.9245*	0.6961*
VIT	0.2134	-0.3739*	-0.0091	0.0598	-0.277		-0.3504*	-0.1838	-0.4148*	-0.4619*
QU	-0.0264	0.9020*	0.7096*	0.6200*	0.8467*	-0.3504*		0.9242*	0.8390*	0.7120*
LU	0.157	0.9241*	0.8178*	0.8259*	0.9170*	-0.1838	0.9242*		0.8606*	0.7054*
PhM	0.3823*	0.9011*	0.7372*	0.7834*	0.9245*	-0.4148*	0.8390*	0.8606*		0.6959*
ABTS <sup>+</sup>	-0.0571	0.7593*	0.4397*	0.5171*	0.6961*	-0.4619*	0.7120*	0.7054*	0.6958*	

Red - positive relation, blue-negative relation between compared factors. The color intensity indicates strength of correlation.  
Significant effects:  $p < 0.05$  (\*)

**Fig 3. Correlation matrix of phenolic compounds and ABTS<sup>+</sup>.** Red—positive relation, blue-negative relation between compared factors. The color intensity indicates strength of correlation. Significant effects:  $p < 0.05$  (\*).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428.g003>

Qualitative variables clearly formed two negatively correlated groups with strong, internal dependencies. The first group consisted of gallic acid (GA), chlorogenic acid (CGA), vitexin (VIT) and rutin (RU), while the second group consisted of naringenin (NGN), lutein (LU), quercetin (QU), syringic acid (SYA), phytomelanin (PhM) and delphinidin (Dph). The scatterplot of the cases on the plane of two principal components indicates that the content of GA, CGA, and VIT is related to cluster 1 describing *H. vulgare* 'Soldo'. A higher content of NGN, LU, QU, SYA, PhM and Dph was found in cases from clusters 2 and 3 describing black-grained genotypes subjected and not subjected to the application of the amino acid biostimulant. The biostimulant application (cluster 2) resulted in an increased share of phenolic acids (FA, PCA, p-HBA, 2,5-DHBA, CA), kaempferol and chlorophyll b in the grain of primary genotypes.

Pearson's simple correlation analysis (Fig 3) showed a very strong correlation with a high coefficient of determination between syringic acid and the most important flavonoids—naringenin ( $r = 0.9621$ ;  $r^2 = 0.9257$ ), quercetin ( $r = 0.9020$ ;  $r^2 = 0.8136$ ) and luteolin ( $r = 0.9241$ ;  $r^2 = 0.8539$ ). Also, the content of phytomelanin strongly depended on syringic acid and naringenin. ABTS<sup>+</sup> showed the strongest correlation with the content of syringic acid, naringenin, quercetin, luteolin and phytomelanin.

## Discussion

The grain of the tested barley genotypes contained the most phenolic acids derived from hydroxycinnamic acid, in particular ferulic acid. Similarly, other researchers [23, 24] indicate the highest share of ferulic acid in the composition of phenolic acids in barley grains. The synthesis and accumulation of phytochemical compositions in plant tissues are influenced by genotype, growing environment and their interaction [25]. In studies by Jin et al. [26] barley genotypes with black grains were characterized by a significantly higher concentration of total phenolic compounds and the total phenolic acids compared to genotypes with yellow grain. Similarly, in the present study, the profile of phenolic acids depended on the genotype of barley. Gallic and chlorogenic acids were the most abundant in the yellow grains of *H. vulgare* cultivar 'Soldo'. Compared to this cultivar, the black-coloured grain of the primary genotypes (*H. v. nigricans* and *H. v. rimpaui*) contained from a few to dozen times more phenolic acids, such

as 2,5-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, ferulic acid and syringic acid. The concentration of flavonoids was also related to the genotype. The grain of the primary genotypes contained more flavonoids, mainly naringenin and quercetin, than the modern yellow barley cultivar. According to Glagoleva et al. [27] the metabolic pathways responsible for the black colour of the grains result from the presence of the Blp gene, which affects the increased synthesis of phenolic compounds (ferulic acid in particular), which, in turn, create black pigmentation of the grains through the oxidation process.

In the present research, apart from genetic factors, the concentration of phenolic acids and flavonoids was also affected by agrotechnical factors. The obtained results clearly indicate the beneficial effect of the organic farming system on the content of phenolic acids in grain. In grains of primary genotypes, the concentration of protocatechuic acid increased, while the *H. vulgare* 'Soldo' responded with an increase in the content of ferulic acid. When analysing the impact of the tested farming systems, attention should also be paid to the differences in the content of available phosphorus and soil reaction in both locations of field experiments. Under conventional farming system, low P content and acidity were observed, while in the organic system the soil was characterized by high P content and alkaline soil reaction. According to many researchers [28–31], the content of phenolic compounds in plants is negatively correlated with the pH of the soil. The acidic reaction of the soil creates a stressful environment for plants, which in turn stimulates the synthesis of phenolic compounds in plants. According to Wright et al. [32] and Abbas et al. [33], the P content in the soil does not affect the concentration of phenolic compounds in plants. In turn, Wang et al. [34] and Corte-Baptistella et al. [35] reported reduced accumulation of phenolic compounds under high phosphorus availability. These studies would therefore indicate that the soil conditions under conventional farming are more favourable to synthesising phenolic compounds than under organic. Nevertheless, significantly higher content of these metabolites were observed under organic farming system, which may further indicate a beneficial effect of such cultivation methods on the phenolic content. Maver et al. [36], by examining the concentration of secondary metabolites in barley roots proved that phosphorus deficiency results in an increased accumulation of phenylpropanoids, including flavonoids. Differing strategies in soil nutrient management cause soil conditions in organic and conventional farming systems to differ from each other, as indicated by Mader et al. [37], Stockdale et al. [38] and Montgomery and Bikle [39]. These authors unanimously report that the soil in the organic farming system contains significantly more organic matter and microorganisms compared to conventional system, which affects the sorption capacity as well as the transformation and availability of soil nutrients. According to Mader [37] soil with an organic farming system is characterized by a higher activity of dehydrogenase, protease and phosphatase, which accelerates the decomposition of protein and organic phosphorus in the soil, thus affecting the availability of these components for plants. The varied availability of soil nutrients, which differs between the farming systems compared, may therefore be one of the components affecting the content of secondary metabolites in barley grains. In a study by Ostrowska-Kołodziejczak et al. [40], the grain of a cereal mixture of oats, wheat and barley grown in an organic system contained significantly more phenolic acids, in particular ferulic and p-coumaric acids. Effect of organic farming on the content of phenolic compounds in agricultural products became the subject of a meta-analysis conducted by Barański et al. [41]. These authors, based on 343 peer-reviewed publications, indicated that the concentration of phenolic acids in food from organic farming is 19% higher compared to the conventional system. Higher concentrations of phenolic compounds in organic crops may be the result of increased biotic and abiotic stress occurring in such a farming system, as many phenolic compounds are accumulated by plants in response to stress conditions. Phenolic compounds, including flavonoids, play important biochemical and physiological roles in plant



cells, particularly helping to alleviate environmental stress [25]. Expression of the HvPAL gene, which encodes the phenylalanine ammonia lyase enzyme, was increased in salt-tolerant barley, while it was decreased in salt-stress-sensitive barley [42]. According to Przybylska-Balcerek et al. [43], ferulic acid has antioxidant, antibacterial and antifungal properties, and this effect is increased as a result of the synergy of combining this acid with sinapic and gallic acids and some flavonoids. However, there is no unequivocal evidence of the relationship between the pressure of pests and the concentration of polyphenols in crops from organic farming. On the other hand, there is an increasing number of reports proving that the differences in fertilization systems, especially nitrogen fertilization, between the organic and conventional farming systems are an important factor influencing the concentration of phenolic compounds in organic crops [41]. Also, in the present study, there were significant differences in the method of fertilization between the compared cultivation systems. In conventional production, a rate of 60 kg N/ha was applied in the form of ammonium nitrate, while in organic cultivation, no fertilizers, even organic ones, were used before barley cultivation. This resulted in visible signs of nitrogen deficiency during the growing season. Potentially, this could have contributed to the increase in differences in the concentration of phenolic compounds between the farming systems compared. Under conditions of prolonged nitrogen deficiency, there is a significant increase in the activity of L-phenylalanine ammonia lyase (PAL), the enzyme responsible for the catalysis of the reaction of ammonia elimination from aromatic amino acids (phenylalanine and tyrosine) in the phenylpropanoid pathway, leading to the formation of cinnamic acid which is a substrate in the biosynthesis of many phenolic compounds [44].

In the present study, the application of a biostimulant based on amino acids during the barley growing period had a positive effect on the content of phenolic acids and flavonoids in the harvested grain, with the primary genotypes with black grain, especially *H. v. rimpai* responding most often. In studies of other species, foliar application of the amino acid phenylalanine increased the activity of L-phenylalanine ammonia lyase PAL and the content of ferulic acid in pea plants [45]. The pathway of phenylpropanoid metabolism and the variety of factors inducing their synthesis in plants is regulated by the expression of multigene families encoding enzymes participating in this pathway—phenylalanine ammonia lyase (PAL) and chalcone synthase (CHS). Various biotic and abiotic factors acting on plants affect the level of transcription of genes encoding enzymes of the phenylpropanoid synthesis pathway [46]. According to Ma et al. [47], varied genotypes of barley under the influence of stress show changes in the level of accumulation of proteins involved in secondary metabolism—mainly phenylalanine ammonia lyase (PAL), isoflavone reductase and caffeic acid *O*-methyltransferase, the enzyme responsible for converting caffeic acid into ferulic acid. Amino acids, in turn, are characterized by high mobility and easy transport in plants. Thanks to this and their biological activity they affect the synthesis of protein substances in plants, which also translates into increased enzyme activity and the production of phenolic compounds [48].

Chlorophyll pigments and anthocyanins were determined only in black-coloured grains (*H. v. nigricans* and *H. v. rimpai*). Dark grains also contained significant amounts of phytomelanin. In addition to genetic factors, agricultural factors also had an impact on the content of this compound. Grain from organic farming contained 16% more of this compound compared to the conventional system. However, the foliar application of an amino acid biostimulant had a much stronger effect on the content of phytomelanin, which increased the content of this compound in *H. v. nigricans* and *H. v. rimpai* grains several times. Phytomelanin is a biopolymer with dark pigmentation, which is widespread among living organisms and gives them a dark colour [8]. Phytomelanins are synthesized by enzymatic oxidation of simple phenolic precursors such as tyrosine, cinnamic acid and cinnamic acid derivatives [49]. Phytomelanin biosynthesis is controlled by the Blp1 gene located in the 0.8 Mb locus on chromosome

1H [27]. The examined agricultural factors affected the content of phytomelanin in a similar way as the concentration of phenolic acids, which seems to confirm the reports on the synthesis of this compound from cinnamic acid derivatives. This claim is also supported by a high correlation coefficient between the content of phytomelanin and the concentration of phenolic acids and flavonoids.

The ABTS<sup>+</sup> antioxidant activity significantly depended on the genetic factor. The black grain genotypes were characterized by a higher ability to scavenge free radicals than the *H. v.* 'Soldo', which resulted from a much higher concentration of bioactive compounds. A strong positive correlation between the ABTS<sup>+</sup> antioxidant activity and the concentration of syringic acid, naringenin, quercetin, luteolin and phytomelanin was demonstrated. According to other researchers [49], hydroxycinnamic acids are characterized by higher antioxidant activity than hydroxybenzoic acids. According to Chen et al. [50], in addition to the basic structure, the power of scavenging free radicals by individual phenolic acids is also affected by their structure, specifically the presence of hydroxyl and methoxy groups. In a study by Chen et al. [50], dihydroxy acids (caffeic and protocatechuic acids) had higher antioxidant activity than other phenolic acids, except for the acids with the largest number of methoxyl groups (sinapic and syringic acids). According to these authors, in the group of benzoic acid derivatives, the free radical scavenging capacity of syringic acid is tens of thousands of times greater than that of 4-hydroxybenzoic acid. These reports explain the strong correlation between syringic acid and antioxidant activity observed in the present study. Among the phenolic acids found in grains, syringic and caffeic acids are compounds with the highest ability to scavenge free radicals. Only sinapic acid has greater potential, but it was present in grains in an amount several times lower than syringic and caffeic acids. Its particularly high concentration was determined in grains of black-grained genotypes. The grain of these genotypes also contained much more other acids with a strong antioxidant effect (caffeic and protocatechuic acids) than *H. v.* 'Soldo'. In the present study, the correlation analysis also showed a strong relationship between the ABTS<sup>+</sup> antioxidant activity and the content of flavonoids (naringenin, quercetin and luteolin) in grains. Flavonoids are characterized by high antioxidant potential, which results from their chemical structure [51]. Quercetin and luteolin can be indicated as the strongest antioxidants among the compounds detected in the tested barley grains. In a study by Chen et al. [52] on coloured rice cultivars, antioxidant activity was strongly correlated with naringenin content.

As for phenolic acids and flavonoids, the present study also showed a strong positive relationship between ABTS<sup>+</sup> and the content of phytomelanin. However, the literature lacks information on the antioxidant properties of this compound. Correlation analysis and principal component analysis (PCA) also showed a relationship between the content of phytomelanin and the contents of syringic acid, quercetin, naringenin and luteolin. It is also known that phytomelanin is formed from oxidized phenolic compounds [49]. It can therefore be assumed that the correlation between the phytomelanin content and the antioxidant activity was related to the concentration and oxidation of the mentioned phenolic compounds. In studies by Yang et al. [26], dark-coloured barley genotypes were characterized by a higher antioxidant potential, which was associated with the content of phenolic compounds. Many authors obtained similar high correlation for antioxidant activity and phenolic compounds content in coloured barley genotypes [53–55]. These results therefore indicate that, apart from the total content of phenolic acids, the composition of phenolic compounds is also of great importance for the antioxidant activity of grain. The similarity of the two tested black-grained genotypes (*H. v. nigricans* and *H. v. rimpai*) and the difference of the modern yellow-grained cultivar in terms of the composition of bioactive compounds and antioxidant activity was also confirmed by the agglomeration cluster analysis. The biostimulant application was an equally strong factor differentiating the values of these variables.

## Conclusions

The analysis of the original genotypes of black grain barley (*H. v. rimpaii*, and *H. v. nigricans*) and the modern yellow grain cultivar (*H. v. 'Soldo'*) showed the effect of the studied factors: genotype, cultivation system (organic and conventional) and foliar application of the biostimulant on the profile of phenolic compounds and the antioxidant potential of grain. The highest content of most phenolic acids and flavonoids was found in the grain of *H. v. rimpaii*, followed by *H. v. nigricans*, and the lowest in *H. v. 'Soldo'*. The primary genotypes with black grain were the only ones that contained small amounts of anthocyanin and chlorophyll pigments, while they were distinguished by an extremely high concentration of phytomelanin. Cultivation of barley in an organic system as well as the application of the biostimulant generally had a positive effect on the content of phenolic compounds; however, the interaction of cultivation factors and barley genotype was significant in shaping the content of certain phenolic acids (gallic, protocatechuic, chlorogenic, caffeic, synaptic, and ferulic) and flavonoids (vitexin, apigenin, kaempferol, and luteolin). The strongest positive response with the concentration of phenolic compounds to the application of the biostimulant was shown in cultivars with black grain, mainly *H. v. rimpaii* in conventional cultivation. The biostimulant stimulated the synthesis of phytomelanins to the greatest extent in black-grain genotypes, cultivated both in a conventional and organic system. ABTS<sup>+</sup> antioxidant activity of grain of primary barley genotypes was higher than that of the modern cultivar. The ABTS<sup>+</sup> value was strongly correlated with the content of syringic acid, naringenin, quercetin, luteolin and phytomelanin, which confirms the strong antioxidant properties of these compounds.

## Supporting information

**S1 Appendix.** Comparison of chromatograms of phenolic acids for *H. v. 'Soldo'* (black line), *H. v. nigricans* (blue line) and *H. v. rimpaii* (green line): 1- gallic acid, 2-- 2,5-dihydroxobenzoic acid, 3-4-dihydroxobenzoic acid, 4—caffeic acid, 5- syringic acid, 6- p-coumaric acid, 7—ferulic acid, 8—protocatechic acid, 9—sinapic acid, 10—chlorogenic acid. (TIF)

**S1 Table.** Combined analysis of variance based on a fixed effect model for phenolic compounds and antiradical capacity in barley grain from organically and conventionally trials. (DOCX)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Rafał Nowak, Joanna Kobus-Cisowska.

**Data curation:** Rafał Nowak.

**Formal analysis:** Rafał Nowak.

**Funding acquisition:** Rafał Nowak, Małgorzata Szczepanek.

**Investigation:** Rafał Nowak, Kinga Stuper-Szablewska, Marcin Dziedziński, Karolina Błaszczuk.

**Methodology:** Rafał Nowak, Małgorzata Szczepanek, Joanna Kobus-Cisowska, Kinga Stuper-Szablewska.

**Project administration:** Rafał Nowak.

**Resources:** Rafał Nowak.

**Software:** Rafał Nowak.

**Supervision:** Rafał Nowak, Małgorzata Szczepanek.

**Validation:** Rafał Nowak.

**Visualization:** Rafał Nowak.

**Writing – original draft:** Rafał Nowak.

**Writing – review & editing:** Małgorzata Szczepanek, Joanna Kobus-Cisowska.

## References

1. El-Hashash EF., El-Absy KM. Barley (*Hordeum vulgare* L.) breeding. *Advances in Plant Breeding Strategies. Cereals*. 2019; 5, p. 1–45. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-23108-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23108-8_1)
2. Horvat D., Šimić G., Drezner G., Lalić A., Ledencan T., Tucak M., et al. Phenolic acid profiles and antioxidants activity of major cereal crops. *Antioxidants*. 2020; 9, 527. <https://doi.org/10.3390/antiox9060527>
3. Kaur R., Das S., Bansal S., Singh G., Sardar S., Dhar H., et al. Heavy metal stress in rice: Uptake, transport, signaling, and tolerance mechanisms. *Physiologia Plantarum*. 2021; 173(1), 430–448. <https://doi.org/10.1111/ppl.13491> PMID: 34227684
4. Lebudda M., Muszyńska E., Gietler M., Różańska E., Rybarczyk-Płońska A., Fidler J., et al. Efficient antioxidant defence systems of spring barley in response to stress induced jointly by the cyst nematode parasitism and cadmium exposure. *Plant Soil*. 2020 456, 189–206. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04713-y> PMID: 32952222
5. Choo TM., Vigier B., Savard ME., Blackwell B., Martin R., Wang JM., et al. Black Barley as a Means of Mitigating Deoxynivalenol Contamination. *Crop Science*. 2015; 55(3), 1096–1103. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.05.0405>
6. Zrckova M., Capouchova I., Eliášová M., Paznocht L., Pazderů K., Dvořák P., et al. The effect of genotype, weather conditions and cropping system on antioxidant activity and content of selected antioxidant compounds in wheat with coloured grain. *Plant Soil Environ*. 2018; 64, 530–538. <https://doi.org/10.17221/430/2018-PSE>.
7. Yang XJ., Dang B., Fan MT. Free and bound phenolic compound content and antioxidant activity of different cultivated blue highland barley varieties from the Qinghai-Tibet Plateau. *Molecules*. 2018; 23, 879. <https://doi.org/10.3390/molecules23040879> PMID: 29641469
8. Shoeva OY., Mursalimov S., Gracheva NV., Glagoleva AY., Börner A., Khlestkina EK. Melanin formation in barley grain occurs within plastids of pericarp and husk cells. *Scientific Reports*. 2020; 10(179). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56982-y> PMID: 31932698
9. Baker BP., Meints BM., Hayes PM. Organic barley producers' desired qualities for crop improvement. *Org. Agr*. 2020; 10(1), p. 35–42. <https://doi.org/10.1007/s13165-020-00299-y>
10. Asami DK., Hong YJ., Barrett DM., Mitchell AE. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J Agric Food Chem*. 2003; 51:1237–41. <https://doi.org/10.1021/jf020635c> PMID: 12590461
11. Kocira S., Szparaga A., Kocira A., Czerwińska E., Wójtowicz A., Bronowicka-Mielniczuk U., et al. Modeling Biometric Traits, Yield and Nutritional and Antioxidant Properties of Seeds of Three Soybean Cultivars Through the Application of Biostimulant Containing Seaweed and Amino Acids. *Front. Plant Sci. Sec. Plant Nutrition*. 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00388> PMID: 29636764
12. Kocira S. Effect of amino acid biostimulant on the yield and nutraceutical potential of soybean. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2019; 79(1), p 17–25. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000100017>
13. Ertani A., Pizzeghello D., Francioso O., Sambo P., Sanchez-Cortes S., Nardi S. Capsicum chinensis L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a longterm period: Chemical and metabolomic approaches. *Frontiers in Plant Science*. 2014; 5, 375. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00375> PMID: 25136346
14. Mpai S., Mokganya LM., Raphoko L., Masoko P., Ndhlala AR. Untargeted metabolites and chemometric approach to elucidate the response of growth and yield attributes on different concentrations of an amino acid based biostimulant in two lettuce cultivars. *Scientia Horticulturae*, 2022; 306. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111478>







15. McCarthy AL., O'Callaghan YC., Neugart S., Piggott CO., Connolly A., Jansen M., et al. The hydroxycinnamic acid content of barley and brewers' spent grain (BSG) and the potential to incorporate phenolic extracts of BSG as antioxidants into fruit beverages. *Food Chemistry*. 2013; 141, 2567–2574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.048> PMID: 23870996
16. Abdel-Aal EM., Choo TM, Dhillon S., Rabalski I. Free and Bound Phenolic Acids and Total Phenolics in Black, Blue, and Yellow Barley and Their Contribution to Free Radical Scavenging Capacity. *Cereal Chemistry*. 2012; 89(4), 198–204. <https://doi.org/10.1094/CHEM-10-11-0116>
17. Czembor E., Kaczmarek Z., Pilarczyk W., Mańkowski D., Czembor JH. Simulating Spring barley Yield under Moderate Input Management System in Poland. *Agriculture*. 2022; 12(8), 1091. <https://doi.org/10.3390/agriculture12081091>
18. Kurasiak-Popowska D., Stuper-Szablewska K. The phytochemical quality of *Camelina sativa* seed and oil. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*. 2020; Volume 70. <https://doi.org/10.1080/09064710.2019.1665706>
19. Badr AN., Gromadzka K., Shehata MG., Stuper-Szablewska K., Drzewiecka K., Abdel-Razek AG. Prospective antimycotoxigenic action of wild *Opuntia ficus-indica* by-products. *Czech Journal of Food Sciences*. 2020 38(5). <https://doi.org/10.17221/11/2020-CJFS>
20. Zhou J., Diao X., Wang T., Chen G., Lin Q., Yang X., et al. Phylogenetic diversity and antioxidant activities of culturable fungal endophytes associated with the mangrove species *Rhizophora stylosa* and *R. mucronata* in the South China Sea. *PLoS One*. 2018; 13(6), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197359> PMID: 29897911
21. Stuper-Szablewska K., Kurasiak-Popowska D., Nawracała J., Perkowski J. Quantitative profile of phenolic acids and antioxidant activity of wheat grain exposed to stress. *Eur. Food Res. Technol.* 2019; 245, 1595–1603. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03262-8>
22. Kobus Z., Pecyna A., Buczaj A., Krzywicka M., Przywara A., Nadulski R. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *cannabis sativa* L. leaves and inflorescences using response surface methodology. *Appl. Sci.* 2022; 12(13), 6747. <https://doi.org/10.3390/app12136747>
23. Cai S., Han Z., Huang Y., Chen ZH., Zhang G., Dai F. Genetic diversity of individual phenolic acids in barley and their correlation with barley malt quality. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63, 7051–7057. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02960> PMID: 26173650
24. Zhu Y., Li T., Fu X., Abbasi AM., Zheng B., Liu RH. Phenolics content, antioxidant and antiproliferative activities of dehulled highland barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Functional Foods*. 2015; 19, 439–450. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.053>
25. Kiani R., Arzani A., Maibody S.A.M.M. Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Activity Involved in Salt Tolerance in Wheat, *Aegilops cylindrica* and Their Amphidiploids. *Front. Plant Sci.* 2021; 12:646221. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.64622>
26. Jin HM., Bin D. Wen-Gang Z., Wan-Cai Z., Xi-Juan Y. Polyphenol and anthocyanin composition and activity of highland barley with different colors. *Molecules*. 2022; 27,(11): 3411. <https://doi.org/10.3390/molecules27113411> PMID: 35684349
27. Glagoleva A., Shmakov N., Shoeva O., Vasiliev G., Shatskaya N., Börner A., et al. Metabolic pathways and genes identified by RNA-seq analysis of barley near-isogenic lines differing by allelic state of the *Black lemma and pericarp* (Blp) gene. *BMC Plant Biology*. 2017; 17(Suppl 1):182. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1124-1> PMID: 29143606
28. Whitehead DC., Dibb H., Hartley RD. Extractant pH and the release of phenolic compounds from soils, plant roots and leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry*. 1981; 13: 343–348. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(81\)90074-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(81)90074-2)
29. Northup R.R., Dahlgren R.A., Yu Z. Intraspecific variation of conifer phenolic concentration on a marine terrace soil acidity gradient; a new interpretation. *Plant and Soil*. 1995; 171: 255–262. <https://doi.org/10.1007/BF00010279>
30. Johnson RM., Pregitzer KS. Concentration of sugars, phenolic acids, and amino acids in forest soils exposed to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>. *Soil Biology and Biochemistry*. 2007 39(12), 3159–3166. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.010>
31. Bai Y., Wang G., Cheng Y., Shi P., Yang C., Yang H., et al. Soil acidification in continuously cropped tobacco alters bacterial community structure and diversity via the accumulation of phenolic acids. *Sci Rep*. 2019; 9, 12499. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48611-5> PMID: 31467316
32. Wright DM., Jordan GJ., Lee WG., Duncan RP., Forsyth DM. Do leaves of plants on phosphorus-impo-erished soils contain high concentrations of phenolic defence compounds? *Functional Ecology*. 2010; 24, 52–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01597.x>

33. Abbas Z., Ahmad I., Shakeel A., Abdullah M., Islam M., Muhammad S., et al. Effect of phosphorus fertilizer and water stress on protein and phenolic contents in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Pakistan J. Agric. Res. 2015; 28(4), 263–268.
34. Corte Baptistella J., Llerena J., Domingues-Junior A., Fernie A., Favarin J., Mazzafera P. Differential responses of three *Urochloa* species to low P availability. Annals of Applied Biology. 2021; 179(2). <https://doi.org/10.1111/aab.12694>
35. Wang X., Fan H., Phoncharoen W., G elin U., Tomlinson KW. Leaf chemistry of architecturally defended plants responds more strongly to soil phosphorus variation than non-architecturally defended ones. Physiol Plant. 2023; 175(1). <https://doi.org/10.1111/ppl.13856> PMID: 36651321
36. Maver M., Trevisan F., Miras-Moreno B., Lucini L., Trevisan M., Cesco S., et al. The interplay between nitrogenated allelochemicals, mineral nutrition and metabolic profile in barley roots. Plant Soil. 2022; 479:715–730. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05553-8>
37. M ader P., Fliebbach A., Dubois D., Gunst L., Fried P., Niggli U. Soil Fertility and Biodiversity in Organic Farming. Science. 2002. 296. <https://doi.org/10.1126/science.1071148> PMID: 12040197
38. Stockdale E. A., Shepherd M. A., Fortune S., Cuttle S. P., Soil fertility in organic farming systems—fundamentally different? Soil Use and Management. 2002; 18, 301–308. <https://doi.org/10.1079/SUM2002143>
39. Montgomery D. R., Bikle A., Soil Health and Nutrition Density: Beyond Organic vs. Conventional Farming. Front. Sustain. Food Syst. 2021; 5:699147. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.699147>
40. Ostrowska-Kołodziejczak A., Stuper-Szablewska K., Kulik T., Bu sko M., Rissmann I., Wiwart M., et al. Concentration of fungal metabolites, phenolic acids and metals in mixtures of cereals grown in organic and conventional farms. J. Anim. Feed Sci. 2016; 25(1):74–81. <https://doi.org/10.22358/jafs/65590/2016>
41. Bara nski M.,  rednicka-Tober D., Volakakis N., Seal C., Sanderson R., Stewart GB., et al. Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review and meta-analyses. British Journal of Nutrition. 2014; 112(5), 794–811. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001366> PMID: 24968103
42. Garaghanipor N., Arzani A., Rahimmalek M., Ravash R. Physiological and Transcriptome Indicators of Salt Tolerance in Wild and Cultivated Barley. Front. Plant Sci. 2022; 14; 13:819282. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.819282> PMID: 35498693
43. Przybylska-Balcerek A., Szablewski T., Cegielska-Radziejewska R., G oral T., Kurasiak-Popowska D., Stuper-Szablewska K. Assessment of antimicrobial Properties of Phenolic Acid Extracts from Grain Infected with Fungi from the Genus *Fusarium*. Molecules. 2022; 27(5), 1741; <https://doi.org/10.3390/molecules27051741> PMID: 35268842
44. Ga a zka A. Conversion of phenolic compounds and the role of L-phenylalanine ammonia lyase (PAL) in the induction of plant defense mechanism. Polish Journal of Agronomy. 2011; 15, 83–88.
45. Bahadur A., Singh DP., Sarma BK., Singh UP. Foliar application of l-phenylalanine and ferulic acids to pea plants: induced phenylalanine ammonia lyase activity and resistance against *Erysiphe pisi*. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2012; 45(4), 398–403. <https://doi.org/10.1080/03235408.2011.587963>
46. Matsumoto S., Mizutani M., Sakata K., Shimizu BI. Molecular cloning and functional analysis of the ortho-hydroxylases of p-coumaroyl coenzyme A/feruloyl coenzyme A involved in formation of umbelliferone and scopoletin in sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Phytochemistry. 2012; 74, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.11.009> PMID: 22169019
47. Ma Y., Wang P., Zhou T., Chen Z., Gu Z. and Yang R. Role of Ca<sup>2+</sup> in phenolic compound metabolism of barley (*Hordeum vulgare* L.) sprouts under NaCl stress. J. Sci. Food Agric. 2019; 99: 5176–5186. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9764> PMID: 31021402
48. Hammad SAR., Ali OAM. Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract. Annals of Agricultural Science. 2014; 59(1), p. 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2014.06.018>
49. Glagoleva A., Kukueva T., Mursalimov S., Khlestkina E., Shoeva O. Effects of Combining the Genes Controlling Anthocyanin and Melanin Synthesis in the Barley Grain on Pigment Accumulation and Plant Development. Agronomy. 2022; 12, 112. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010112>
50. Chen J., Yang J., Ma L., Li J., Shahzad N., Kim CK. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. Scientific Reports. 2020; 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59451-z>
51. Pietta PG. Flavonoids and Antioxidants. J. Nat. Prod. 2000; 63, 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509> PMID: 10924197

52. Chen J., Yang Y., Yang X., Zhu G., Lu X., Jia F., et al. Investigation of flavonoid components and their associated antioxidant capacity in different pigmented rice varieties. *Food Research International*. 2022; 161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111726> PMID: 36192868
53. Suriano S., Iannucci A., Codianni P., Fares C., Russo M., Pecchioni N., et al. Phenolic acids profile, nutritional and phytochemical compounds, antioxidant properties in colored barley grown in southern Italy. *Food Res. Int.* 2018; 113, 221–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.072> PMID: 30195516
54. Lin S., Guo H., Gong JDB., Lu M., Lu MY., Wang L., et al. Phenolic profiles,  $\beta$ -glucan contents, and antioxidant capacities of colored Qingke (Tibetan hulless barley) cultivars. *J. Cereal Sci.* 2018; 81, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.04.001>
55. Dang B., Wen-Gang Z., Jie Z., Xi-Juan Y., Huai-De X. Evaluation of Nutritional Components, Phenolic Composition, and Antioxidant Capacity of Highland Barley with Different Grain Colors on the Qinghai Tibet Plateau. *Foods*. 2022; 11, 14:2025. <https://doi.org/10.3390/foods11142025> PMID: 35885267

## Article

# Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes

Rafał Nowak <sup>1</sup>, Małgorzata Szczepanek <sup>1</sup>, Karolina Błaszczuk <sup>1,\*</sup>, Joanna Kobus-Cisowska <sup>2</sup>,  
Anna Przybylska-Balcerek <sup>3</sup>, Kinga Stuper-Szablewska <sup>3</sup>, Jarosław Pobereźny <sup>4</sup>,  
Mohammad Bagher Hassanpouraghdam <sup>5</sup> and Farzad Rasouli <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Department of Agronomy, Faculty of Agriculture and Biotechnology, Bydgoszcz University of Science and Technology, Prof. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, Poland; rafnow003@pbs.edu.pl (R.N.); malgorzata.szczepanek@pbs.edu.pl (M.S.)

<sup>2</sup> Department of Gastronomy Science and Functional Foods, Faculty of Food Science and Nutrition, Poznan University of Life Science, Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznan, Poland; joanna.kobus-cisowska@up.poznan.pl

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Faculty of Forestry and Wood Technology, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznan, Poland; anna.przybylska@up.poznan.pl (A.P.-B.); kinga.stuper@up.poznan.pl (K.S.-S.)

<sup>4</sup> Department of Microbiology and Food Technology, Bydgoszcz University of Science and Technology, Prof. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, Poland; poberezny@pbs.edu.pl

<sup>5</sup> Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh 55181-83111, Iran; hassanpouraghdam@gmail.com (M.B.H.); farrasoli@gmail.com (F.R.)

\* Correspondence: karbla005@pbs.edu.pl; Tel.: +48-609-215-761



**Citation:** Nowak, R.; Szczepanek, M.; Błaszczuk, K.; Kobus-Cisowska, J.; Przybylska-Balcerek, A.; Stuper-Szablewska, K.; Pobereźny, J.; Hassanpouraghdam, M.B.; Rasouli, F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. *Agronomy* **2023**, *13*, 1852. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071852>

Academic Editor: Massimo Blandino

Received: 26 June 2023

Revised: 10 July 2023

Accepted: 11 July 2023

Published: 13 July 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Barley (*Hordeum vulgare*) grain stands out among other cereals due to its high nutritional value. It results mainly from the high content of fiber and antioxidants, such as phenolic compounds. Barley grains can also be an important source of unsaturated fatty acids and carotenoids that are beneficial to health. This study assessed the effect of the foliar application of an amino-acid biostimulant on the content of phenolic compounds, carotenoids, and the composition of fatty acids in the grain of alternative, black-grain barley genotypes, and the commonly used ‘Soldo’ cultivar, grown in conventional and organic farming systems. The dark-pigmented grains contained significantly more phenolic acids and flavonoids than the yellow seed of the traditional cultivar and were characterized by a significantly higher proportion of unsaturated fatty acids. The application of the biostimulant significantly increased the concentration of phenolic compounds in grains, especially of alternative genotypes.

**Keywords:** black barley; *Hordeum vulgare*; farming system; health-promoting substances; PCA; UPLC method

## 1. Introduction

Barley (*Hordeum vulgare*) has been considered a staple food for a long time, providing consumers with a good amount of proteins, carbohydrates, fiber, or vitamins [1]. In the last decade, a growing interest in foods with higher nutritional value has contributed to an intensification of research on minor bioactive compounds accumulated in barley grains [2]. Among the biochemicals that have attracted scientists’ attention, we can distinguish, for instance, carotenoids, polyphenols, or free fatty acids.

In the Poaceae family, phytopigments such as carotenoids and polyphenols play a key role. Those chemicals not only correspond to the plants’ color, but more importantly, they have health-promoting properties. Carotenoids are famous for their ability to give fruits and vegetables orange, red, or yellow color [3]. Lutein, zeaxanthin, and  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene are the most important carotenoids [4].  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene are referred to as provitamin A, which is essential for the biochemical processes synthesizing vitamin A in



animal organisms. In the body, carotenoids function as antioxidants and anti-inflammatory compounds [5]. Clinical studies also proved that a diet rich in carotenoids lowers the risk of cardiovascular disease, cancer, osteoporosis, and eye disease [6].

Other important plant substances—polyphenols include such groups as anthocyanins, flavonoids, and phenolic acids [7]. Polyphenols are characterized by an aromatic ring with an attached hydroxyl group, to which they owe their antioxidant properties.

All phenols are studied in terms of their biological functions and their beneficial effects on human and animal health. Anthocyanins and flavonoids have a beneficial effect on lipid and sugar metabolism and also prevent metabolic and cardiovascular disorders [3]. Moreover, it was proven that polyphenols prevent the development of cancer, are helpful in the treatment of allergies, strengthen the digestive system, eliminate infections, and stimulate the secretion of estrogens in female bodies [8]. Furthermore, due to their antioxidant nature, polyphenols play a vital role in protecting susceptible nutrients against oxidation.

Barley is also a source of lipids, which include fatty acids (FAs), such as saturated (SFAs), monounsaturated (MUFAs), and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [9]. The total value of lipids in the grains of various forms varies between 3–4% [10]. The most valuable are polyunsaturated fatty acids, especially essential FA, which must be provided by foods, where linoleic and linolenic acids belong [11]. Several studies reported the health benefits of PUFAs such as reducing the risk of ischemic heart disease, stroke, and myocardial infarction or lowering blood-cholesterol levels [12]. They were shown to have many other properties, such as neuroprotective effects, preventing Parkinson's disease, and supporting cognitive and visual functions [13,14]. It was also reported that the excessive intake of saturated fatty acids could affect the development of heart and circulatory disease [15].

An assortment and concentration of phytonutrients could vary among genotypes of barley [16]. The particular forms of barley can be distinguished based on the grain color, which is a function of pigments (e.g., carotenoids, polyphenols) that are accumulated in them [17]. However, some landraces have their specific color due to a combination of a few different chemicals, not only one dye group [18]. In general, together with common barley, genotypes with deep yellow, blue, purple, or black seeds were described [19]. Several studies were conducted among pigmented cereals or pseudocereals to assess the composition of carotenoids, polyphenols, and other important compounds such as FAs [20,21]. In the majority of the research, colorful landraces were characterized by higher concentrations of those compounds than common genotypes [22,23]. Overall, it is believed that alternative genotypes present a higher ability to concentrate health-promoting compounds, as well as higher antioxidant potential than standard genotypes [24]. Intriguing findings in that area were reported for Highland Barley (HB), the native form of Tibet and the Qinghai region. According to Guo et al. [9] and Idehen et al. [25], the HB has a higher nutritional value than normal grains. It was confirmed that Highland Barley lessens the risk of diabetes, Alzheimer's disease, atherosclerosis, cardiovascular disease, has anticancer potential, and much more [26]. *Hordeum vulgare* var. *nigricans* (*Hordeum distichon* var. *nigricans*) seems to have a comparable potential, likewise, *Hordeum vulgare* var. *rimpau*. Both of them are representatives of black-seeded barley. Additionally, *H. v. rimpau* belongs to hooded barley, which refers to spikes with reduced awns. However, little is known about these genotypes. *H. v. nigricans* can be found as a niche, local genotype in regions that are described as a fertile crescent, but more detailed information is limited [27].

The earlier studies report that the concentration of phytochemicals could be influenced not only by genotype but also by climatic, soil, and weather conditions, agronomic management, or the farming system [28,29]. From the consumer's point of view and the growing demand for organic food, the influence of the farming system seems to be crucial. There are many studies that report that organic cultivation stimulated a higher accumulation of various chemicals. Nonetheless, some analyses showed no significant differences between the cultivation system and the nutritional value of plants [30,31]. These differences can be caused by treatments performed during the growing seasons of plants, e.g., the use of biostimulants, the popularity of which is growing in both organic and

conventional agriculture. Biostimulants are products with a natural origin that enhance the plant metabolism without changes in those processes [32]. They are applied to intensify the uptake of nutrients, minimize the biotic and abiotic stress, and reduce the rates of fertilizers [33]. Among them, there are products composed of amino acids that affect the yield, as well as the quality and content, of the health-promoting compounds that are currently being studied [34]. The numerous studies have revealed that amino acids contribute to a higher accumulation of carotenoids, polyphenols, total chlorophyll, macronutrients, and micronutrients [35,36]. The effect of an amino-acid biostimulant was carefully examined in vegetables or fruits [37,38], but the effect on the quality of grains is still not well recognized.

The aim of the study was to evaluate the differences in the content of carotenoids, free fatty acids, and polyphenols in alternative genotypes (*Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn and *H. vulgare* L. var. *rimpai* Wittm) and common barley (*H. vulgare* L.), grown organically and conventionally, with the foliar application of an amino-acid biostimulant. It was assumed that the alternative genotypes with black grain differ from the modern cultivar of the barley with yellow grain and that organic cultivation and the use of a biostimulant stimulate the accumulation of health-promoting components in the grain.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material

The study was carried out on grains of three different genotypes of barley grown in organic and conventional farming systems. The first two genotypes are two-row, spring forms of common barley *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn and *H. vulgare* L. var. *rimpai* Wittm; they are primary or similar to primary forms. The third genotype, 'Soldo' *H. vulgare* L., treated as comparative to the two previous ones, is a modern cultivar of two-row spring barley, commonly cultivated in Europe. The primary forms are formed by grains with dark pigmentation of the husk and fruit and seed coat, while the 'Soldo' variety forms grains with a yellow color typical for barley. *H. vulgare* var. *nigricans* and the 'Soldo' variety form the awned spike, while the inflorescence of *H. vulgare* var. *rimpai* has reduced awns, the so-called hoods (hooded barley).

### 2.2. Field Experiments

The barley grain came from two field experiments, conducted in a split-plot design in three replicates, under organic and conventional cultivation conditions in Luchowo (53°15'40" N, 17°16'26" E) and Minikowo (53°10'02" N, 17°44'22" E) in central Poland in 2021 and 2022. The first-order factor was the different genotypes of barley: *Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn and *H. vulgare* L. var. *rimpai* Wittm and the modern cultivar 'Soldo'. The second-order factor was the foliar application of the amino acid biostimulator Naturamin WSP (Supplementary Materials, Table S1), applied twice during the growing season in the BBCH 32 and BBCH 53 phases at a dose of 0.5 kg ha<sup>-1</sup> in the form of an aqueous solution. The amount of the working liquid was 300 L ha<sup>-1</sup>; the treatments were performed in the early morning or evening, so as to obtain good assimilation of the preparation by plants. The control plots were not subjected to biostimulant application. The area of the experimental plots was 24 m<sup>2</sup> in the conventional system and 13.47 m<sup>2</sup> in the organic system. A 40 cm gap was used between the treatments to avoid contamination with the working liquid. The soil in Lóchów was characterized by the content of 23.7 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g soil, 19.7 mg K<sub>2</sub>O/100 g soil, 4.2 mg MgO/100 g soil, and pH 7.7 and, in Minikowo, 7.1 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g soil, 17.1 mg K<sub>2</sub>O/100 g soil, 4.5 mg MgO/100 g soil, and pH 4.7. The barley was sown in the conventional farming system between the 21st and 31st of March and in the organic system between the 1st and 10th of April with a row spacing of 12.5 cm and a density of 350 grains m<sup>-2</sup>. The fertilization of plants in the conventional system was applied only before sowing in rates of 70 kg N ha<sup>-1</sup>, 40 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>, and 70 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup>. In this system, the weeds were chemically controlled using a mixture of 2,4-D, florasulam, and pinoxaden at rates of 180 g, 3.75 g, and 40 g a.i. ha<sup>-1</sup> at the stem elongation stage. Fungicides were applied twice—tiophanate-methyl—in a dose of

700 g a.i. ha<sup>-1</sup> at the beginning of stem elongation stage, and a mixture of tebuconazole and prothioconazole in doses 125 g a.i. and 125 g a.i. ha<sup>-1</sup> was applied in the flag leaf stage. The cereal leaf beetle was controlled with cypermethrin at the flag leaf stage in a dose of 25 g a.i. ha<sup>-1</sup>. In the organic farming system, no natural or mineral fertilizers were applied, and no plant protection methods were used. The only treatment performed during cultivation was the use of an amino-acid biostimulant (excluding control treatments). Grain from both experiments was harvested at less than 14% water content between 21st and 31st July. The yield for each combination was calculated as a mean of three separate replications. The meteorology data were collected from the Polish Institute of Meteorology and Water Management. The biochemical composition of the barley grains was evaluated from grains harvested in 2021.

### 2.3. Determination of Carotenoids

The carotenoid extracts were obtained from ground seeds (0.4 mg) that were triturated with a mixture of acetone and petroleum ether (1:1). Then, after separation of the plant tissue, the acetone and hydrophilic fraction were removed from the extract by washing with water. The result was an ether extract with a mixture of carotenoid pigments. The extract prepared in this way was concentrated in a vacuum evaporator at 35 °C until an oily residue was obtained and then digested in 2 mL of methanol (Merck, Rahway, NJ, USA) and subjected to chromatographic analysis. Lutein, zeaxanthin, and β-carotene were determined using Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) with a Waters Acquity PDA detector (Waters, USA). The chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 column (100 mm × 2.1 mm, particle size 1.7 μm) (Waters, Milford, MA, USA). Elution was carried out using a solvent—methanol, water, and tert-butyl methyl ether (TBME). A gradient was used at a flow of 0.4 mL/min. The column and samples were thermostated, the column temperature was 30 °C, and the test temperature was 10 °C. During the analysis, the solutions were degassed in a Waters apparatus. The injection volume was 10 μL. The recording was carried out at the wavelength of λ = 445 nm. The identification of compounds was based on spectra in the range from 200 to 600 nm, and the retention times were compared to standards.

### 2.4. Determination of Free Fatty Acids

The samples (100 mg) were placed into 17 mL culture tubes, suspended in 2 mL of methanol, treated with 0.5 mL of 2 M aqueous sodium hydroxide, and tightly sealed. The saponification process was carried out assisted by microwave radiation operating at 2450 MHz and 900 W maximum output. The samples were irradiated (370 W) for 20 s and, after approx. 5 min, for an additional 20 s. After 15 min, the contents of the culture tubes were neutralized with 1 M aqueous hydrochloric acid; 2 mL MeOH was added, and extraction with pentane (3–4 mL) was carried out within the culture tubes. The pentane extracts were evaporated to dryness in a nitrogen stream. In the next step, the extracts were methylated using a mixture of anhydrous methanol and sulfuric acid (1:5, v/v). The extract containing lipids was added with 0.5 mL of methanol, followed by the addition of a 0.15 mL methanol/sulfuric acid mixture (1:5, v/v). The samples were heated at 70 °C for 15 min. After the solution was cooled, 0.5 mL of n-hexane was added, followed by the addition of sufficient water to form two layers. The upper hexane layer was removed and analyzed on an Acquity H class UPLC system equipped with a Waters Acquity PDA detector (Waters, USA). The chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> column (150 mm × 2.1 mm, particle size 1.7 μm) (Waters, Ireland). The elution was carried out as a gradient using the following mobile phase composition: A:acetonitrile; B:2-propanol, flow 0.17 mL/min. The measurements of the sterols concentrations were performed using an external standard at wavelengths λ = 195–300. The compounds were identified based on a comparison of the retention times of the examined peak with that of the standard and by adding a specific amount of the standard to the tested sample and repeated analyses [39].

### 2.5. Determination of Polyphenols

The phenolic compounds in the samples were analyzed after alkaline and acidic hydrolysis [40,41]. The analysis was performed using an Acquity H class UPLC system equipped with a Waters Acquity PDA detector (Waters, USA). The chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 column (100 mm × 2.1 mm, particle size 1.7 µm) (Waters, Ireland). The elution was carried out as a gradient using the following mobile phase composition: A: acetonitrile with 0.1% formic acid, B: 1% aqueous formic acid mixture (pH = 2). The concentrations of the phenolic compounds were determined using an internal standard at wavelengths  $\lambda = 320$  nm and 280 nm. The compounds were identified based on a comparison of the retention time of the analyzed peak with the retention time of the standard and by adding a specific amount of the standard to the analyzed samples and repeated analysis. The detection level is 1 µg g<sup>-1</sup>.

### 2.6. Statistics

The experimental data were analyzed using the Statistica 13.3 (TIBCO). All the results are shown as the means ± standard deviation from three replications. The general linear model (GLM) was used to determine the significant differences between combinations at  $p < 0.05$ . For correlation between the chosen polyphenols and free fatty acids, Pearson's correlation was used. Principal component analysis (PCA) was conducted to represent the variation in the set of data using a minimal number of factors.

## 3. Results

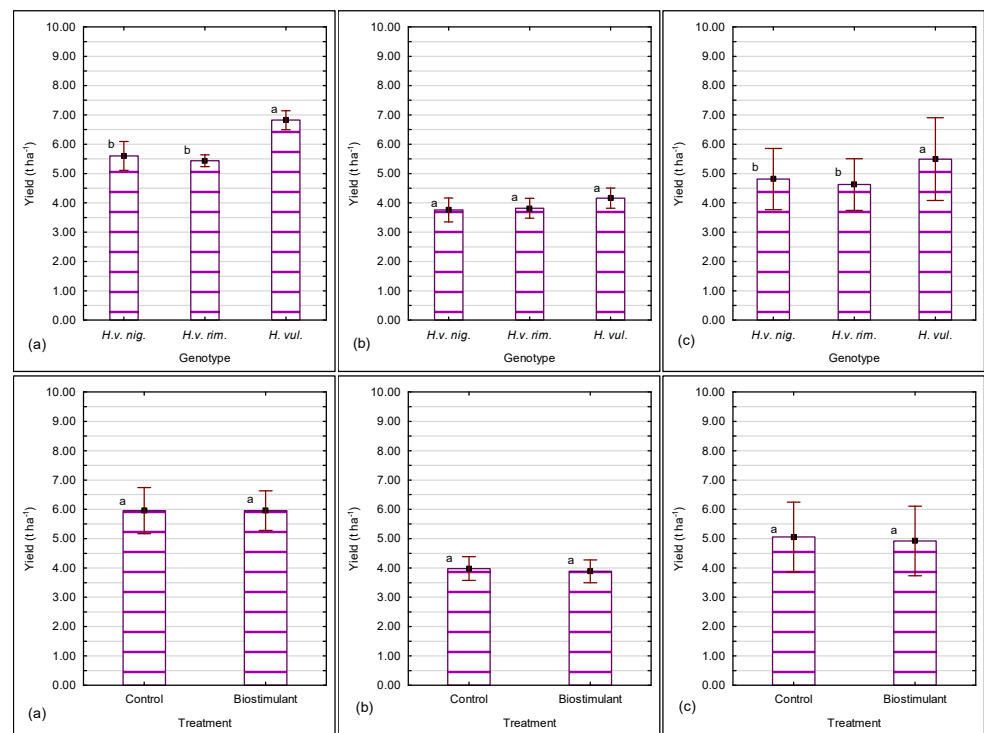
### 3.1. Yields of Barley

The yield of tested barley genotypes was an average of 4.92 t ha<sup>-1</sup> in the traditional system and 1.74 t ha<sup>-1</sup> in the organic system in 2021–2022 (Figures 1 and 2). The highest grain yield in both farming systems was obtained for the genotype *H. vulgare*, which has a yield significantly higher than *H. vulgare* var. *nigricans* and *H. vulgare* var. *rimpau* by 36.1% and 37.6% in the organic system and by 18.4% and 18.6% in the conventional system (Figures 1 and 2). The yield of genotypes also differed in the years of study. In the conventional system, in 2021, the highest grain yield was produced by *H. vulgare*, which yielded 21.8% higher than *H. vulgare* var. *nigricans* and 25.6% higher than *H. vulgare* var. *rimpau*, while in 2022, these differences were not significant (Figure 1). Similarly, in the organic system in 2021, the highest grain yields were obtained from *H. vulgare*. The genotypes of *H. vulgare* var. *rimpau* and *H. vulgare* var. *nigricans* obtained a significantly lower yield under these conditions, by 38.7% and 33.9%, respectively. In 2022, organically grown *H. vulgare* yielded a significantly higher yield than *H. vulgare* var. *rimpau* by 29.2% (Figure 2). The meteorology data for 2021 and 2022 are listed in the Supplementary Materials Table S2.

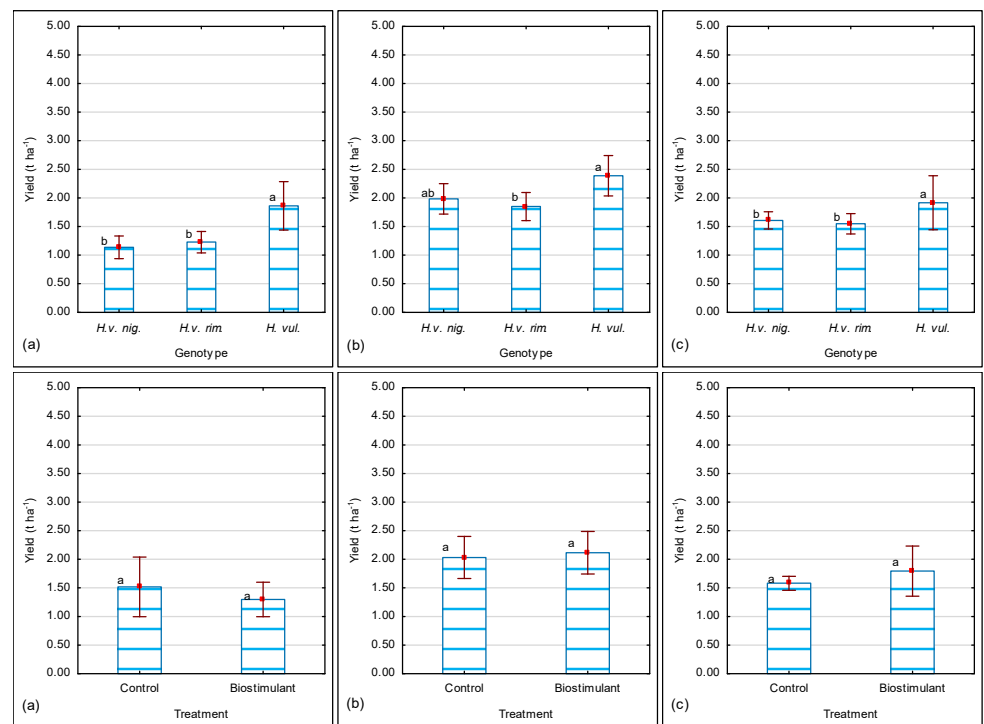
The foliar application of the amino acid biostimulant had no significant effect on the grain yield of the barley genotypes tested (Figures 1 and 2). However, significant differences in grain chemical composition were observed.

### 3.2. Composition of Carotenoids

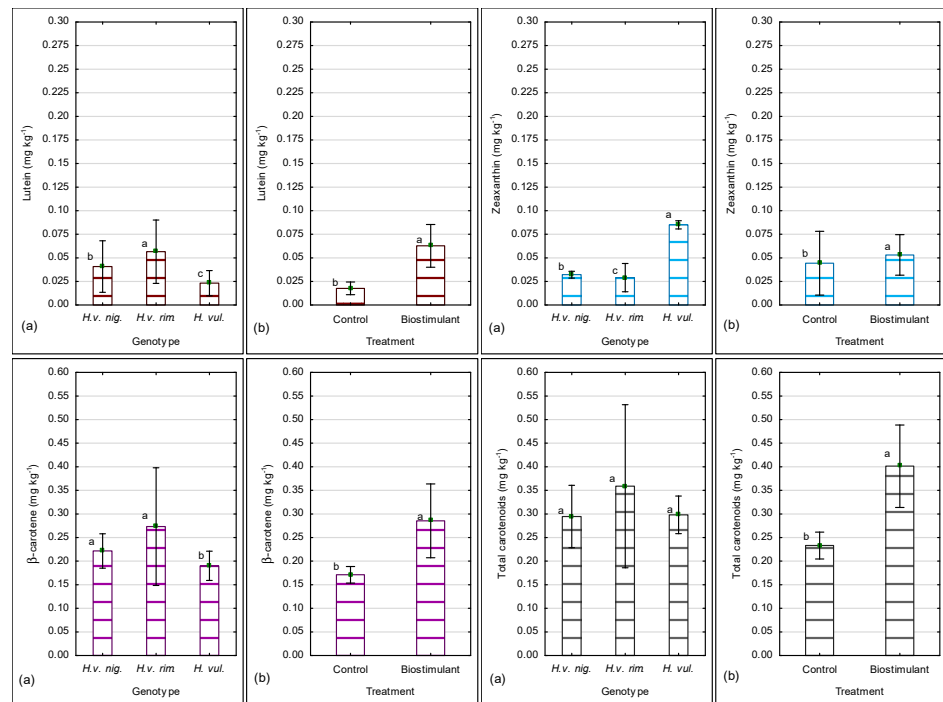
The research showed the influence of the barley genotype, as well as the application of the biostimulant, on the content of β-carotene, lutein, and zeaxanthin in the grain (Figures 3 and 4). The biostimulant application, on average for genotypes, significantly increased the content of these compounds, as well as total carotenoids, both in conventional and organic cultivation. The biostimulant had the strongest effect on lutein, the amount of which, after application of the preparation, increased more than three times in both farming systems, while the smallest effect was noted for zeaxanthin.



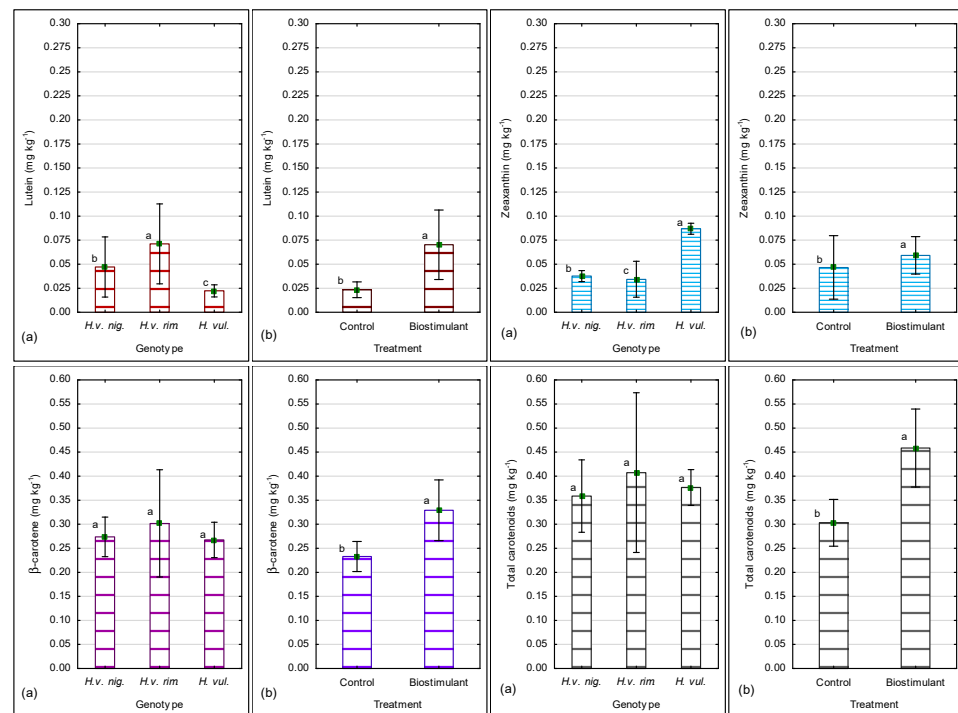
**Figure 1.** The grain yield of *H. v. nigricans* (*H. v. nig.*), *H. v. rimpai* (*H. v. rim.*) and *H. vulgare* (*H. vul.*), from the conventional farming system, presented as a mean for genotypes or for treatments, in (a) 2021, (b) 2022, (c) average from 2021 and 2022. The error bars indicate standard deviation. a, b—the mean values followed by different letters indicate significant differences  $p < 0.05$ .



**Figure 2.** The grain yield of *H. v. nigricans* (*H. v. nig.*), *H. v. rimpai* (*H. v. rim.*), and *H. vulgare* (*H. vul.*), from the organic farming system, presented as a mean for genotypes or for treatments, in (a) 2021, (b) 2022, (c) average from 2021 and 2022. The error bars indicate standard deviation. a, b—the mean values followed by different letters indicate significant differences  $p < 0.05$ .



**Figure 3.** The content of lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -carotene, and total carotenoids in the grain of *H. v. nigricans* (*H. v. nig.*), *H. v. rimpaii* (*H. v. rim.*), and *H. vulgare* (*H. vul.*), from the conventional farming system, presented as: (a) the mean for genotype and (b) the mean for treatment. The error bars indicate standard deviation. a, b, c—the mean values followed by different letters indicate significant differences  $p < 0.05$ .



**Figure 4.** The content of lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -carotene, and total carotenoids in the grain of *H. v. nigricans* (*H. v. nig.*), *H. v. rimpaii* (*H. v. rim.*), and *H. vulgare* (*H. vul.*), from the organic farming system presented as: (a) the mean for genotype and (b) the mean for treatment. The error bars indicate standard deviation. a, b, c—the mean values followed by different letters indicate significant differences  $p < 0.05$ .

Among the analyzed carotenoids,  $\beta$ -carotene had the largest share in the grain (Figures 3 and 4). In conventional farming, the average content of  $\beta$ -carotene was higher in the primary genotypes (*H. v. nigricans*, *H. v. rimpai*) compared to *H. vulgare* (Figure 3). However, the analysis of genotype–biostimulant interactions indicates that only *H. v. rimpai* accumulated significantly more  $\beta$ -carotene compared to *H. vulgare*, and even more than *H. v. nigricans*, but only if, during the growing season, it was treated with a biostimulant (Table 1).

**Table 1.** The content of carotenoids in barley grain from the conventional system.

Genotype (G)	Treatment (T)	Lutein mg kg <sup>-1</sup>	Zeaxanthin mg kg <sup>-1</sup>	$\beta$ -Carotene mg kg <sup>-1</sup>	Total Carotenoids mg kg <sup>-1</sup>
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>nigricans</i>	Biostimulant	0.066 <sup>b</sup> ± 0.004	0.035 <sup>c</sup> ± 0.002	0.253 <sup>b</sup> ± 0.015	0.354 <sup>b</sup> ± 0.015
	Control	0.016 <sup>e</sup> ± 0.001	0.029 <sup>d</sup> ± 0.001	0.190 <sup>c</sup> ± 0.010	0.235 <sup>d</sup> ± 0.009
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>rimpai</i>	Biostimulant	0.087 <sup>a</sup> ± 0.005	0.043 <sup>b</sup> ± 0.002	0.387 <sup>a</sup> ± 0.015	0.516 <sup>a</sup> ± 0.015
	Control	0.026 <sup>d</sup> ± 0.003	0.015 <sup>e</sup> ± 0.002	0.160 <sup>d</sup> ± 0.010	0.201 <sup>e</sup> ± 0.009
<i>Hordeum vulgare</i>	Biostimulant	0.035 <sup>c</sup> ± 0.002	0.081 <sup>a</sup> ± 0.002	0.217 <sup>bc</sup> ± 0.006	0.333 <sup>b</sup> ± 0.004
	Control	0.011 <sup>f</sup> ± 0.001	0.089 <sup>a</sup> ± 0.002	0.163 <sup>d</sup> ± 0.015	0.263 <sup>c</sup> ± 0.015
<i>p</i> -value	G × T	0.03	<0.01	<0.01	<0.01

<sup>a, b, c, ...</sup> —the mean values in columns with different letters are significantly different (ANOVA at the significance level  $p < 0.05$ ). The sign ± relates to the standard deviation.

The average lutein content was significantly higher in the primary genotypes compared to *H. vulgare* and, at the same time, the highest in *H. v. rimpai*, both in the conventional and organic farming systems (Figures 3 and 4). However, as in the case of  $\beta$ -carotene, the lutein content in the primary genotypes was higher than in the modern cultivar only in the variant with the biostimulant (Tables 1 and 2).

**Table 2.** The content of carotenoids in the barley grain from the organic system.

Genotype (G)	Treatment (T)	Lutein mg kg <sup>-1</sup>	Zeaxanthin mg kg <sup>-1</sup>	$\beta$ -Carotene mg kg <sup>-1</sup>	Total Carotenoids mg kg <sup>-1</sup>
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>nigricans</i>	Biostimulant	0.075 <sup>a</sup> ± 0.011	0.043 <sup>b</sup> ± 0.002	0.307 <sup>ab</sup> ± 0.015	0.424 <sup>ab</sup> ± 0.025
	Control	0.019 <sup>c</sup> ± 0.002	0.033 <sup>c</sup> ± 0.002	0.241 <sup>bc</sup> ± 0.027	0.293 <sup>cd</sup> ± 0.020
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>rimpai</i>	Biostimulant	0.108 <sup>a</sup> ± 0.012	0.051 <sup>b</sup> ± 0.006	0.393 <sup>a</sup> ± 0.074	0.553 <sup>a</sup> ± 0.070
	Control	0.034 <sup>b</sup> ± 0.003	0.018 <sup>d</sup> ± 0.002	0.210 <sup>c</sup> ± 0.020	0.262 <sup>d</sup> ± 0.021
<i>Hordeum vulgare</i>	Biostimulant	0.028 <sup>b</sup> ± 0.003	0.084 <sup>a</sup> ± 0.007	0.287 <sup>abc</sup> ± 0.025	0.398 <sup>b</sup> ± 0.018
	Control	0.017 <sup>c</sup> ± 0.002	0.090 <sup>a</sup> ± 0.003	0.248 <sup>bc</sup> ± 0.040	0.354 <sup>bc</sup> ± 0.041
<i>p</i> -value	G × T	<0.01	<0.01	0.03	<0.01

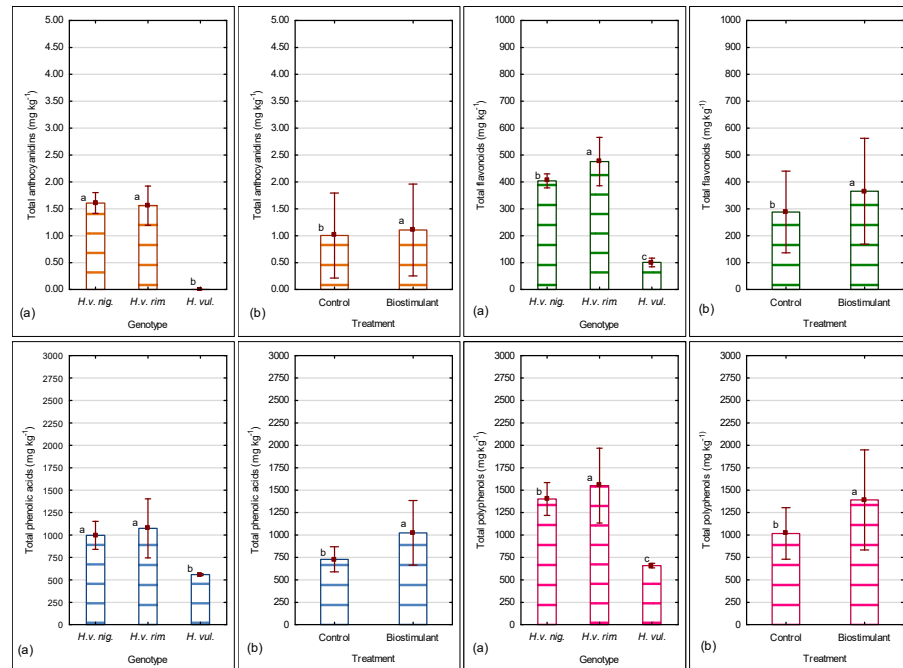
<sup>a, b, c, ...</sup> —the mean values in columns with different letters are significantly different (ANOVA at the significance level  $p < 0.05$ ). The sign ± relates to the standard deviation.

Common barley *H. vulgare* with yellow grain was characterized by the highest content of zeaxanthins, both in conventional and organic farming (Figures 3 and 4). The application of the biostimulant had no effect on the zeaxanthin content in the modern barley variety but increased it in the primary genotypes (Tables 1 and 2).

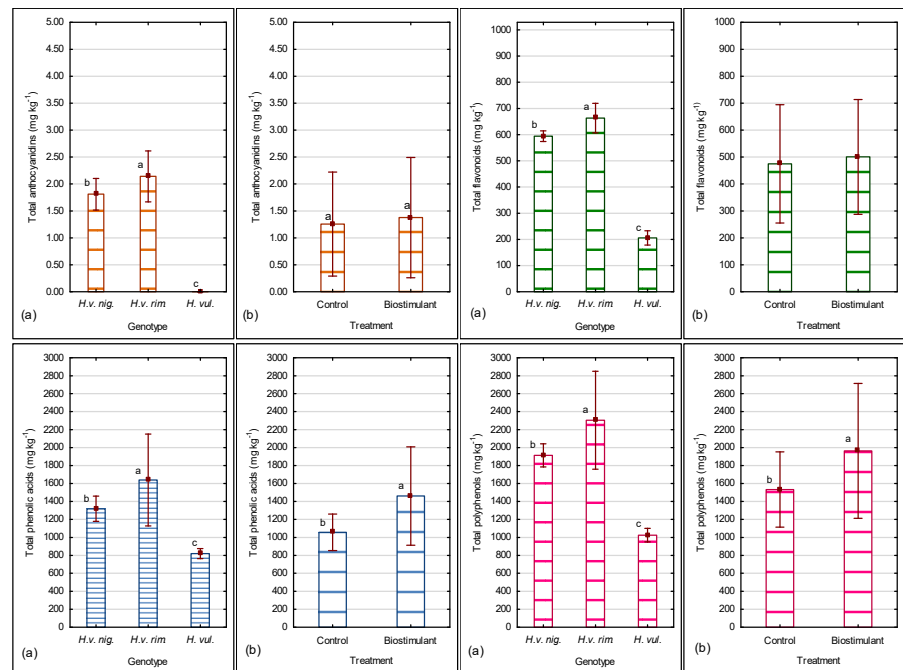
### 3.3. Composition of Free Fatty Acids

Among the analyzed free fatty acids, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) had the largest proportion in the fat stored in the grain with an average of 60% (Figures 5 and 6). In conventional farming, the average content of PUFAs was the highest in *H. v. rimpai* (Figure 5), while in organic farming, it was highest in *H. v. nigricans* (Figure 6). On average, for genotypes, the biostimulant reduced the proportion of PUFAs, both in conventional and organic cultivation. However, in some genotypes (*H. v. vulgare* and *H. v. nigricans*, in con-

ventional and organic cultivation, respectively), the proportion of PUFAs after biostimulant application and without treatment was similar (Tables 3 and 4).



**Figure 5.** The content of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, and polyunsaturated fatty acids in the grain of *H. v. nigricans* (*H. v. nig.*), *H. v. rimpaui* (*H. v. rim.*), and *H. vulgare* (*H. vul.*), from the conventional farming system, presented as: (a) the mean for genotype and (b) the mean for treatment. The error bars indicate standard deviation. a, b, c—the mean values followed by different letters indicate significant differences  $p < 0.05$ .



**Figure 6.** The content of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, and polyunsaturated fatty acids in the grain of *H. v. nigricans* (*H. v. nig.*), *H. v. rimpaui* (*H. v. rim.*), and *H. vulgare* (*H. vul.*), from the organic farming system presented as: (a) the mean for genotype and (b) the mean for treatment. The error bars indicate standard deviation. a, b, c—the mean values followed by different letters indicate significant differences  $p < 0.05$ .



**Table 3.** The content of free fatty acids in barley grain from the conventional system.

Genotype (G)	Treatment (T)	Saturated Fatty Acids (%)	Monounsaturated Fatty Acids (%)	Polyunsaturated Fatty Acids (%)
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>nigricans</i>	Biostimulant	20.5 <sup>a</sup> ± 0.34	19.0 <sup>a</sup> ± 0.44	60.5 <sup>b</sup> ± 0.11
	Control	19.8 <sup>ab</sup> ± 0.41	17.4 <sup>bc</sup> ± 0.40	62.8 <sup>a</sup> ± 0.30
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>rimpau</i>	Biostimulant	20.6 <sup>a</sup> ± 0.61	18.4 <sup>ab</sup> ± 0.55	61.0 <sup>b</sup> ± 0.85
	Control	18.8 <sup>b</sup> ± 0.22	16.9 <sup>c</sup> ± 0.77	64.4 <sup>a</sup> ± 0.67
<i>Hordeum vulgare</i>	Biostimulant	21.0 <sup>a</sup> ± 0.81	19.6 <sup>a</sup> ± 0.55	59.4 <sup>b</sup> ± 0.26
	Control	19.7 <sup>ab</sup> ± 0.85	19.6 <sup>a</sup> ± 0.088	60.7 <sup>b</sup> ± 0.91
<i>p</i> -value	G × T	0.34	0.04	0.03

<sup>a, b, c</sup>—the mean values in columns with different letters are significantly different (ANOVA at the significance level  $p < 0.05$ ). The sign ± relates to the standard deviation.

**Table 4.** The content of free fatty acids in barley grain from the organic system.

Genotype (G)	Treatment (T)	Saturated Fatty Acids (%)	Monounsaturated Fatty Acids (%)	Polyunsaturated Fatty Acids (%)
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>nigricans</i>	Biostimulant	19.7 <sup>b</sup> ± 0.73	13.0 <sup>c</sup> ± 0.37	67.3 <sup>a</sup> ± 1.04
	Control	19.9 <sup>b</sup> ± 0.54	12.6 <sup>c</sup> ± 0.13	67.6 <sup>a</sup> ± 0.46
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>rimpau</i>	Biostimulant	24.8 <sup>a</sup> ± 0.24	19.9 <sup>a</sup> ± 0.66	55.3 <sup>c</sup> ± 0.54
	Control	19.7 <sup>b</sup> ± 1.11	15.5 <sup>b</sup> ± 0.89	64.9 <sup>b</sup> ± 1.20
<i>Hordeum vulgare</i>	Biostimulant	24.5 <sup>a</sup> ± 0.17	14.6 <sup>b</sup> ± 0.38	60.9 <sup>c</sup> ± 0.26
	Control	22.8 <sup>a</sup> ± 1.38	13.1 <sup>c</sup> ± 0.49	64.1 <sup>b</sup> ± 1.36
<i>p</i> -value	G × T	<0.01	0.13	<0.01

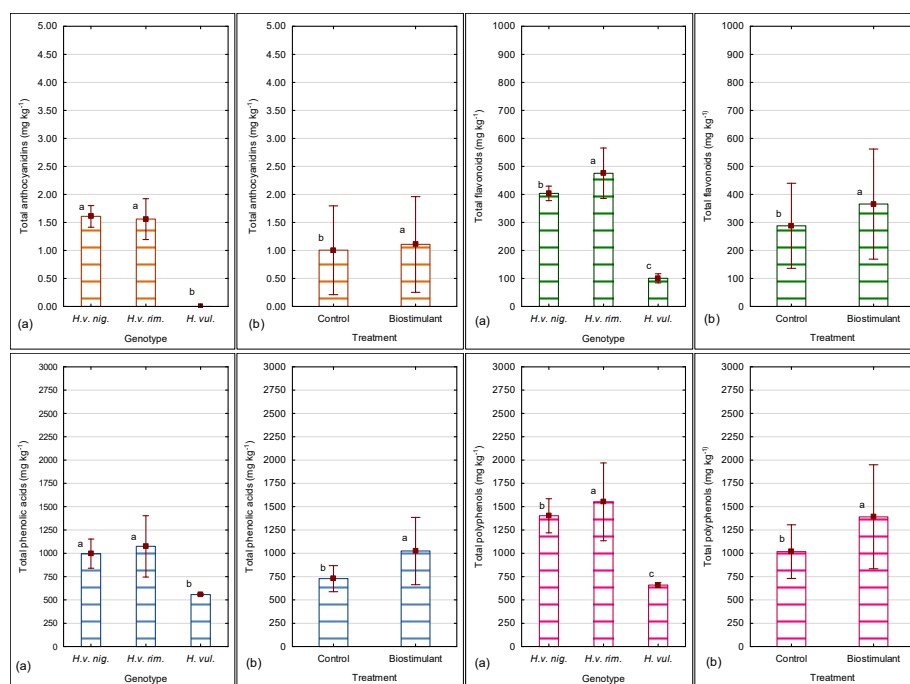
<sup>a, b, c</sup>—the mean values in columns with different letters are significantly different (ANOVA at the significance level  $p < 0.05$ ). The sign ± relates to the standard deviation.

In conventional cultivation, the highest proportion of monounsaturated fatty acids (MUFAs) was found in *H. vulgare*, while in organic cultivation, it was found in *H. v. rimpau* (Figures 5 and 6). On average for genotypes, the biostimulant significantly increased the proportion of MUFAs in barley grain fat from both farming systems (organic and conventional). No effect of the biostimulant on the content of MUFAs was found in *H. vulgare* in conventional cultivation (Table 3) and in *H. v. nigricans* in organic cultivation (Table 4).

The average proportion of saturated fatty acids (SFAs) was the highest in the *H. vulgare* grain cultivated organically, while in conventional cultivation, the barley genotypes were similar in terms of this trait (Figures 5 and 6). On average for genotypes, the biostimulant increased the proportion of SFAs; however, the analysis of genotype and biostimulant interactions showed that only *H. v. rimpau* responded with a significant increase in SFA concentration after application of the preparation, both in the conventional and organic systems (Tables 3 and 4).

### 3.4. Comparison of Polyphenols

In barley grains, the dominant group of polyphenols was phenolic acids, the proportion of which was, on average, 69–85% (Figures 7 and 8). In both farming systems, the average content of phenolic acids was higher in the primary genotypes than in *H. vulgare* (Figures 7 and 8). The dominant genotype in terms of the content of these compounds was *H. v. rimpau*, especially when subjected to the application of a biostimulant (Tables 5 and 6). The biostimulant had a very strong effect on phenolic acids, the content of which, after its application, increased on average for all genotypes by almost 41% in the conventional system and by 38% in the organic system (Figures 7 and 8). However, the interaction analysis showed a stimulating effect of the biostimulant on the concentration of phenolic acids only in primary genotypes of barley, while there was no such effect in *H. vulgare* (Tables 5 and 6).



**Figure 7.** The content of total anthocyanidins, total flavonoids, total phenolic acids, and total polyphenols in the grain of *H. v. nigricans* (*H. v. nig.*), *H. v. rimpaii* (*H. v. rim.*), and *H. vulgare* (*H. vul.*), from the conventional farming system presented as: (a) the mean for genotype and (b) the mean for treatment. The error bars indicate standard deviation. a, b, c—the mean values followed by different letters indicate significant differences  $p < 0.05$ .

**Table 5.** The content of polyphenols in barley grain from the conventional system.

Genotype (G)	Treatment (T)	Total Phenolic Acids mg kg <sup>-1</sup>	Total Flavonoids mg kg <sup>-1</sup>	Total Anthocyanidins mg kg <sup>-1</sup>	Total Polyphenols mg kg <sup>-1</sup>
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>nigricans</i>	Biostimulant	1137 <sup>b</sup> ± 40.1	427 <sup>b</sup> ± 3.19	1.43 <sup>c</sup> ± 0.015	1565 <sup>b</sup> ± 43.9
	Control	856 <sup>c</sup> ± 24.3	381 <sup>c</sup> ± 9.40	1.78 <sup>b</sup> ± 0.035	1239 <sup>c</sup> ± 33.4
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>rimpaii</i>	Biostimulant	1371 <sup>a</sup> ± 54.5	555 <sup>a</sup> ± 33.7	1.89 <sup>a</sup> ± 0.053	1928 <sup>a</sup> ± 80.6
	Control	777 <sup>c</sup> ± 57.1	397 <sup>bc</sup> ± 18.7	1.23 <sup>d</sup> ± 0.044	1175 <sup>c</sup> ± 60.5
<i>Hordeum vulgare</i>	Biostimulant	566 <sup>d</sup> ± 11.0	115 <sup>d</sup> ± 4.89	0.00 <sup>e</sup> ± 0.00	681 <sup>d</sup> ± 15.8
	Control	552 <sup>d</sup> ± 5.03	86.6 <sup>d</sup> ± 5.07	0.00 <sup>e</sup> ± 0.00	639 <sup>d</sup> ± 8.29
<i>p</i> -value	G × T	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a, b, c . . . —the mean values in columns with different letters are significantly different (ANOVA at the significance level  $p < 0.05$ ). The sign ± relates to the standard deviation.

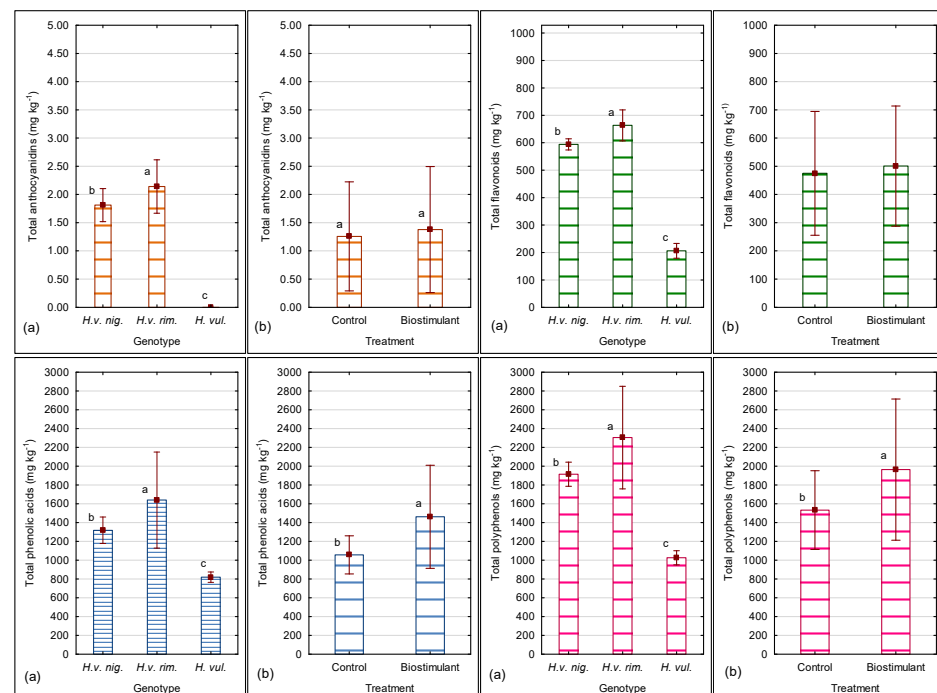
As in the case of phenolic acids, the content of flavonoids was higher in the primary barley than in the modern cultivar, and the highest content in both farming systems was found in *H. v. rimpaii* (Figures 7 and 8). This genotype accumulated more than four times more flavonoids in conventional cultivation and more than three times in organic cultivation compared to *H. vulgare*. In conventional cultivation only, on average for genotypes, the biostimulant had a positive effect on the concentration of flavonoids. In this farming system, *H. v. rimpaii* treated with the biostimulant accumulated even more flavonoids than *H. v. nigricans* (Table 5).

Anthocyanidins were only accumulated in the primary genotypes *H. v. nigricans* and *H. v. rimpaii*, (Figures 7 and 8, Tables 5 and 6). In organic cultivation, *H. v. rimpaii* accumulated more anthocyanidins than *H. v. nigricans*, regardless of the biostimulant application (Figure 8). This genotype, both organically and conventionally cultivated, accumulated the most anthocyanidins when treated with a biostimulant (Tables 5 and 6).

**Table 6.** The content of polyphenols in barley grain from the organic system.

Genotype (G)	Treatment (T)	Total Phenolic Acids mg kg <sup>-1</sup>	Total Flavonoids mg kg <sup>-1</sup>	Total Anthocyanidins mg kg <sup>-1</sup>	Total Polyphenols mg kg <sup>-1</sup>
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>nigricans</i>	Bio-stimulant	1437 <sup>b</sup> ± 81.4	584 <sup>b</sup> ± 15.8	1.59 <sup>c</sup> ± 0.118	2023 <sup>b</sup> ± 70.2
	Control	1199 <sup>c</sup> ± 18.2	604 <sup>ab</sup> ± 22.2	2.03 <sup>b</sup> ± 0.231	1805 <sup>c</sup> ± 22.8
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>rimpaii</i>	Bio-stimulant	2102 <sup>a</sup> ± 63.3	689 <sup>a</sup> ± 75.8	2.54 <sup>a</sup> ± 0.156	2794 <sup>a</sup> ± 136.4
	Control	1176 <sup>c</sup> ± 80.2	637 <sup>ab</sup> ± 14.6	1.74 <sup>bc</sup> ± 0.231	1815 <sup>bc</sup> ± 75.2
<i>Hordeum vulgare</i>	Bio-stimulant	845 <sup>d</sup> ± 50.8	228 <sup>c</sup> ± 12.4	0.00 <sup>d</sup> ± 0.00	1073 <sup>d</sup> ± 63.2
	Control	795 <sup>d</sup> ± 58.6	184 <sup>c</sup> ± 14.1	0.00 <sup>d</sup> ± 0.00	978 <sup>d</sup> ± 57.9
<i>p</i> -value	G × T	0.03	0.22	<0.01	<0.01

<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>, ... —the mean values in columns with different letters are significantly different (ANOVA at the significance level  $p < 0.05$ ). The sign ± relates to the standard deviation.



**Figure 8.** The content of total anthocyanidins, total flavonoids, total phenolic acids, and total polyphenols in the grain of *H. v. nigricans* (*H. v. nig.*), *H. v. rimpaii* (*H. v. rim.*), and *H. vulgare* (*H. vul.*), from the organic farming system presented as: (a) the mean for genotype and (b) the mean for treatment. The error bars indicate standard deviation. a, b, c—the mean values followed by different letters indicate significant differences  $p < 0.05$ .

Similarly to phenolic acids, flavonoids, and anthocyanins, the content of total polyphenols was significantly higher in the primary genotypes than in the modern cultivar cultivated both organically and conventionally. The bio-stimulant, regardless of the farming system, on average for genotypes, significantly increased the concentration of total polyphenols (Figures 7 and 8). The genotype of *H. v. rimpaii*, originating from both farming systems, was characterized by the significantly highest content of total polyphenols, but only when it was treated with an amino-acid preparation. Similarly to individual phenolic compounds, *H. v. vulgare* did not respond with an increase in the total amount of polyphenols after application of the bio-stimulant in any of the farming systems (Tables 5 and 6).

Pearson's correlation analysis was additionally performed for phenolic compounds and free fatty acids. In conventional barley grains, a positive, moderately strong correlation was noted between phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, and linoleic acid (C18:2). On the other hand, for genotypes cultivated organically, a relationship was found between the listed phenolic compounds and  $\gamma$ -linolenic acid (C18:3, n6) (Table 7).

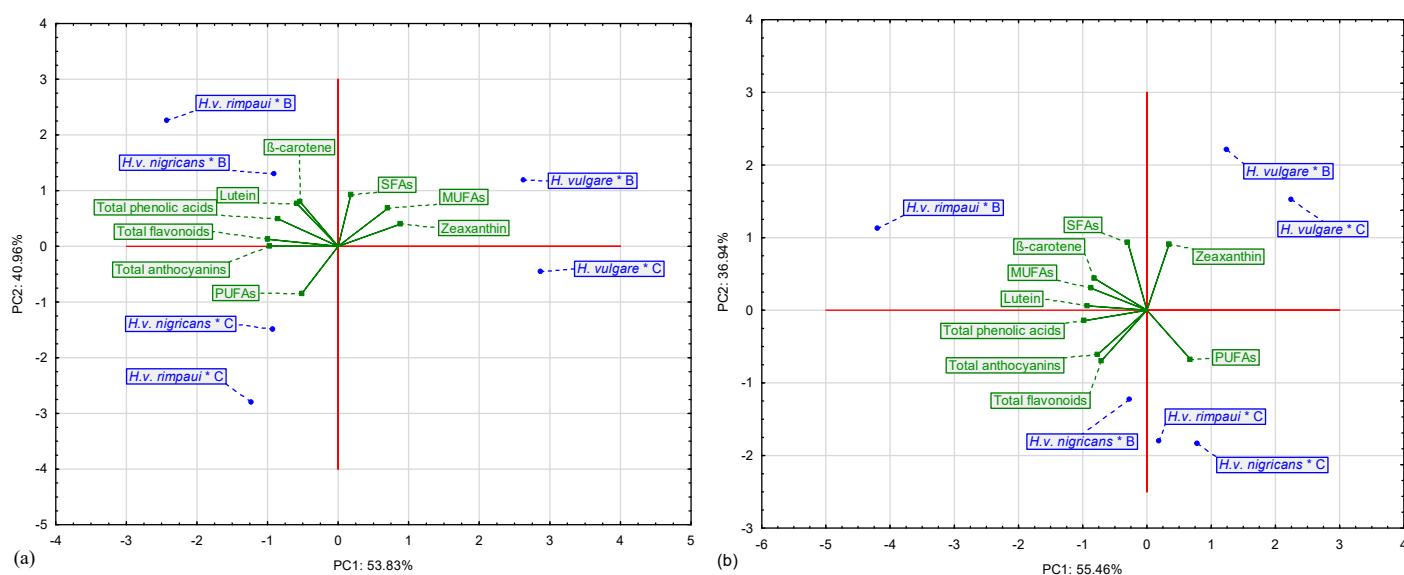
**Table 7.** Pearson’s correlation for phenolic acids, flavonoids, anthocyanidins, total phenols, and chosen PUFA from barley grains.

Phytochemicals	Linoleic Acid (C18:2)		γ-Linolenic Acid (C18:3, n6)	
	Conventional	Organic	Conventional	Organic
Phenolic acids	0.565 *	−0.269	−0.203	0.565 *
Flavonoids	0.578 *	−0.034	−0.200	0.663 *
Anthocyanidins	0.617 *	−0.101	−0.324	0.583 *
Total phenols	0.584 *	−0.342	−0.109	0.615 *

\*—Significant at the  $p < 0.05$  level.

### 3.5. Principal Component Analysis (PCA)

In order to understand the impact of genotype and biostimulant on the concentration of the analyzed biochemical parameters and how plants respond to different growing systems, a principal component analysis (PCA) was conducted. For the conventional system, the biplot (PCA) explained 53.83% of the first principal component (PC1) and 40.96% of the second principal component (PC2) from 94.79% of the total variance, and for the organic farming system, PC1 defined 55.46% and PC2 defined 36.94% from the total 92.40% of the total variance, which means that the variables in both biplots are highly represented by those two components (Figure 9a,b).



**Figure 9.** Biplot principal component analysis (PCA) of biochemical parameters in grains of *H. v. nigricans*, *H. v. rimpai*, and *H. vulgare* from: (a) conventional and (b) organic systems, depending on the foliar biostimulant application. B—biostimulant, C—control. The sign “\*” relates to coexistence of two factors: genotype \* treatment.

In both biplots, the angles between total anthocyanins and total flavonoids, as well as total phenolics, lutein, and β-carotene, are very narrow, which indicates that they are highly correlated. The other directions and wide angles between zeaxanthin or PUFA suggest they both are not correlated with the rest of the dependents. In the PCA analysis for conventional and organic farming, total anthocyanins and total flavonoids, as well as total phenolics, lutein, and β-carotene, together with saturated fatty acids, are better described by PC2; on the contrary, the polyunsaturated fatty acids (PUFA) are represented by PC1. The comparison of PCA for each farming system indicated that only zeaxanthin, in both biplots, is located in the positive PC1 and PC2 side (Figure 9a,b).

*H. vulgare*, treated or non-treated with the biostimulant and from organic and conventional farming, was characterized by the highest concentration of zeaxanthin. *H. v. rimpai* and *H. v. nigricans*, untreated with the biostimulant in conventional and organic farming sys-

tems, separated the PUFAs from other variables. On the negative side of PC1, the alternative genotypes of barley treated with the biostimulant (*H. v. rimpaii* and *H. v. nigricans*) from conventional farming, as well as organic, were characterized by high contents of  $\beta$ -carotene, lutein, total phenolic acids, total flavonoids, and total anthocyanidins. The relationship between SFAs, MUFAs, and genotypes with or without the biostimulant application varies between farming systems (Figure 9a,b).

#### 4. Discussion

The black-grain genotypes *H. v. rimpaii* and *H. v. nigricans* generally gave lower yields than the modern yellow-grain barley *H. vulgare*, but the significance of these differences depended on the year of the study (Figures 1 and 2). A significantly greater variation between the modern genotype and the alternative genotypes was noted, especially in the conventional system and especially in 2021, which was characterized by slightly higher rainfall totals during the growing season (Table S2). This indicates a higher production potential of the modern variety compared to the alternative genotypes, especially under conditions that favor high yields, such as greater water availability and intensive farming. Many researchers believe that wild forms of barley are more tolerant of adverse environmental conditions than modern cultivated varieties [42,43]. However, modern varieties are characterized by a high harvest index, which, according to Simpson and Siddique [44], increases transport of water and nutrients to the ear, resulting in higher yields. These traits may explain the increased differences in yields between genotypes at the potentially better availability of nutrients and water, resulting from the year and cultivation conditions.

The foliar application of the biostimulant had no effect on the grain yield of the genotypes tested. Similar results were obtained by Staugaitis et al. [45], where the application of an amino-acid biostimulant significantly increased the yield of wheat grain only in one of the five years of the study. Under the influence of the foliar biostimulation of plants with amino acids, the macro- and micronutrient content of leaves increased [46] as well as the content of bioactive compounds such as guaiacol peroxidase, having a levelling effect on the effects of environmental stress [47]. The yield-forming effect of such a treatment may, therefore, be mainly due to stress mitigation. During the present study, the plants were treated with the biostimulant at the full stem elongation stage and at ear emergence. The above-mentioned developmental stages occurred in May and June, where in both years of the study, these months were quite heavy with rainfall, which, in itself, may have had a stimulating effect on the plants and obliterated the yield-forming effect of the biostimulant application. Despite the lack of yield-forming effect, the application of the biostimulant had a positive effect on the quality and, especially, the health-promoting characteristics of the barley grain.

In our research, the concentration of individual carotenoid compounds depended on the genotype of the barley. The yellow grain of *H. vulgare* was characterized by the highest concentration of zeaxanthin, which is the pigment that gives the yellow color to plant organs [48]. The *H. v. rimpaii* genotype, grown in both systems, accumulated the most lutein. The content of dominant  $\beta$ -carotene was higher in the dark grains of *H. v. nigricans* and *H. v. rimpaii* compared to *H. vulgare* (Figures 3 and 4). The differences in the content of individual carotenoids among barley genotypes with the different grain colors were also demonstrated by Iannucci et al. [49].

Among the determined carotenoids, the highest content of  $\beta$ -carotene was found in the grain of *H. v. nigricans*, *H. v. rimpaii*, and *H. vulgare*, grown conventionally and organically (Tables 1 and 2). Other researchers indicate that the dominant carotenoid in barley was zeaxanthin [1,50]. The high accumulation of  $\beta$ -carotene in barley grain, shown in our research, may be valuable for consumers as it is a precursor to the synthesis of vitamin A, which is essential for the proper functioning of the body [6].

Under experimental conditions, no significant differences in total carotenoid concentrations were observed between the genotypes of barley cultivated both conventionally and organically. However, it is worth noting the tendency to accumulate more total carotenoids in the grain of *H. v. rimpaii* (Tables 1 and 2). The results of the previous research on the

concentration of total carotenoids in the grains of different colors are ambiguous. Many researchers have indicated that genotypes with colorful grains accumulated higher amounts of total carotenoids than genotypes with common grains. It was observed in purple wheat (interspecific hybrid) [51], as well as in wheat (*Triticum aestivum*) with other colors of grains [52]. On the contrary, Bassolino et al. [53] indicated that common barley and wheat have higher total carotenoid concentrations than barley or wheat with colorful grains. It follows from the above that more comprehensive research would be needed to clarify this issue.

In all studied barley genotypes, the concentration of PUFAs was higher than MUFAs and SFAs (Figures 5 and 6). PUFAs included such free fatty acids as linoleic acid, linolenic acid, or  $\gamma$ -linolenic acid. The second was SFAs, where palmitic and stearic acid are considered. The least share was obtained for MUFAs such as, e.g., oleic acid. These data are in accordance with Liu's previous research, in which different genotypes of barley ('Baronesse' and 'Merlin') were characterized by the highest content of linoleic acid, then palmitic acid, and the lowest amount of oleic acid [54]. It was also similar to other research, where linoleic acid dominated and palmitic acid scored second place [55]. The same pattern could be observed in the study of alternative barley genotypes (*H. v. var. nudum* Hook.) [56]. In general, scientists state that linoleic, linolenic, palmitic, stearic, and oleic acid represent above 90% of the total free fatty acids in cereals, but the composition could differ among cereals and their species or varieties [57]. In our research, it was demonstrated that *H. v. rimpaii* from conventional farming and *H. v. nigricans* from both farming systems accumulated a higher amount of PUFAs than *H. vulgare* (Tables 4 and 5). It could be concluded that some alternative forms of barley can be better in terms of nutritional value, especially when grown organically.

In our study, it was found that black-grain genotypes (*H. v. nigricans*, *H. v. rimpaii*) are characterized by a higher content of total polyphenols than yellow barley (*H. vulgare*) (Figures 7 and 8). Similarly, in the study by Abdel-Aal et al. [58], higher total concentrations of total polyphenols were found in black ('Hongqingluo') and blue ('Huiliqingluo') barley grains compared to common barley. In our study, the majority of the polyphenols in the grain of each of the analyzed genotypes were phenolic acids. Ge et al. [59], while analyzing barley with different colors of kernels, also noticed that black barley concentrated the most polyphenols, including phenolic acids and flavonoids. In our experiment, the primary genotypes *H. v. nigricans* and *H. v. rimpaii* accumulated anthocyanidins, while in the modern cultivar *H. vulgare*, the presence of these compounds was not found (Tables 5 and 6). Similarly, the study by Pereira-Caro et al. [60] found a high concentration of anthocyanidins in rice (*Oryza sativa*) with black grains ('Artemide'), but they were not detected in white rice. Many researchers claim that the colorful genotypes of cereals, due to the higher concentration of various phenolic compounds, have a stronger antioxidant effect than the traditional forms of these species [59,61]. Polyphenols exhibit their antioxidant activity, e.g., in the protection of fat, including unsaturated fatty acids, against free radicals [26], which may explain the significant correlation observed in our experiment between phenolic compounds and linoleic acid for conventionally cultivated plants and linolenic acid for organic barley (Table 7).

A positive correlation between phenols, carotenoids, and SFAs with the PC2 component and a stronger PUFA correlation with the PC1 component may result from negative environmental effects and indicate that plants experience oxidative stress during vegetation. Both phenolic compounds [3] and carotenoids [4] are known for their antioxidant and protective properties, and their metabolism in plants is induced by oxidative stress. Studies on wheat by Ullach et al. [62] show that during drought stress, plants introduce changes also in the fatty acid profile by increasing the content of palmitic acid (SFA) at the expense of linoleic and linolenic acids, while after the drought period, during reconstruction, the proportion of lauric, myristic, palmitic, and stearic acids belonging to the group of saturated acids (SFA) increases. Plants try to repair oxidative damage to plasma membranes by regulating the proportion of fatty acids that perform different functions in the metabolism.

The effect of various types of biostimulants on the yield and quantitative characteristics of cereals is relatively well researched, but there is no detailed research on their impact on grain quality parameters. In our study, which concerns this little-known area, a significant effect of the amino-acid biostimulant on the content of carotenoids, free fatty acids, and polyphenols was demonstrated. The amino acids contained in the applied biostimulant are precursors and activators of many biochemical processes, thus, modulating the amount of individual bioactive compounds contained in the plant [37]. This phenomenon is confirmed by a number of studies conducted on various plants, e.g., in the cultivation of wheat [63]. In soybeans, the application of amino acids contributed to the change in the concentration of carotenoids and the ratio of unsaturated to saturated fatty acids [64] or phenolic acids and flavonoids [65]. In our experiment, a significant increase in the content of carotenoids was observed after the application of the biostimulant (Tables 1 and 2). The foliar application of an amino-acid biostimulant in bean cultivation, in addition to increasing the content of  $\beta$ -carotene, resulted in an increase in the content of flavonoids, anthocyanins, and phenolic acids [65], which was also observed in our study. Biostimulants can also affect free fatty acids because amino acids are a necessary substrate in their biosynthesis [65]. The application of a biostimulant with the addition of amino acids changed the ratio of free fatty acids in favor of polyunsaturated acids in rapeseed [66] and soybean [67]. However, in our own study and an experiment conducted on a hazelnut [68], it was noticed that a biostimulant reduced the amount of PUFAs while increasing the content of saturated and monounsaturated fatty acids (Tables 3 and 4). The obtained differences may result from a different composition of the biostimulants used. The preparation applied in our study, as well as on hazelnut, was based on pure plant amino acids, while the other preparations also contained microelements. Iron is an addition to many biostimulants. It is necessary for the formation of ferredoxin, which plays an important role in NADPH as an electron donor for stearyl desaturase, an enzyme necessary in the formation of unsaturated fatty acids [69]. It can, therefore, be assumed that amino acids themselves affect the change in the composition of free fatty acids, while the direction of changes: saturated–unsaturated, is more significantly affected by other components, e.g., iron. This thesis is confirmed by the study by Tousi et al. [70], where the content of unsaturated fatty acids in soybean significantly increased after the application of a preparation with iron, while after the application of pure amino acids, such a reaction was not proven.

The farming system (organic, conventional) has an impact on the accumulation of biochemical compounds in plants. Although, in our experiment, the content of individual chemical compounds in barley grain from the conventional and organic systems was not subject to a joint statistical analysis, when comparing the effects of different farming systems, a tendency to accumulate larger amounts of carotenoids, phenols, and polyunsaturated fatty acids in grain from organic cultivation can be observed. Comparable results to our own for carotenoids were obtained for local varieties of barley ('Naket') [71], as well as genotypes of colored wheat ('Andriolo', 'Gentil rosso', 'Palesio') [72]. Changing the farming system to organic increased the concentration of phenolic compounds in durum wheat [73], spelt and emmer [74], or Hard Red Wheat [75]. Scientists explain the increased values of phytochemicals in organic grains by changes in metabolism that result from the availability of nitrogen and other important macro-elements in the soil and their mutual ratio [76]. Nitrogen deficiency increases the activity of L-phenylalanine lyase, an enzyme that eliminates ammonia from aromatic amino acids and leads to the synthesis of cinnamic acid, which is a precursor of many phenolic compounds in plants [77]. The content of unsaturated fatty acids also increases due to the limited availability of nitrogen [78].

In addition, many phytochemicals are involved in plant defense responses to biotic and abiotic stresses. This group also includes phenols, carotenoids, and free fatty acids, which are involved in the immune processes of plants, and their synthesis is enhanced in response to the attack of pathogens [79–81]. In organic crops, where pesticides are not used to control pests, a higher accumulation of such compounds is highly desirable. On the other hand, there are many studies that do not prove an increase in the concentration of

phytochemicals in organically grown plants. Studies by Stracke et al. [82] and Konopka et al. [83] showed no statistical difference in carotenoid content between organically and conventionally farmed wheat. In other studies, the type of wheat protection against pathogens (organic or conventional) slightly differentiated the concentration of phenolic compounds or free fatty acids in spelt, maize, and buckwheat [84]. There are also reports of a more favorable effect of conventional cultivation on the content of phenolic acids compared to organic cultivation [85]. However, the higher concentration of bioactive compounds and unsaturated fatty acids in the organic system, which is reported by the meta-analysis of Barański et al. [86], may be the result of the lack of use of industrial production means, which are intended to reduce stress factors for plants. Under the conditions of the limited negative impact of environmental factors, plants are more involved in the production of assimilates, such as proteins, than in the synthesis of bioactive compounds of a defensive nature. The differences in the literature may be due to genotypic, agronomic, or agrotechnical factors [87], which influence the synthesis of biochemical compounds in plants, regardless of the system in which they are grown.

## 5. Conclusions

The black-grain alternative genotypes (*Hordeum vulgare* L. var. *nigricans* (Ser.) Körn and *H. vulgare* L. var. *rimpau* Wittm) and common barley (*H. vulgare* L.) differ in the accumulation of phytochemicals such as carotenoids, fatty acids, and polyphenols in grain. They also dissimilarly react to the foliar application of an amino-acid biostimulant. The composition of health-promoting substances seems to depend also on the farming system.

The biostimulant applied in the black-grain barley genotypes had a beneficial effect on the content of lutein and  $\beta$ -carotene, while without the treatment, they accumulated higher amounts of polyunsaturated fatty acids. In both farming systems, the highest content of these compounds was found in grain *H. v. rimpau* treated with a biostimulant. In turn, common barley (*H. vulgare*), both treated with a biostimulant and untreated, concentrated the highest amounts of zeaxanthin.

It can be concluded that alternative genotypes of black-grain barley could show a higher ability to concentrate health-promoting substances (lutein, total phenolic acids, flavonoids, and anthocyanidins) than common barley and may be a valuable source of health-promoting substances, especially if they are grown organically, but more broad research should be carried out to elucidate that point. The alternative genotypes yielded significantly lower than common barley; the magnitude of the differences, however, depended on the year of cultivation. The biostimulant treatment had no significant effect on the grain yield of the barley genotypes tested.

The obtained results indicate prospects for further studies in the scope of the influence of agrotechnical and environmental factors on the content of bioactive compounds in alternative barley genotypes and clarify the role of fatty acids and phenolic compounds in the defense mechanisms of these plants.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agronomy13071852/s1>, Table S1: Mean temperature and monthly rainfall during in the experimental area in the growing season of 2021 and 2022. Table S2: Mean temperature and monthly rainfall during in the experimental area in the growing.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.N. and M.S.; Methodology, R.N., M.S., J.K.-C., A.P.-B., K.S.-S., J.P., M.B.H. and F.R.; Software, R.N. and K.B.; Validation, R.N. and M.S.; Formal analysis, R.N. and M.S.; Investigation, R.N. and M.S.; Resources, R.N. and M.S.; Data curation, R.N. and M.S.; Writing—original draft, R.N., M.S., K.B., J.K.-C., A.P.-B., K.S.-S., J.P., M.B.H. and F.R.; Writing—review & editing, R.N., M.S., K.B., J.K.-C., A.P.-B., K.S.-S., J.P., M.B.H. and F.R.; Visualization, K.B.; Supervision, R.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.



**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Siebenhandl, S.; Grausgruber, H.; Pellegrini, N.; Del Rio, D.; Fogliano, V.; Pernice, R.; Berghofer, E. Phytochemical Profile of Main Antioxidants in Different Fractions of Purple and Blue Wheat, and Black Barley. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8541–8547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Beleggia, R.; Ficco, D.B.M.; Nigro, F.M.; Giovanniello, V.; Colecchia, S.A.; Pecorella, I.; De Vita, P. Effect of Sowing Date on Bioactive Compounds and Grain Morphology of Three Pigmented Cereal Species. *Agronomy* **2021**, *11*, 591. [[CrossRef](#)]
3. Dang, B.; Zhang, W.-G.; Zhang, J.; Yang, X.-J.; Xu, H.-D. Evaluation of Nutritional Components, Phenolic Composition, and Antioxidant Capacity of Highland Barley with Different Grain Colors on the Qinghai Tibet Plateau. *Foods* **2022**, *11*, 2025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ficco, D.B.M.; Mastrangelo, A.M.; Trono, D.; Borrelli, G.M.; De Vita, P.; Fares, C.; Beleggia, R.; Platani, C.; Papa, R. The Colours of Durum Wheat: A Review. *Crop Pasture Sci.* **2014**, *65*, 1–15. [[CrossRef](#)]
5. Linnewiel-Hermoni, K.; Paran, E.; Wolak, T. Carotenoid Supplements and Consumption: Implications for Healthy Aging. In *Molecular Basis of Nutrition and Aging: A Volume in the Molecular Nutrition Series*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 473–489. [[CrossRef](#)]
6. Tanumihardjo, S.A. Carotenoids: Health Effects. In *Encyclopedia of Human Nutrition*, 3rd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp. 292–297. [[CrossRef](#)]
7. Mińkowski, K. Związki Enolowe Surowców Oleistych—Występowanie oraz Znaczenie Biologiczne—Żywieniowe. *Postępy Nauk. Technol. Przemysłu Rolno-Spożywczego* **2013**, *68*, 109–121.
8. Grajek, W. Przeciwtleniacze w Żywności. In *Aspekty Zdrowotne, Technologiczne, Molekularne i Analityczne*; Wydawnictwa Naukowo-Techniczne: Warszawa, Poland, 2007.
9. Guo, T.; Horvath, C.; Chen, L.; Chen, J.; Zheng, B. Understanding the Nutrient Composition and Nutritional Functions of Highland Barley (Qingke): A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *103*, 109–117. [[CrossRef](#)]
10. Geng, L.; Li, M.; Zhang, G.; Ye, L. Barley: A Potential Cereal for Producing Healthy and Functional Foods. *Food Qual. Saf.* **2022**, *6*, fya012. [[CrossRef](#)]
11. Kaur, N.; Chugh, V.; Gupta, A.K. Essential Fatty Acids as Functional Components of Foods—A Review. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51*, 2289–2303. [[CrossRef](#)]
12. Abdelhamid, A.S.; Martin, N.; Bridges, C.; Brainard, J.S.; Wang, X.; Brown, T.J.; Hanson, S.; Jimoh, O.F.; Ajabnoor, S.M.; Deane, K.H.; et al. Polyunsaturated Fatty Acids for the Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *11*, CD012345. [[CrossRef](#)]
13. Bousquet, M.; Saint-Pierre, M.; Julien, C.; Salem, N.; Cicchetti, F.; Calon, F. Beneficial Effects of Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Toxin Induced Neuronal Degeneration in an Animal Model of Parkinson’s Disease. *FASEB J.* **2008**, *22*, 1213–1225. [[CrossRef](#)]
14. Litman, B.J.; Niu, S.L.; Polozova, A.; Mitchell, D.C. The Role of Docosahexaenoic Acid Containing Phospholipids in Modulating G Protein-Coupled Signaling Pathways: Visual Transduction. *J. Mol. Neurosci.* **2001**, *16*, 237–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hooper, L.; Martin, N.; Jimoh, O.F.; Kirk, C.; Foster, E.; Abdelhamid, A.S. Reduction in Saturated Fat Intake for Cardiovascular Disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2020**, *8*, CD011737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Malik, A.H. Governing Grain Protein Concentration and Composition in Wheat and Barley: Use of Genetic and Environmental Factors. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2012.
17. Strygina, K.V.; Börner, A.; Khlestkina, E.K. Identification and Characterization of Regulatory Network Components for Anthocyanin Synthesis in Barley Aleurone. *BMC Plant Biol.* **2017**, *17*, 184. [[CrossRef](#)]
18. Shoeva, O.Y.; Mock, H.-P.; Kukoeva, T.V.; Börner, A.; Khlestkina, E.K. Regulation of the Flavonoid Biosynthesis Pathway Genes in Purple and Black Grains of *Hordeum vulgare*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Gordeeva, E.I.; Glagoleva, A.Y.; Kukoeva, T.V.; Khlestkina, E.K.; Shoeva, O.Y. Purple-Grained Barley (*Hordeum vulgare* L.): Marker-Assisted Development of NILs for Investigating Peculiarities of the Anthocyanin Biosynthesis Regulatory Network. *BMC Plant Biol.* **2019**, *19*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kim, M.J.; Hyun, J.N.; Kim, J.A.E.; Park, J.C.; Kim, M.Y.; Kim, J.G.; Lee, S.J.; Chun, S.C.; Chung, I.M. Relationship between Phenolic Compounds, Anthocyanins Content and Antioxidant Activity in Colored Barley Germplasm. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4802–4809. [[CrossRef](#)]
21. Tang, Y.; Li, X.; Chen, P.X.; Zhang, B.; Liu, R.; Hernandez, M.; Draves, J.; Marcone, M.F.; Tsao, R. Assessing the Fatty Acid, Carotenoid, and Tocopherol Compositions of Amaranth and Quinoa Seeds Grown in Ontario and their Overall Contribution to Nutritional Quality. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 1103–1110. [[CrossRef](#)]
22. Li, W.; Shan, F.; Sun, S.; Corke, H.; Beta, T. Free Radical Scavenging Properties and Phenolic Content of Chinese Black-Grained Wheat. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8533–8536. [[CrossRef](#)]
23. Liu, M.; Zhu, K.; Yao, Y.; Chen, Y.; Guo, H.; Ren, G.; Yang, X.; Li, J. Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antitumor Activities of Phenolic Compounds from White, Red, and Black Chenopodium Quinoa Seed. *Cereal Chem.* **2020**, *97*, 703–713. [[CrossRef](#)]
24. Jin, H.M.; Dang, B.; Zhang, W.G.; Zheng, W.C.; Yang, X.J. Polyphenol and Anthocyanin Composition and Activity of Highland Barley with Different Colors. *Molecules* **2022**, *27*, 3411. [[CrossRef](#)]

25. Idehen, E.; Tang, Y.; Sang, S. Bioactive phytochemicals in barley. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*, 148–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Shen, Y.; Zhang, H.; Cheng, L.; Wang, L.; Qian, H.; Qi, X. In Vitro and In Vivo Antioxidant Activity of Polyphenols Extracted from Black Highland Barley. *Food Chem.* **2016**, *194*, 1003–1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Özberk, F.; Ozberk, I.; Bayhan, M.; Odabaşoğlu, C. Black Barley Marketing Prices and Profitability vs. White from 2005 to 2015 in South-East Anatolia. *Transylv. Rev.* **2015**, *XXIV*.
28. Feng, X. Analysis of Nutritional Components of Naked Barley under the Ecological Condition of Tibet Plateau. *Fujian J. Agric. Sci.* **2016**, *31*, 1312–1317. [[CrossRef](#)]
29. Rao, S.; Schwarz, L.J.; Santhakumar, A.B.; Chinkwo, K.A.; Blanchard, C.L. Cereal Phenolic Contents as Affected by Variety and Environment. *Cereal Chem. J.* **2018**, *95*, 589–602. [[CrossRef](#)]
30. Dangour, A.D.; Dodhia, S.K.; Hayter, A.; Allen, E.; Lock, K.; Uauy, R. Nutritional Quality of Organic Foods: A Systematic Review. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *90*, 680–685. [[CrossRef](#)]
31. Golijan, J.; Milinčić, D.D.; Petronijević, R.; Pešić, M.; Barac, M.B.; Sečanski, M.; Lekić, S.; Kostić, A.Ž. The Fatty Acid and Triacylglycerol Profiles of Conventionally and Organically Produced Grains of Maize, Spelt and Buckwheat. *J. Cereal Sci.* **2019**, *90*, 102845. [[CrossRef](#)]
32. Brown, P.; Saa, S. Biostimulants in Agriculture. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 671. [[CrossRef](#)]
33. European Biostimulants Industry Council (EBIC). Multiple-Use Components in Plant Biostimulants. 2021. Available online: [https://biostimulants.eu/wp-content/uploads/2021/11/20211104-EBIC-MultipleUse-Position-v11\\_final.pdf](https://biostimulants.eu/wp-content/uploads/2021/11/20211104-EBIC-MultipleUse-Position-v11_final.pdf) (accessed on 4 November 2021).
34. Posmyk, M.M.; Szafrńska, K. Biostimulators: A New Trend towards Solving an Old Problem. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 748. [[CrossRef](#)]
35. Teklić, T.; Parađiković, N.; Špoljarević, M.; Zeljković, S.; Lončarić, Z.; Lisjak, M. Linking Abiotic Stress, Plant Metabolites, Biostimulants and Functional Food. *Ann. Appl. Biol.* **2021**, *178*, 169–191. [[CrossRef](#)]
36. Popko, M.; Michalak, I.; Wilk, R.; Gramza, M.; Chojnacka, K.; Górecki, H. Effect of the New Plant Growth Biostimulants Based on Amino Acids on Yield and Grain Quality of Winter Wheat. *Molecules* **2018**, *23*, 470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Roupheal, Y.; Formisano, L.; Ciriello, M.; Cardarelli, M.; Luziatelli, F.; Ruzzi, M.; Ficca, A.G.; Bonini, P.; Colla, G. Natural Biostimulants as Upscale Substitutes to Synthetic Hormones for Boosting Tomato Yield and Fruits Quality. *Italus Hortus* **2021**, *28*, 88–99. [[CrossRef](#)]
38. Soppelsa, S.; Kelderer, M.; Casera, C.; Bassi, M.; Robatscher, P.; Andreatti, C. Use of Biostimulants for Organic Apple Production: Effects on Tree Growth, Yield, and Fruit Quality at Harvest and during Storage. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Stuper-Szablewska, K.; Buško, M.; Góral, T.; Perkowski, J. The fatty acid profile in different wheat cultivars depending on the level of contamination with microscopic fungi. *Food Chem.* **2014**, *153*, 216–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Stuper-Szablewska, K.; Kurasiak-Popowska, D.; Nawracała, J.; Perkowski, J. Response of non-enzymatic antioxidative mechanisms to stress caused by infection with *Fusarium* fungi and chemical protection in different wheat genotypes. *Chem. Ecol.* **2017**, *33*, 949–962. [[CrossRef](#)]
41. Przybylska-Balcerek, A.; Szablewski, T.; Szwajkowska-Michałek, L.; Świerk, D.; Cegielska-Radziejewska, R.; Krejpcio, Z.; Suchowilska, E.; Tomczyk, Ł.; Stuper-Szablewska, K. Sambucus Nigra Extracts—Natural Antioxidants and Antimicrobial Compounds. *Molecules* **2021**, *26*, 2910. [[CrossRef](#)]
42. Lakew, B.; Eglinton, J.; Henry, R.J.; Baum, M.; Grando, S.; Ceccarelli, S. The potential contribution of wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) germplasm to drought tolerance of cultivated barley (*H. vulgare* ssp. *vulgare*). *Field Crops Res.* **2011**, *120*, 161–168. [[CrossRef](#)]
43. Chen, T.; Li, C.; White, J.; Nan, Z. Effect of the fungal endophyte *Epichloë bromicola* on polyamines in wild barley (*Hordeum brevisubulatum*) under salt stress. *Plant Soil* **2019**, *436*, 29–48. [[CrossRef](#)]
44. Moreira, A.; Moraes, L.A.C. Yield, nutritional status and soil fertility cultivated with common bean in response to amino-acids foliar application. *J. Plant Nutr.* **2017**, *40*, 344–351. [[CrossRef](#)]
45. Simpson, P.G.; Siddique, K.H.M. Soil Type Influences Relative Yield of Barley and Wheat in a Mediterranean-type Environment. *J. Agron. Crop Sci.* **1994**, *172*, 147–160. [[CrossRef](#)]
46. Staugatis, G.; Aleknavičienė, L.; Brazienė, Z.; Marcinkevičius, A.; Paltanavičius, V. The influence of foliar fertilization with nitrogen, sulphur, amino acids and microelements on spring wheat. *Zemdirb.-Agric.* **2017**, *104*, 123–130. [[CrossRef](#)]
47. Harizanova, A.; Koleva-Valkova, L.; Vassilev, A. Effects of the Protein Hydrolysate Pretreatment on Cucumber Plants Exposed to Chilling Stress. *Acta Agrobot.* **2022**, *75*, 1–8. [[CrossRef](#)]
48. Dufossé, L. Microbial Pigments from Bacteria, Yeasts, Fungi, and Microalgae for the Food and Feed Industries. In *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*; Handbook of Food Bioengineering; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 7, pp. 113–132. [[CrossRef](#)]
49. Iannucci, A.; Suriano, S.; Codianni, P. Genetic Diversity for Agronomic Traits and Phytochemical Compounds in Coloured Naked Barley Lines. *Plants* **2021**, *10*, 1575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Masisi, K.; Diehl-Jones, W.L.; Gordon, J.; Chapman, D.; Moghadasian, M.H.; Beta, T. Carotenoids of Aleurone, Germ, and Endosperm Fractions of Barley, Corn and Wheat Differentially Inhibit Oxidative Stress. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 2715–2724. [[CrossRef](#)]

51. Guo, Z.F.; Zhang, Z.B.; Xu, P.; Guo, Y.N. Analysis of Nutrient Composition of Purple Wheat. *Cereal Res. Commun.* **2013**, *41*, 293–303. [[CrossRef](#)]
52. Saini, P.; Kumar, N.; Kumar, S.; Mwaurah, P.W.; Panghal, A.; Attkan, A.K.; Singh, V.K.; Garg, M.K.; Singh, V. Bioactive Compounds, Nutritional Benefits and Food Applications of Colored Wheat: A Comprehensive Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 3197–3210. [[CrossRef](#)]
53. Bassolino, L.; Petroni, K.; Polito, A.; Marinelli, A.; Azzini, E.; Ferrari, M.; Ficco, D.B.M.; Mazzucotelli, E.; Tondelli, A.; Fricano, A.; et al. Does Plant Breeding for Antioxidant-Rich Foods Have an Impact on Human Health? *Antioxidants* **2022**, *11*, 794. [[CrossRef](#)]
54. Liu, K. Comparison of Lipid Content and Fatty Acid Composition and Their Distribution within Seeds of 5 Small Grain Species. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, 334–342. [[CrossRef](#)]
55. Qian, J.; Jiang, S.; Su, W.; Gao, P. Characteristics of Oil from Hulless Barley (*Hordeum vulgare* L.) Bran from Tibet. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, *86*, 1175. [[CrossRef](#)]
56. Xu, F.; Dang, B.; Yang, X.; Wu, K.; Chi, D. Evaluation of Nutritional Quality of Different Hulless Barleys. *J. Triticeae Crops* **2016**, *36*, 1249–1257. [[CrossRef](#)]
57. Relina, L.I.; Suprun, O.H.; Boguslavskiy, R.L.; Didenko, S.Y.; Vecherska, L.A.; Golik, O.V. Fatty Acid Composition of Oil from Grain of Some Tetraploid Wheat Species. *Biotechnol. Acta* **2020**, *13*, 56–64. [[CrossRef](#)]
58. Abdel-Aal, E.S.M.; Choo, T.M.; Dhillon, S.; Rabalski, I. Free and Bound Phenolic Acids and Total Phenolics in Black, Blue, and Yellow Barley and Their Contribution to Free Radical Scavenging Capacity. *Cereal Chem.* **2012**, *89*, 198–204. [[CrossRef](#)]
59. Ge, X.; Jing, L.; Zhao, K.; Su, C.; Zhang, B.; Zhang, Q.; Han, L.; Yu, X.; Li, W. The Phenolic Compounds Profile, Quantitative Analysis and Antioxidant Activity of Four Naked Barley Grains with Different Color. *Food Chem.* **2021**, *335*, 127655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Pereira-Caro, G.; Cros, G.; Yokota, T.; Crozier, A. Phytochemical Profiles of Black, Red, Brown, and White Rice from the Camargue Region of France. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 7976–7989. [[CrossRef](#)]
61. Bellido, G.G.; Beta, T. Anthocyanin Composition and Oxygen Radical Scavenging Capacity (Orac) of Milled and Pearled Purple, Black, and Common Barley. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1022–1028. [[CrossRef](#)]
62. Ullah, S.; Khan, M.N.; Lodhi, S.S.; Ahmad, I.; Tayyab, M.; Mehmood, T.; Din, I.U.; Khan, M.; Sohali, Q.; Akram, M. Targeted metabolomics reveals fatty acid abundance adjustments as playing a crucial role in drought-stress response and post-drought recovery in wheat. *Front. Genet. Sec. Plant Genom.* **2022**, *13*, 972696. [[CrossRef](#)]
63. Szpunar-Krok, E.; Depciuch, J.; Drygaś, B.; Jańczak-Pieniążek, M.; Mazurek, K.; Pawlak, R. The Influence of Biostimulants Used in Sustainable Agriculture for Antifungal Protection on the Chemical Composition of Winter Wheat Grain. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 12998. [[CrossRef](#)]
64. Abd El-Aal, M.M.M.; Eid, R.S.M. Effect of Foliar Spray with Lithovit and Amino Acids on Growth, Bioconstituents, Anatomical and Yield Features of Soybean Plant. *Ann. Agric. Sci. Moshthohor* **2018**, *56*, 187–201. [[CrossRef](#)]
65. Kocira, S.; Szparaga, A.; Hara, P.; Treder, K.; Findura, P.; Bartoš, P.; Filip, M. Biochemical and Economical Effect of Application Biostimulants Containing Seaweed Extracts and Amino Acids as an Element of Agroecological Management of Bean Cultivation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17759. [[CrossRef](#)]
66. He, M.; Qin, C.; Wang, X.; Ding, N. Plant Unsaturated Fatty Acids: Biosynthesis and Regulation. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 390. [[CrossRef](#)]
67. Petrova, I.; Ivanova, S.; Stoyanova, S.; Mincheva, R.; Pavlova, M. Influence of Biostimulants and Humic Extracts Treatment on the Fatty Acid Profile of the Spring Oilseed Rape Variety. *J. Agric. Sci. Technol.* **2023**, *15*, 52–59. [[CrossRef](#)]
68. Szparaga, A.; Kocira, S.; Findura, P.; Kapusta, I.; Zaguła, G.; Świeca, M. Uncovering the Multi-Level Response of *Glycine max* L. to the Application of Allelopathic Biostimulant from *Levisticum officinale* Koch. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 15360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Pascoalino, L.A.; Reis, F.S.; Barros, L.; Rodrigues, M.Â.; Correia, C.M.; Vieira, A.L.; Ferreira, I.C.F.R.; Barreira, J.C.M. Effect of Plant Biostimulants on Nutritional and Chemical Profiles of Almond and Hazelnut. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 7778. [[CrossRef](#)]
70. Marschner, H. Functions of Mineral Nutrients: Micronutrients. In *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd ed.; Academic Press: London, UK, 1995; pp. 313–404.
71. Tousi, P.; Tajbakhsh, M.; Esfahani, M. Effect of Spray Application of Nano-Fe Chelate, Amino Acid Compounds and Magnetic Water on Protein Content and Fatty Acids Composition of Oil of Soybean (*Glycine max*) in Different Harvest Time. *Iran. J. Crop Sci.* **2014**, *16*, 125–136.
72. Hussain, A.; Larsson, H.; Johansson, E. Carotenoid Extraction from Locally and Organically Produced Cereals Using Saponification Method. *Processes* **2021**, *9*, 783. [[CrossRef](#)]
73. Di Silvestro, R.; Di Loreto, A.; Bosi, S.; Bregola, V.; Marotti, I.; Benedettelli, S.; Segura-Carretero, A.; Dinelli, G. Environment and Genotype Effects on Antioxidant Properties of Organically Grown Wheat Varieties: A 3-Year Study. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 641–649. [[CrossRef](#)]
74. Pandino, G.; Mattiolo, E.; Lombardo, S.; Lombardo, G.M.; Mauromicale, G. Organic Cropping System Affects Grain Chemical Composition, Rheological and Agronomic Performance of Durum Wheat. *Agriculture* **2020**, *10*, 46. [[CrossRef](#)]
75. Fares, C.; Menga, V.; Codianni, P.; Russo, M.; Perrone, D.; Suriano, S.; Savino, M.; Rascio, A. Phenolic Acids Variability and Grain Quality of Organically and Conventionally Fertilised Old Wheats under a Warm Climate. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 4615–4623. [[CrossRef](#)]

76. Tian, W.; Jaenisch, B.; Gui, Y.; Hu, R.; Chen, G.; Lollato, R.P.; Li, Y. Effect of Environment and Field Management Strategies on Phenolic Acid Profiles of Hard Red Winter Wheat Genotypes. *J. Sci. Food Agric.* **2022**, *102*, 2424–2431. [[CrossRef](#)]
77. Gałązka, A. Conversion of phenolic compounds and the role of L-phenylalanine ammonia lyase (PAL) in the induction of plant defense mechanism. *Pol. J. Agron.* **2011**, *15*, 83–88.
78. Abd EL-Satar, M.A.; Ahmed, A.A.E.H.; Hassan, T.H.A. Response of seed yield and fatty acid compositions for some sunflower genotypes to plant spacing and nitrogen fertilization. *Inf. Process. Agric.* **2017**, *4*, 241–252. [[CrossRef](#)]
79. Buczek, J.; Jańczak-Pieniążek, M.; Harasim, E.; Kwiatkowski, C.A.; Kapusta, I. Effect of Cropping Systems and Environment on Phenolic Acid Profiles and Yielding of Hybrid Winter Wheat Genotypes. *Agriculture* **2023**, *13*, 834. [[CrossRef](#)]
80. Bhattacharya, A.; Sood, P.; Citovsky, V. The Roles of Plant Phenolics in Defence and Communication during Agrobacterium and Rhizobium Infection. *Mol. Plant Pathol.* **2010**, *11*, 585–719. [[CrossRef](#)]
81. Swapnil, P.; Meena, M.; Singh, S.K.; Dhuldhaj, U.P.; Harish; Marwal, A. Vital Roles of Carotenoids in Plants and Humans to Deteriorate Stress with its Structure, Biosynthesis, Metabolic Engineering and Functional Aspects. *Curr. Plant Biol.* **2021**, *26*, 100203. [[CrossRef](#)]
82. He, M.; Ding, N.-Z. Plant Unsaturated Fatty Acids: Multiple Roles in Stress Response. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 562785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Stracke, B.A.; Eitel, J.; Watzl, B.; Mäder, P.; Rüfer, C.E. Influence of the Production Method on Phytochemical Concentrations in Whole Wheat (*Triticum aestivum* L.): A Comparative Study. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *57*, 10116–10121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Konopka, I.; Tańska, M.; Faron, A.; Stępień, A.; Wojtkowiak, K. Comparison of the Phenolic Compounds, Carotenoids and Tocochromanols Content in Wheat Grain under organic and Mineral Fertilization Regimes. *Molecules* **2012**, *17*, 12341–12356. [[CrossRef](#)]
85. Park, E.Y.; Baik, B.K.; Miller, P.R.; Burke, I.C.; Wegner, E.A.; Tautges, N.E.; Morris, C.F.; Fuerst, E.P. Functional and Nutritional Characteristics of Wheat Grown in Organic and Conventional Cropping Systems. *Cereal Chem.* **2015**, *92*, 504–512. [[CrossRef](#)]
86. Barański, M.; Średnicka-Tober, D.; Volakakis, N.; Seal, C.; Sanderson, R.; Stewart, G.B.; Benbrook, C.; Biavati, B.; Markellou, E.; Giotis, C.; et al. Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: A systematic literature review and meta-analyses. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 794–811. [[CrossRef](#)]
87. Mikołajczak, N.; Tańska, M.; Ogrodowska, D. Phenolic Compounds in Plant Oils: A Review of Composition, Analytical Methods, and Effect on Oxidative Stability. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *113*, 110–138. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej

mgr inż. Rafał Nowak  
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko autora rozprawy doktorskiej)

Politechnika Bydgoska  
Im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich,  
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii,  
Katedra Agronomii  
Al. Prof. Sylwestra Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz

(miejsce pracy/afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej był następujący\*:

1. Szczepanek M., **Nowak R.**, Błaszczuk K. Physiological and Agronomic Characteristics of Alternative Black Barley Genotypes (*Hordeum vulgare* var. *nigricans* and *H. v.* var. *rimpau*) under Different Hydrothermal Conditions of the Growing Seasons. *Agriculture*, 2023, 13, 2033. <https://doi.org/10.3390/agriculture13102033>pkt., **140 pkt. MNiSW, IF 3,6.**

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu:

Współdział w pisaniu i edycji manuskryptu, doborze i walidacji metod badawczych, prowadzenie doświadczeń polowych, wykonywanie pomiarów fizjologicznych (fluorescencja chlorofilu, indeks zieloności liścia), morfologicznych i biometrycznych roślin (powierzchnia asymilacyjna LAI, sucha masa roślin w fazie kwitnienia, liczba kłosów płodnych i płonnych, ocena elementów struktury plonowania, ocena plonu ziarna, słomy, biomasy roślin i indeksu żniwnego, przechowywanie danych, co stanowi **40%** indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. **Nowak R.**, Szczepanek M., Kobus-Cisowska J., Stuper-Szablewska K., Dziędziński M., Błaszczuk K. Profile of phenolic compounds and antioxidant activity of organically and conventionally grown black-grain barley genotypes treated with biostimulant, *PLOS ONE*, 2023 18, 7, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428>, **100 pkt. MNiSW, IF 3,7.**

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu:

Współdział w opracowaniu koncepcji badań, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, współdział w opracowaniu metodologii badań, analiza statystyczna wyników, przechowywanie danych, założenie i prowadzenie ścisłych doświadczeń polowych, przygotowanie materiału roślinnego, przygotowanie prób do analizy chromatograficznej i współdział w przeprowadzeniu analiz, przeprowadzenie oceny laboratoryjnej potencjału antyoksydacyjnego ziarna, wizualizacja wyników, pozyskanie funduszy na badania, nadzór nad projektem, współdział w doborze i

---

\* W przypadku prac dywu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

walidacji metod badawczych, co stanowi 65% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

3. **Nowak R.**, Szczepanek M., Błaszczuk K., Kobus-Cisowska J., Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., Pobereżny J., Hassanpouraghdam MB., Rasouli F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. *Agronomy*, 2023, 13, 7, 1852. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071852>, **140 pkt. MNiSW, IF 3,7.**

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu:

Współdział w opracowaniu koncepcji badań, pisaniu i edycji manuskryptu, opracowaniu, doborze i walidacji metod badawczych, analizie statystycznej i merytorycznej wyników, przygotowanie materiałów, przechowywanie danych, wykonanie doświadczeń polowych i ocena plonowania, przygotowanie prób do analizy chromatograficznej, pozyskanie funduszy na badania i nadzór nad projektem, co stanowi 60% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Bydgoszcz, 16.05.2024r.

miejsowość, data

Rafał Nowak

Podpis Autora rozprawy doktorskiej

Joopoude Kępcoude

Podpis promotora

# Oświadczenie Współautora

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Aldona Szczepanek

(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska  
Im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich,  
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii,  
Katedra Agronomii  
Al. Prof. Sylwestra Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz

(miejsce pracy/afiliacja)

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym/wymienionych artykule/artykułach naukowym/naukowych był następujący\*:

1. Szczepanek M., Nowak R., Błaszczyk K. Physiological and Agronomic Characteristics of Alternative Black Barley Genotypes (*Hordeum vulgare* var. *nigricans* and *H. v. var. rimpai*) under Different Hydrothermal Conditions of the Growing Seasons. *Agriculture*, 2023, 13, 2033. <https://doi.org/10.3390/agriculture13102033>pkt., 140 pkt. MNiSW , IF 3,6.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

Opracowanie koncepcji badań, współdział w opracowaniu i walidacji metod badawczych dotyczących pomiarów cech biometrycznych, współdział w analizie wyników w zakresie cech biometrycznych roślin, współdział w pisaniu i edycji pracy, co stanowi 45% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. Nowak R., Szczepanek M., Kobus-Cisowska J., Stuper-Szablewska K., Dziędziński M., Błaszczyk K. Profile of phenolic compounds and antioxidant activity of organically and conventionally grown black-grain barley genotypes treated with biostimulant, *PLOS ONE*, 2023 18, 7, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428>, 100 pkt. MNiSW, IF 3,7.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

Współdział w opracowaniu metodologii badań – współdział w doborze właściwego układu doświadczenia i wyznaczenia terminów zabiegów agrotechnicznych, współdział w przeglądzie i edycji pracy, co stanowi 15% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

3. Nowak R., Szczepanek M., Błaszczyk K., Kobus-Cisowska J., Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., Pobereźny J., Hassanpouraghdam MB., Rasouli F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and

---

\* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. *Agronomy*, 2023, 13, 7, 1852.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy13071852>, 140 pkt. MNiSW, IF 3,7.

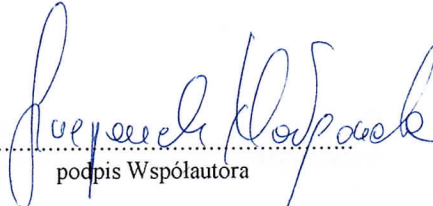
Wykonane zadania w ramach artykułu:

Współdział w opracowaniu koncepcji pracy, współdział w opracowaniu i walidacji metod badawczych w zakresie prowadzenia doświadczeń polowych, współdział w prowadzeniu badań i analizie wyników, współdział w pisaniu i edycji pracy, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez **mgr inż. Rafała Nowaka** jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz 15.05.2024

.....  
miejsowość, data

  
.....  
podpis Współautora



## Oświadczenie Współautora

mgr inż. Karolina Błaszczuk

(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska  
Im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich,  
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii,  
Katedra Agronomii  
Al. Prof. Sylwestra Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz

(miejsce pracy/afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym/wymienionych artykule/artykułach naukowym/naukowych był następujący\*:

1. Szczepanek M., Nowak R., Błaszczuk K. Physiological and Agronomic Characteristics of Alternative Black Barley Genotypes (*Hordeum vulgare* var. *nigricans* and *H. v.* var. *rimpai*) under Different Hydrothermal Conditions of the Growing Seasons. *Agriculture*, 2023, 13, 2033. <https://doi.org/10.3390/agriculture13102033>pkt., 140 pkt. MNiSW , IF 3,6.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

Współdział w pisaniu i edycji pracy w zakresie przeglądu literatury, wizualizacja wyników, co stanowi 15% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. Nowak R., Szczepanek M., Kobus-Cisowska J., Stuper-Szablewska K., Dziędziński M., Błaszczuk K. Profile of phenolic compounds and antioxidant activity of organically and conventionally grown black-grain barley genotypes treated with biostimulant, *PLOS ONE*, 2023 18, 7, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428>, 100 pkt. MniSW, IF 3,7.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

Współdział w przeprowadzeniu badań – udział w zbiorze ziarna i przygotowaniu prób do analizy laboratoryjnej, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej pracy.

3. Nowak R., Szczepanek M., Błaszczuk K., Kobus-Cisowska J., Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., Pobereżny J., Hassanpouraghdam MB., Rasouli F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. *Agronomy*, 2023, 13, 7, 1852. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071852>, 140 pkt. MNiSW, IF 3,7.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

---

\* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Współdział w pisaniu i edycji pracy w zakresie przeglądu literatury, wizualizacja wyników, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez **mgr inż. Rafała Nowaka** jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 25.04.2024r.  
miejsowość, data

Blaszczyk Karolina  
pódpis Współautora

## Oświadczenie Współautora

Prof. dr hab. inż. Kinga Stuper-Szablewska

(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Wydział Leśny i Technologii Drewna  
Katedra Chemii  
Ul. Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań

(miejsce pracy/afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych był następujący\*:

Wykonane zadania w ramach artykułu:

1. Nowak R, Szczepanek M., Kobus-Cisowska J., Stuper-Szablewska K., Dziedziński M., Błaszczyk K. Profile of phenolic compounds and antioxidant activity of organically and conventionally grown black-grain barley genotypes treated with biostimulant, PLOS ONE, 2023 18, 7, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428>, 100 pkt. MNiSW, IF 3,7.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

Współdział w walidacji metod badawczych w zakresie analiz chromatograficznych i współdział w wykonaniu badań tymi metodami, co stanowi 5% indywidualnego wkładu własnego w przygotowaniu wyżej wymienionej pracy.

2. Nowak R., Szczepanek M., Błaszczyk K., Kobus-Cisowska J., Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., Pobereżny J., Hassanpouraghdam MB., Rasouli F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. Agronomy, 2023, 13, 7, 1852. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071852>, 140 pkt. MNiSW, IF 3,7.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

Współdział w walidacji metod badawczych w zakresie analiz chromatograficznych oraz opisie tych metod w pracy, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez **mgr inż. Rafała Nowaka** jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

---

\* W przypadku prac dwu- lub wieloautorских wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiei itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Poznań; 23.04.2024  
.....  
miejsowość, data

Styja - Szałka Kinga  
.....  
podpis Współautora

## Oświadczenie Współautora

Prof. dr hab. inż. Joanna Kobus-Cisowska

(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Katedra Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej  
Ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań

(miejsce pracy/afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych był następujący\*:

Wykonane zadania w ramach artykułu:

1. Nowak R., Szczepanek M., Kobus-Cisowska J., Stuper-Szablewska K., Dziedziński M., Błaszczak K. Profile of phenolic compounds and antioxidant activity of organically and conventionally grown black-grain barley genotypes treated with biostimulant, PLOS ONE, 2023 18, 7, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428>, 100 pkt. MNiSW, IF 3,7.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

Współdział w opracowaniu metodologii badań w zakresie aktywności przeciwutleniającej ziarna i opisie tej metody w pracy, co stanowi 5% indywidualnego wkładu własnego w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. Nowak R., Szczepanek M., Błaszczak K., Kobus-Cisowska J., Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., Pobereżny J., Hassanpouraghdam MB., Rasouli F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. Agronomy, 2023, 13, 7, 1852. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071852>, 140 pkt. MNiSW, IF 3,7.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

Współdział w walidacji metod badawczych w zakresie oceny polifenoli oraz opisie tej metody w pracy, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez **mgr inż. Rafała Nowaka** jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

23.04.2024



\* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

## Co-author's Declaration

Mohammad Bagher Hassanpouraghdam PhD

(Professional title, name(s) and surname of the Co-author)

Mohammad Bagher Hassanpouraghdam, Associate professor

University of Maragheh,  
Faculty of Agriculture,  
Department of Horticultural Science  
Maragheh 55181-83111, Iran

(Workplace affiliation)

University of Maragheh, Iran

### DECLARATION

I declare that my author's contribution to the journal article mentioned below was as follows\*:

1. Nowak R., Szczepanek M., Błaszczyk K., Kobus-Cisowska J., Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., Pobereżny J., Hassanpouraghdam MB., Rasouli F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. *Agronomy*, 2023, 13, 7, 1852. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071852>, 140 pkt. MNiSW, IF 3.7.

Tasks completed as part of the article:

Contribution in the validation in laboratory methods of determination of carotenoids and contribution to the description of the method in this aspects in the paper, accounting for 5% of the individual contribution to the above-mentioned publication.

At the same time, I hereby agree to the submission of the above-mentioned paper by mgr inż. Rafał Nowak as part of the doctoral dissertation based on a collection of published and thematically related scientific papers.

Place, date

April, 23, 2024

Co-author's signature

MB. H.

\* In the case of two- or multi-author papers, declarations of a candidate for the doctoral degree and co-authors are required, indicating their substantive contribution to the creation of each paper (e.g. the creator of the research hypothesis, the originator of the research, performance of specific research - e.g. carrying out particular experiments, developing and collecting questionnaires, etc., analysis of the results, preparation of the article manuscript and others). Identification of the contribution of a given author (including a candidate for the doctoral degree, should be precise enough to allow for an accurate assessment of his/her participation and role in the creation of each paper.

## Co-author's Declaration

Farzad Rasouli PhD

(Professional title, name(s) and surname of the Co-author)

University of Maragheh,  
Faculty of Agriculture,  
Department of Horticultural Science  
Maragheh 55181-83111, Iran

(Workplace/affiliation)

### DECLARATION

I declare that my author's contribution to the journal article mentioned below was as follows\*:

1. Nowak R., Szczepanek M., Błaszczuk K., Kobus-Cisowska J., Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., Pobereżny J., Hassanpouraghdam MB., Rasouli F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. *Agronomy*, 2023, 13, 7, 1852. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071852>, 140 pkt. MNiSW, IF 3,7.

Tasks completed as part of the article:

Contribution in the validation in laboratory methods of determination of fatty acids and contribution to the description of the method in this aspects in the paper, accounting for 5% of the individual contribution to the above-mentioned publication.

At the same time, I hereby agree to the submission of the above-mentioned paper by mgr inż. Rafał Nowak as part of the doctoral dissertation based on a collection of published and thematically related scientific papers.

4.23.2024

Place, date



Co-author's signature

\* In the case of two- or multi-author papers, declarations of a candidate for the doctoral degree and co-authors are required, indicating their substantive contribution to the creation of each paper (e.g. the creator of the research hypothesis, the originator of the research, performance of specific research – e.g. carrying out particular experiments, developing and collecting questionnaires, etc., analysis of the results, preparation of the article manuscript and others). Identification of the contribution of a given author, including a candidate for the doctoral degree, should be precise enough to allow for an accurate assessment of his/her participation and role in the creation of each paper.

## Oświadczenie Współautora

Dr hab. inż. Jarosław Pobereżny Prof. PBS

(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska  
Im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich,  
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii,  
Katedra Mikrobiologii i Technologii Żywności  
Al. Prof. Sylwestra Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz

(miejsce pracy/afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym artykule naukowym był następujący\*:

Wykonane zadania w ramach artykułu:

1. Nowak R., Szczepanek M., Błaszczuk K., Kobus-Cisowska J., Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., Pobereżny J., Hassanpouraghdam MB., Rasouli F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. *Agronomy*, 2023, 13, 7, 1852. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071852>, 140 pkt. MNiSW, IF 3,7.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

Współdział w walidacji metod badawczych w zakresie oceny zawartości karotenoidów oraz opisie tej metody w pracy, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez **mgr inż. Rafała Nowaka** jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

BYDGOSZCZ 23.04.2024

.....  
miejsce, data

  
.....  
podpis Współautora

\* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.



## Oświadczenie Współautora

Dr inż. Anna Przybylska-Balcerek

(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Wydział Leśny i Technologii Drewna  
Katedra Chemii  
Ul. Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań

(miejsce pracy/afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym artykule naukowym był następujący\*:

Wykonane zadania w ramach artykułu:

1. Nowak R., Szczepanek M., Błaszczuk K., Kobus-Cisowska J., Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., Pobereżny J., Hassanpouraghdam MB., Rasouli F. Impact of the Farming System and Amino-Acid Biostimulants on the Content of Carotenoids, Fatty Acids, and Polyphenols in Alternative and Common Barley Genotypes. *Agronomy*, 2023, 13, 7, 1852. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071852>, 140 pkt. MNiSW, IF 3,7.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

Współdziałał w walidacji metod badawczych w zakresie oceny zawartości kwasów tłuszczowych w ziarnie oraz opisaniu tej metody w pracy, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez **mgr inż. Rafała Nowaka** jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

*Opznanaw 23.04.2024*

miejsce, data

*Anna Przybylska-Balcerek*

podpis Współautora

\* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

## Oświadczenie Współautora

Dr inż. Marcin Dziedziński

(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Katedra Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej  
Ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań

(miejsce pracy/afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym artykule naukowym był następujący\*:

Wykonane zadania w ramach artykułu:

1. Nowak R, Szczepanek M., Kobus-Cisowska J., Stuper-Szablewska K., Dziedziński M., Błaszczak K. Profile of phenolic compounds and antioxidant activity of organically and conventionally grown black-grain barley genotypes treated with biostimulant, PLOS ONE, 2023 18, 7, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288428>, 100 pkt. MNiSW, IF 3,7.

Wykonane zadania w ramach artykułu:

Współdział w przeprowadzeniu badań w zakresie oceny aktywności przeciwutleniającej ziarna, co stanowi 5% indywidualnego wkładu własnego w przygotowaniu wyżej wymienionej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez **mgr inż. Rafała Nowaka** jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Poznań, 24.04.24

.....  
miejsce, data

Marcin Dziedziński

.....  
podpis Współautora

\* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.