

Janina Ś w i e t l i c k a - G r a l a
i Bogumir G r a l a (Poznań)

ZASTOSOWANIE ANALIZY PROFILOWEJ W DOŚWIADCZENIACH ROLNICZYCH

W doświadczalnictwie rolniczym szczególną pozycję zajmują doświadczenia, w których na tych samych jednostkach doświadczalnych sklasyfikowanych jednokierunkowo względem k obiektów wykonuje się po p pomiarów odpowiadających p różnym warunkom przestrzennym lub czasowym.

Weźmy jako przykład doświadczenie wazonowe wykonane w Instytucie Genetyki i Hodowli Roślin PAN w Poznaniu, mające na celu porównanie rozwoju mutantów seradeli powstałych po podziałaniu na nasiona seradeli odmiany bydgoskiej różnych stężeń mutagenów E i N (E - ester etylowy kwasu metanosulfonowego, N - nitroso-metylomocznik). Zastosowano 9 stężeń mutagenów E i N i przeprowadzono obserwacje wysokości siewek po 40, 54, 60 dniach w 4 wazonach dla każdego stężenia.

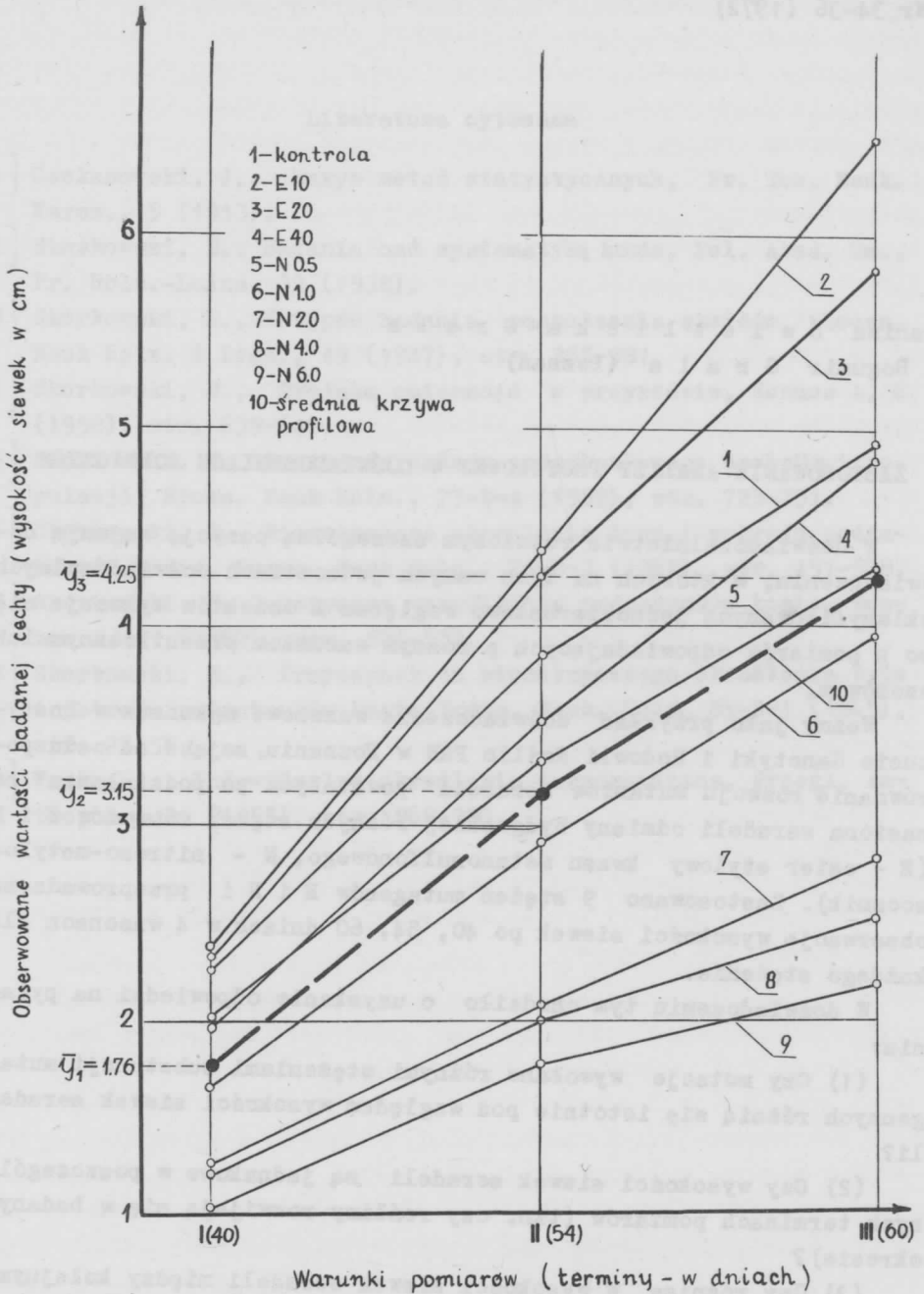
W doświadczeniu tym chodziło o uzyskanie odpowiedzi na pytania:

(1) Czy mutacje wywołane różnymi stężeniami substancji mutagennych różnią się istotnie pod względem wysokości siewek seradeli?

(2) Czy wysokości siewek seradeli są jednakowe w poszczególnych terminach pomiarów (tzn. czy rośliny rozwijają się w badanym okresie)?

(3) Czy różnice w wysokości siewek seradeli między kolejnymi terminami są jednakowe dla wszystkich stężeń?

Odpowiedź na pytanie (1) uzyskamy, jeśli sprawdzimy hipotezę, że nie ma różnic między średnimi uzyskanymi dla poszczególnych



Rys. 1. Krzywe profilowe uzyskane dla średnich wysokości siewek seradeli w poszczególnych terminach

stężenia mutagenów średnio z trzech terminów pomiarów. Aby odpowiedzieć na pytanie (2) należy sprawdzić hipotezę, że średnie dla terminów pomiarów, wyliczone ze wszystkich stężeń mutagenów, nie różnią się istotnie. Wreszcie, sprawdzenie hipotezy, że nie ma interakcji mutagenów z terminami pomiarów da nam odpowiedź na pytanie (3).

Jeśli przez y_{ijh} ($i = 1, \dots, N_j$; $j = 1, \dots, k$; $h = 1, \dots, p$) oznaczmy obserwację dla h -tego pomiaru i -tej jednostki doświadczalnej j -tego obiektu, to matematyczny model wzrostu siewek seradeli zapiszemy w postaci funkcji liniowej

$$(1) \quad y_{ijh} = \mu_h + \alpha_{jh} + e_{ijh},$$

gdzie μ_h oznacza ogólny wzrost siewek dla h -tego terminu pomiaru, α_{jh} - wpływ j -tego stężenia mutagenów na wysokość siewek mierzoną w h -tym terminie pomiaru, e_{ijh} - błąd losowy związany z (ijh) -tą kombinacją stężeń mutagenów i terminów pomiarów. Zakładamy przy tym, że wektor $\underline{e}_{ij} = [e_{ij1}, \dots, e_{ijp}]$ przedstawiający błędy losowe pomiarów i -tej jednostki j -tego obiektu ma p -wymiarowy rozkład normalny o wektorze wartości oczekiwanych $\underline{0}$ i nieznannej macierzy kowariancji $\sum e$, jednakowo dla wszystkich i oraz j .

Analiza doświadczeń tego typu polega na porównywaniu tzw. krzywych profilowych przedstawionych na rysunku 1.

Testowanie hipotezy o braku istotności interakcji obiektów z warunkami pomiarów polega na testowaniu hipotezy, że krzywe profilowe uzyskane dla obiektów są równoległe. Hipotezę tę można zapisać w postaci

$$(2) \quad H_{03} : \begin{bmatrix} \alpha_{11} & \dots & -\alpha_{1p} \\ \dots & \dots & \dots \\ \alpha_{1, p-1} & \dots & -\alpha_{1p} \end{bmatrix} = \dots = \begin{bmatrix} \alpha_{k1} & \dots & -\alpha_{kp} \\ \dots & \dots & \dots \\ \alpha_{k, p-1} & \dots & -\alpha_{kp} \end{bmatrix},$$

lub w postaci $H_{03} : \underline{C} \underline{\xi} \underline{M} = \underline{0}$, gdzie \underline{C} o $k-1$ wierszach i $k+1$ kolumnach jest macierzą rzędu $k-1$, której liniowo niezależne wiersze określają związki między wierszami macierzy nieznanych parametrów $\underline{\xi}$ (tzn. między obiektami), przy czym

$$(3) \quad \underline{\xi} = [\xi_1, \dots, \xi_p], \quad \xi'_h = [\mu_h, \alpha_{1h}, \dots, \alpha_{kh}], \quad h = 1, \dots, p.$$

Macierz \underline{M} (o p wierszach i $p-1$ kolumnach) rzędu $p-1$ umożliwia sformułowanie hipotez dotyczących związków między kolumnami macierzy $\underline{\xi}$ (a więc między zmiennymi).

Hipotezę, że nie ma różnic między pomiarami wziętymi średnio

Ogólny wielozmienny model liniowy analizy wariancji (ang. MANOVA) można wówczas zapisać następująco:

$$(9) \quad \underline{Y} = \underline{X} \underline{\xi} + \underline{\epsilon}$$

gdzie \underline{Y} o N wierszach i p kolumnach jest macierzą obserwacji, a pozostałe macierze mają taką interpretację jak poprzednio. Hipotezę H_{03} można, przy tym modelu, testować używając statystyki Λ Wilksa określonej wzorem

$$(10) \quad \Lambda = \frac{|\underline{E}|}{|\underline{H} + \underline{E}|},$$

gdzie

$$\underline{H} = \underline{M}' \underline{S}_H \underline{M} = \underline{M}' \underline{Y}' \underline{X}_1 (\underline{X}_1' \underline{X}_1)^{-1} \underline{C}_1' \left[\underline{C}_1 (\underline{X}_1' \underline{X}_1)^{-1} \underline{C}_1' \right]^{-1} \underline{C}_1 (\underline{X}_1' \underline{X}_1)^{-1} \underline{X}_1' \underline{Y} \underline{M},$$

$$\underline{E} = \underline{M}' \underline{S}_E \underline{M} = \underline{M}' \underline{Y}' \left[\underline{I} - \underline{X}_1 (\underline{X}_1' \underline{X}_1)^{-1} \underline{X}_1' \right] \underline{Y} \underline{M},$$

przy czym \underline{S}_H i \underline{S}_E są macierzami sum kwadratów i sum iloczynów odchyleń dla hipotez i błędu, macierze \underline{X}_1 i \underline{C}_1 są bazami \underline{X} i \underline{C} uzyskanymi przy zastosowaniu podziału tych ostatnich macierzy metodą Roya [2].

Jeśli $s = \min(k-1, p-1) = 2$, wówczas przy prawdziwości hipotezy zerowej, statystyka

$$(11) \quad F = \frac{2n+2}{2m+3} \cdot \frac{1 - \Lambda^{1/2}}{\Lambda^{1/2}}$$

ma rozkład F z $4m+6$ i $4n+4$ stopniami swobody, gdzie

$$(12) \quad m = \frac{|k-p|-1}{2}, \quad n = \frac{N-k-p+2}{2}.$$

Hipotezę zerową odrzucamy wtedy, gdy wartość F jest większa od wartości krytycznej $F_{\alpha; 4m+6; 4n+4}$ odczytanej z tablic rozkładu F Fishera-Snedecora dla poziomu istotności α .

W celu sprawdzenia hipotezy H_{02} można skorzystać z testu Hotellinga opartego na statystyce

$$(13) \quad T^2 = N(N-k) \underline{\bar{y}}' \underline{M} (\underline{M}' \underline{S}_E \underline{M})^{-1} \underline{M}' \underline{\bar{y}}$$

gdzie $\underline{\bar{y}} = [\bar{y}_1, \dots, \bar{y}_p]$ jest wektorem średnich ogólnych dla warunków pomiarów. Przy prawdziwości hipotezy H_{02} funkcja testowa

$$(14) \quad F = \frac{N-k-p+2}{(N-k)(p-1)} T^2$$

ma rozkład F z $p-1$ i $N-k-p+2$ stopniami swobody. Hipotezę zerową odrzucamy, jeśli $F > F_{\alpha; p-1; N-k-p+2}$.

Jeśli $\underline{m} = \underline{m}_0$, wówczas mamy do czynienia z analizą jednej zmiennej. Zatem, jeśli hipoteza H_{01} jest prawdziwa, to statystyka

$$(15) \quad F = \frac{\underline{m}'_0 \underline{S}_H \underline{m}_0}{\underline{m}'_0 \underline{S}_E \underline{m}_0} \frac{N-k}{k-1}$$

ma rozkład F z $k-1$ i $N-k$ stopniami swobody.

Oprócz wyżej wymienionych ogólnych porównań można przeprowadzić pojedyncze porównania między obiektami np. przy pomocy przedziałów ufności Scheffe'go określonych następująco:

$$(16) \quad \sum_{h=1}^p a_h^* \sum_{j=1}^k c_j^* \alpha_{jh} \in \sum_{h=1}^p a_h^* \sum_{j=1}^k c_j^* \bar{y}_{jh} \pm$$

$$\pm \sqrt{(k-1) F_{\alpha; k-1; N-k} \frac{\underline{a}^* \underline{S}_E \underline{a}^*}{N-k} \sum_{j=1}^k \frac{c_j^{*2}}{N_j}},$$

gdzie $[c_1^*, \dots, c_k^*]$ jest badanym kontrastem dla obiektów,

$[\bar{y}_{j1}, \dots, \bar{y}_{jp}]'$ - wektorem średnich wyliczonych dla p pomiarów j -tego obiektu, natomiast $[a_1^*, \dots, a_p^*]'$ = $\underline{m} \underline{a}$ dla dowolnych niezerowych wektorów \underline{a} . Jeśli obierzemy $\underline{a} = \underline{m}_0$, wówczas te przedziały przejdą w przedziały ufności dotyczące średnich obiektowych wyliczonych sumarycznie z wszystkich pomiarów. Jeśli zaś $\underline{a}^* = \underline{m}_h = [0 \dots 1 \dots 0]'$ (tj. wektor o h -tej składowej równej 1, pozostałych równych 0), $h = 1, \dots, p$, to uzyskamy przedziały ufności dla średnich obiektowych odpowiadających h -temu pomiarowi.

Porównań między terminami pomiarów można dokonać przy pomocy przedziałów ufności Hotellinga. Dla dowolnych funkcji liniowych średnich dla pomiarów są one postaci

$$(17) \quad \sum_{h=1}^p a_h^* \mu_h \in \sum_{h=1}^p a_h^* \bar{y}_h \pm \frac{\underline{a}^* \underline{S}_E \underline{a}^*}{N} \frac{p-1}{N-k-p+2} F_{\alpha; p-1; N-k-p+2}$$

gdzie $\bar{y} = [y_1, \dots, y_p]'$. Omówienie szczególnych przypadków tych przedziałów można znaleźć w pracy [3].

Przedstawioną tutaj analizę profilową wykonano dla doświadczenia opisanego na wstępie.

Przy pomocy wzorów (10) z macierzami \underline{C} i \underline{X} postaci odpowiednio (7) i (8) (gdzie $N_1 = \dots = N_9 = 4$, $k = 9$) uzyskano następujące macierze sum kwadratów i iloczynów odchyłeń dla obiektów i dla

błędu:

$$\underline{S}_H = \begin{bmatrix} 8,8518 & 16,6184 & 24,9643 \\ 16,6184 & 31,9502 & 48,5424 \\ 24,9643 & 48,5424 & 74,8801 \end{bmatrix},$$

$$\underline{S}_E = \begin{bmatrix} 2,3512 & 3,8305 & 6,0092 \\ 3,8305 & 9,0715 & 14,3250 \\ 6,0092 & 14,3250 & 28,6506 \end{bmatrix}.$$

Dla sprawdzenia hipotezy H_{03} o braku interakcji stężeń mutagenów z terminami pomiarów utworzono następującą macierz, której kolumny dotyczą odpowiednio porównania pierwszego z drugim oraz pierwszego z trzecim terminem pomiarów:

$$\underline{M} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix}.$$

Następnie wyliczono wartość statystyki (10) równą $\Lambda = 0,2903$ i zgodnie ze wzorem (11) (gdzie $s = \min(8, 2) = 2$) uzyskano $F = 2,77$. Na poziomie istotności $\alpha = 0,01$ odrzucono hipotezę H_{03} , gdyż $F > F_{0,01; 16; 56} = 2,37$.

Hipotezę H_{02} o braku wpływu terminów pomiarów na wysokość siewek (rozpatrywaną średnio ze wszystkich stężeń mutagenów) testowano przy pomocy statystyki (13), gdzie $\bar{y} = [1,76 \ 3,15 \ 4,25]^t$. Otrzymano wartość $T^2 = 497,5668$ i odpowiadającą jej wartość $F = 239,57$ (wzór (14)). Hipotezę odrzucono, gdyż $F > F_{0,01; 2; 26} = 5,53$.

W końcu, hipotezę H_{01} , że brak jest istotnych różnic pod względem wysokości siewek między mutacjami wywołanymi różnymi stężeniami mutagenów, testowano przy użyciu wzoru (15). Dla $\underline{m}_0 = [1 \ 1 \ 1]^t$ uzyskano $F = 11,30$. Hipotezę odrzucono na poziomie istotności $\alpha = 0,01$, gdyż wartość ta przekracza wartość krytyczną $F_{0,01; 8; 27} = 3,26$. Wyniki wielozmiennej analizy zamieszczono w tablicy 1.

Ponieważ różnice między efektami poszczególnych stężeń mutagenów okazały się istotne (hipoteza H_{01}), więc interesujące będzie dokonanie pojedynczych porównań przy pomocy przedziałów ufności (16). Przyjmując $\underline{a}^* = \underline{m}_0^* = [1 \ 1 \ 1]$ przy wartości krytycznej $F_{0,05; 8; 27} = 2,30$ otrzymano (por. tablica 2) następujące przedziały ufności dla istotnych różnic między kontrolą a stężeniem N4.0, oraz między kontrolą a stężeniem N6.0

$$0,08 \leq \alpha_1 - \alpha_8 \leq 3,74$$

$$0,34 \leq \alpha_1 - \alpha_9 \leq 4,00.$$

T a b l i c a 1. Analiza profilowa dla doświadczenia z seradela

Źródło zmienności	Testowana hipoteza	Kryterium testowe	Liczba stopni swobody dla testu F	F	F _{0,05}	F _{0,01}
A (stężenie mutagenów)	$H_{01}: \underline{C} \underline{\xi} \underline{m}_0 = \underline{0}$	$F = 11,30$	8; 27	11,30	2,30	3,26
B (terminy pomiarów)	$H_{02}: \underline{c} \underline{\xi} \underline{M} = \underline{0}$	$T^2 = 497,57$	2; 26	239,57	3,37	5,53
A × B	$H_{03}: \underline{C} \underline{\xi} \underline{M} = \underline{0}$	$\Lambda = 0,2903$	16; 56	2,77	1,84	2,37

Ze względu na to, że interakcja A × B okazała się istotna, wskazane może być wykonanie pojedynczych analiz wariancji dla każdego terminu oddzielnie. W tym celu wystarczy wstawić do modelu ogólnego (10) $\underline{M} = \underline{m}_h$. Wówczas iloczyn $\underline{m}_h \underline{S}_E \underline{m}_h$, $h = 1, \dots, p$, odpowiada sumie kwadratów dla błędu w zwykłej (jednoziennej) analizie wariancji. I tak np. przyjmując $\underline{a}^* = \underline{m}_h = [1 \ 0 \ 0]$ uzyskano następujący przedział ufności dla różnicy między kontrolą a stężeniem N1.0 w pierwszym terminie pomiarów:

$$-0,27 \leq \alpha_{11} - \alpha_{61} \leq 1,51.$$

Dla porównania między sobą terminów pomiarów (bez uwzględnienia klasyfikacji ze względu na stężenie mutagenów) wyliczono przedziały ufności (17). Obierając $\underline{a}' = [1 \ 0]$, tzn. $\underline{M} \underline{a} = [1 \ -1 \ 0]'$ uzyskano przedział ufności dla różnicy między średnimi dla pierwszego i drugiego terminu pomiarów, przy $F_{0,05;2;26} = 3,37$, określony nierównością

$$-1,55 \leq \mu_1 - \mu_2 \leq -1,23.$$

Obierając zaś $\underline{a}' = [0 \ 1]$, w analogiczny sposób otrzymano przedział ufności dla różnicy między średnimi dla pierwszego i trzeciego terminu pomiaru:

$$-2,86 \leq \mu_1 - \mu_3 \leq -2,12.$$

Przy istotnej interakcji obiektów z pomiarami może być wskazane porównanie warunków pomiarów oddzielnie dla każdego obiektu. Ma to duże znaczenie praktyczne. Przypuśćmy mianowicie, że pewien mutant seradeli charakteryzuje się szybkim wzrostem w początkowym okresie wegetacji. Jeżeli różnice w wysokości dla tego mutantu są istotne, to może on być bardziej odporny na suszę w czasie żniw

T a b l i c a 2. Średnie wysokości siwek seradeli mierzone w trzech terminach

Terminy w dniach	Stężenia mutagenów										Średnia
	0	E10	E20	E40	NO.5	N1.0	N2.0	N4.0	N6.0		
40	2,28	2,35	2,33	1,95	2,03	1,66	1,25	1,20	1,00	1,76	
54	3,90	4,41	4,31	3,56	3,35	2,92	2,09	2,03	1,79	3,15	
60	5,28	6,53	5,85	4,89	4,29	3,95	2,82	2,51	2,17	4,25	
Średnia	3,82	4,43	4,16	3,47	3,22	2,84	2,05	1,91	1,65		

niż mutant o równomiernym wzroście. Odpowiednie przedziały ufności można wyliczyć według wzoru (16) zastępując zapisane pod pierwiastkiem wyrażenie - wyrażeniem

$$\frac{\underline{a}^* \underline{S}_E \underline{a}}{N_j} \frac{(p-1)}{N_j - p + 1} F_{\alpha; p-1; N_j - p + 1}$$

i wyliczając przedziały ufności dla każdego $j = 1, \dots, k$.

W omawianym przykładzie, dla $\underline{a}' = [1 \ 0]$ i $F_{0,05; 2; 2} = 19,00$ uzyskano dla kontroli następujący przedział ufności dla porównania pierwszego terminu pomiaru z drugim:

$$-5,84 \leq \alpha_{11} - \alpha_{12} \leq 2,60.$$

Te oraz wiele innych porównań można znaleźć w [3].

Reasumując, wykorzystanie analizy profilowej w doświadczeniach rolniczych pozwala uzyskiwać ciekawsze i ogólniejsze wnioski z doświadczeń niż przy stosowaniu jednozmiennej analizy wariancji.

Wszystkie obliczenia można wykonać przy pomocy ogólnego programu wielozmiennej analizy wariancji opartego na modelu (9), ułożonego w języku autokodowym MAT 4 na elektroniczną maszynę cyfrową MINSK 22. Program ten pozwala na wykonanie obliczeń dla dowolnych nieortogonalnych układów doświadczalnych z niepustymi podklasami, przy nieograniczonej liczbie kierunków klasyfikacji jednostek i pomiarów.

Literatura cytowana

- [1] Cole, J. W. L. and Grizzle, J.E., Application of multivariate analysis of variance to repeated measurements experiments, Biometrics 6 (1950), str. 362-389.
- [2] Roy, S. N., Some aspects of multivariate analysis, New York 1957.
- [3] Świetlicka-Grala, J., Praktyczne zastosowanie wielozmiennej analizy wariancji do doświadczeń z powtarzaniem pomiarów, praca doktorska (1971).