



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii

**RADA NAUKOWA DYSCYPLINY
ROLNICTWO I OGRODNICTWO**

mgr inż. AGNIESZKA NOWAK

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ NA TEMAT:

**EFEKTY RÓŻNYCH APLIKACJI NANOCZĄSTEK ŻELAZA NA ROŚLINY RZEPAKU
(*Brassica napus* var. *oleifera*) WE WCZESNYCH FAZACH WZROSTOWO-
ROZWOJOWYCH**

**EFFECTS OF VARIOUS APPLICATION OF NANO IRON IN THE EARLY STAGES OF
GROWTH AND DEVELOPMENT OF RAPESEED PLANTS
(*Brassica napus* var. *oleifera*)**

DZIEDZINA: nauki rolnicze

DYSCYPLINA: rolnictwo i ogrodnictwo

PROMOTOR

PROF. DR HAB. INŻ. ANNA WENDA-PIESIK

KATEDRA AGRONOMII
WYDZIAŁ ROLNICTWA I BIOTECHNOLOGII
POLITECHNIKA BYDGOSKA
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH W BYDGOSZCZY

BYDGOSZCZ 2023

1. Wstęp

Rzepak (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* Metzg.) to roślina jednoroczna, która występuje w formie jarej i ozimej. Na terenie Europy w uprawie dominuje forma ozima, która ma większy potencjał plonotwórczy oraz większą zawartość tłuszczu w nasionach w porównaniu do formy jarej. Rzepak jest również ważnym źródłem białka w żywieniu zwierząt (Weymann i in., 2015). W strefie klimatu umiarkowanego jest najważniejszą rośliną oleistą. Głównym produktem pozyskiwanym z nasion rzepaku jest olej, który wykorzystuje się do celów spożywczych oraz w różnych dziedzinach przemysłu. Skład kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym można zaliczyć do 'najzdrowszego' ze wszystkich olejów jadalnych. Zawiera kwasy omega-3 i omega-6 oraz niewielkie ilości nasyconych kwasów tłuszczowych. Poza wykorzystaniem do celów spożywczych olej rzepakowy może mieć również zastosowanie w kosmetologii, medycynie, technologii żywności, dietetyce, tribologii oraz do produkcji paliwa (biodiesel) czy pokostu. Ponadto ważnymi produktami pozyskiwanymi z nasion rzepaku są śruty i makuchy, które mają zastosowanie jako komponenty pasz w produkcji zwierzęcej (Jankowski i Budzyński, 2007; Rudko, 2011; Szymańska, 2014; Hanhart i in., 2017).

O przydatności technologicznej i żywieniowej nasion rzepaku decyduje ich skład chemiczny. Przede wszystkim należy zwrócić uwagę na zawartość składników pokarmowych i substancji antyżywniowych, które zależą od genotypu, rodzaju gleby, nawożenia, warunków meteorologicznych oraz zabiegów technologicznych podczas produkcji oleju (Rudko, 2011; Mahanta i in., 2019).

Żelazo jest jednym z podstawowych mikroelementów, który wpływa na wzrost roślin oraz odgrywa ważną rolę w reakcjach fotosyntetycznych. W procesach biochemicznych roślin żelazo bierze udział w aktywacji enzymów oraz przyczynia się do syntezy RNA i poprawy wydajności fotosystemu (Sheykhbaglou i in., 2010). Właściwe odżywianie roślin Fe wpływa istotnie na wielkość i jakość plonu nasion rzepaku. Widocznym objawem niedoboru żelaza jest chloroza występująca na najmłodszych liściach, będąca skutkiem zmniejszenia zawartości chlorofilu. Objawy te, nie muszą wskazywać na brak dostępności Fe w glebie (Guerinot i Yi, 1994). Składnik ten może być o małej dostępności dla roślin w glebie ze względu na przechodzenie w formy znacznie trudniej przyswajalne (Kołota i in., 2006; Zheng, 2010 Jeong i Guerinot, 2009; Prasad i in., 2014). Zjawisko uwsteczniania żelaza może także zachodzić w podłożach inertnych. Temu zjawisku sprzyja między innymi wysoki poziom pH podłoża, a także nadmiar fosforanów oraz węglanów (Ylivainio i in., 2004; Kołota i in., 2006). Podłoża inertne cechują się wysoką zawartością tlenu spowodowane ich dużą porowatością. Nie posiadają związków humusowych, które są naturalnymi chelatorami dla kationów w przeciwieństwie do podłoża organicznych (Gorlach i Mazur, 2002). Zjawisko uwsteczniania można zmniejszyć, stosując w nawożeniu roślin formy chelatowe, które są dobrze rozpuszczalne w wodzie oraz posiadają niską stałą dysocjacji (Tyksiński i Komosa, 2007; za Wreesmann, 1996). Wpływ na dostępność żelaza w formie chelatowej mają także: temperatura i światło, oraz stężenie stosowanego chelatu (Komosa i in., 2005). Według Álvarez- Fernández i in. (2005), w nawozach chelatowych Fe występuje najczęściej jako: ligandy EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy), DTPA (kwas dietylenotriaminopentaoctowy) lub HEEDTA (kwas 2- hydroksylowe etylenodiaminotrioctowy).

Zastosowanie nanotechnologii w rolnictwie pozwala na wprowadzenie do uprawy roślin, nowych, przypuszczalnie skutecznych nawozów mineralnych, pestycydów a także regulatorów wzrostu (Khan i in., 2019; El-Gioushy i in. 2021).

Dotychczasowa wiedza na temat zastosowania nanocząstek metali w chemicznych środkach produkcji roślinnej dostarcza zarówno pozytywnych jak i negatywnych doniesień. Dotyczy to ich wpływu na rozwój organów, przebieg metabolizmu i odporności roślin na stres i patogeny oraz na środowisko glebowe (Majumdar i in. 2016; Grillo i in., 2021; Kandhol i in., 2022).

Obecnie na rynku polskim są już dostępne nawozy (np. FoliQ, Nano Aktive), które zawierają nanostruktury np. żelaza. Jednak ich producenci nie zawsze podają, jaka jest zawartość i forma pierwiastka, który występuje w postaci nanocząstek. Poznawanie fizjologicznej reakcji roślin uprawnych na środki chemiczne zawierające nanocząstki metali jest potrzebne. Ponieważ możliwości stosowania metali w coraz mniejszych ilościach, jest korzystne dla środowiska (Joshi i in., 2019; Khan i in., 2019; Wu i Li, 2022). Istnieje więc konieczność badań nad zastosowaniem Fe w formie nanostruktur, co z założenia przy dawkowaniu w bardzo małych ilościach może okazać się efektywne.

1.1. Hipoteza badawcza

Główna hipoteza badawcza zakładała, że zastosowanie nanocząstek żelaza pozytywnie wpłynie na parametry wzrostowo-rozwojowe rzepaku. W szczególności można założyć, że:

1. Nano-Fe obniży poziom stresu po nalistnej aplikacji w fazach rozwoju roślin BBCH 15, 22 i 31.
 2. Nano-Fe aplikowane nalistnie podniesie sprawność asymilacji i transpiracji młodych liści rzepaku.
 3. Nano-Fe aplikowane do podłoża korzystnie wpłynie na rozwój korzeni rzepaku.
 4. Efekty poprawy wskaźników wzrostu i rozwoju rzepaku będą zależały od zastosowania nano-Fe.
-

2. Cel badań

Celem naukowym podjętych badań było określenie wpływu żelaza na procesy fizjologiczne (asymilację, transpirację, zawartość CO₂ międzykomórkowego, przewodnictwo szparkowe, fluorescencję chlorofilu), a także na dynamikę wzrostu korzeni i części nadziemnych roślin rzepaku we wczesnych fazach wzrostowo-rozwojowych w zależności od rodzaju aplikacji i dawki nano-Fe.

3. Metodyka badań

3.1. Przedmiot badań

Badania prowadzono na rzepaku jarym (3 serie doświadczeń) oraz na ozimym (1 seria doświadczeń) (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* Metzg.) w oparciu o doświadczenia ściśle laboratoryjne lub wazonowe:

- seria I – w kulturach *in-vitro* na eksplantatach rzepaku jarego
- seria II – doświadczenie wazonowe w perlicie na roślinach rzepaku jarego
- seria III – doświadczenie wazonowe w ziemi ogrodniczo-uprawnej na roślinach rzepaku jarego oraz ozimego.

3.2. Czas i warunki prowadzenia doświadczenia

Doświadczenia były prowadzone w latach 2014-2017. Miejszem prowadzenia badań było Laboratorium Analiz Biofizycznych Roślin (Seria I i III) oraz ogród doświadczalny (Seria III) należące do Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii, Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego (obecnie Katedra Agronomii, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Politechnika Bydgoska). Natomiast doświadczenia z Serii II były prowadzone w szklarni należącej również do Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego (obecnie Politechnika Bydgoska).

Doświadczenie w warunkach *in vitro* (Seria I) było prowadzone jako ściśle laboratoryjne. Do badań wybrano odmianę populacyjną rzepaku jarego 'Feliks'. Wysterylizowane powierzchniowo nasiona były przenoszone za pomocą 30% roztworu ACE (związki wybielające na bazie chloru- podchloryn sodu, wodorotlenek sodu, węglan sodu) na standardową pożywkę do kiełkowania - ½ MS (Murashige- Skoog'a) w warunkach sterylnych. Kultura eksplantatów rzepaku była prowadzona przez dwa tygodnie w fitotronie w kontrolowanych warunkach. Eksplantaty zostały przeniesione i utrzymywane w słoikach w komorze klimatycznej Laboratorium Analiz Biofizycznych Roślin przez kolejne dwa tygodnie do uzyskania 5-6 liści. Po dwóch tygodniach rośliny zostały przesadzone do wazonów z perlitem i były prowadzone przez 8 tygodni. Nawadnianie roślin odbywało się dwa razy w tygodniu, natomiast nawożenie raz w tygodniu pożywką ½ MS bez agaru z odpowiednią dawką nano-Fe.

Doświadczenie Serii II zostało przeprowadzone jako ściśle wazonowe, z zastosowaniem perlitu jako podłoża. Do badań wybrano odmianę rzepaku jarego, populacyjną 'Feliks'. Doświadczenie prowadzono w szklarni, gdzie panowały wyrównane warunki siedliskowe. Nasiona rzepaku jarego zostały wysiane na palecie z wełną mineralną, a następnie w fazie liścieni zostały przesadzone do wazonów wypełnionych perlitem ogrodniczym. Rośliny były prowadzone w takich warunkach do fazy BBCH 50. Nawożenie makroelementowe wraz z nawadnianiem kropelkowym było sterowane dwa razy dziennie za pośrednictwem systemu Fertiga. Do nawożenia roślin wykorzystano: saletrę wapniową (15,5% N, 26,5% CaO), saletrę potasową (13% N, 46% K₂O), kwas azotowy (60% N), siarczan amonu (21% N, 24% S), siarczan magnezu 7H₂O (16% MgO, 32,5% SO₃) i monofosforan potasu (52% P₂O₅, 34% K₂O). Do nawożenia mikroelementowego wykorzystano chelaty w formie EDTA (kwas wersenowy/ kwas etylenodiaminotetraoctowy): miedzi – 15% (ADOB Cu EDTA), manganu – 13% (ADOB Mn EDTA), cynku – 15% (ADOB Zn EDTA). Zastosowano również nawóz CukroVit borowy: 21% B, 0,02% Mo.

Doświadczenia Serii III prowadzone były na roślinach rzepaku jarego, odmiany populacyjnej 'Feliks' oraz rzepaku ozimego odmiany populacyjnej 'Chagall' jako ściśle wazonowe. Rośliny były prowadzone w wazonach od wysiania do fazy BBCH 12-13 w komorze klimatycznej KK240 FIT P fitotronowej firmy Pol-Eko Aparatura. Rośliny w fazie BBCH 12-13 zostały przesadzone do większych wazonów z takim samym podłożem mieszanym (ziemia ogrodnicza i uprawna). Nawożenie makroelementami (jak w Serii II) stosowano raz w tygodniu w ilości 100 ml na wazon, natomiast nawadnianie dwa razy w tygodniu w ilości 250 ml H₂O na wazon od momentu przesadzenia roślin aż do zakończenia doświadczenia.

3.3. Czynniki doświadczalne i poziomy czynniki

- Seria I

Doświadczenie przeprowadzono jako jednoczynnikowe w dwóch cyklach. Badanym czynnikiem tego doświadczenia była forma i dawka żelaza dodanego do pożywki z eksplantatami rzepaku jarego, według schematu:

1. kontrola bez żelaza (K),
 2. Chelat żelaza (H₂SO₄·7H₂O+EDTA·2 H₂O) w stężeniu 27,8 mg·l⁻¹ (MS),
 3. Fe w formie nano w stężeniu 10 ppm (Fe10),
-

4. Fe w formie nano w stężeniu 25 ppm (Fe25),
5. Fe w formie nano w stężeniu 50 ppm (Fe50),
6. Fe w formie nano w stężeniu 100 ppm (Fe100),
7. Fe w formie nano w stężeniu 500 ppm (Fe500).

Prowadzono doświadczenie wazonowe w następującej liczbie powtórzeń: 6 (obiekty nr 3-7), 12 (obiekt kontrolny nr 2), 4 (obiekt kontrolny nr 1).

- Seria II

Doświadczenie przeprowadzono jako trzyczynnikowe w 2 cyklach, w każdym powtórzeniu było 20 wazonów. Pierwszym badanym czynnikiem była nalistna aplikacja żelaza:

1. kontrola – bez żelaza (K),
2. żelazo w formie chelatu EDTA – 0,67 g·l⁻¹ (FeCh),
3. żelazo w formie nanocząsteczkowej (tlenek żelaza) w stężeniu 5 ppm, (Fe5),
4. żelazo w formie nanocząsteczkowej (tlenek żelaza) w stężeniu 10 ppm, (Fe10).

Drugim czynnikiem był termin stosowania mikroelementów (Zn, Mn, Cu, B i Mo): po 4 godzinach (M) oraz po 3 dniach (BM) od zastosowania żelaza,

Trzecim czynnikiem doświadczenia była faza rzepaku, w której dokonano pomiarów: 24 h po zastosowaniu Fe (BBCH 15 – 16), 7 dni po zastosowaniu Fe (BBCH 22 – 23) i przed kwitnieniem roślin rzepaku (BBCH 50).

- Seria III

Badania zostały przeprowadzone jako dwa oddzielne jednoczynnikowe eksperymenty:

- A. jara forma – odmiana 'Felix'
- B. ozima forma - odmiana 'Chagall'

Czynnikiem doświadczenia dla dwóch form rzepaku była nalistna aplikacja żelaza:

1. obiekt kontrolny - 7 dni rzepak przed zastosowaniem żelaza nalistnie (K),
2. kontrola – bez żelaza (Fe0),
3. Fe w formie nano w stężeniu 5 ppm (Fe5),
4. Fe w formie nano w stężeniu 10 ppm (Fe10).

3.4. Zakres pomiarów i obserwacji

- Wymiana gazowa roślin rzepaku była badana za pomocą systemu LCpro-SD z komorą klimatyzowaną typu szerokiego (firmy ADC BioScientific Ltd. UK). W zakresie wymiany gazowej roślin dokonano pomiarów następujących parametrów: intensywność fotosyntezy netto (Pn) ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), wskaźnik transpiracji liści (E) ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), stężenie CO₂ międzykomórkowego (Ci) (ppm) oraz przewodność aparatów szparkowych (Gs) ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Pomiarzy te zostały przeprowadzone według schematu: w Serii I pomiary wykonano pięciokrotnie, od 4 do 8 tygodnia po przesadzeniu roślin w perlit w odstępach tygodniowych: BBCH 32-34, BBCH 34-37, BBCH 41-46, BBCH 51-55, BBCH 57-62; w Serii II: 24 godziny po aplikacji żelaza (BBCH 15-16), 7 dni po aplikacji żelaza (BBCH 22-23), w fazie kwitnienia (BBCH 50); w Serii III: 7 dni przed zastosowaniem Fe (rzepak jary: BBCH 31-32, rzepak ozimy: BBCH 22-23), w fazie kwitnienia (rzepak jary – BBCH 60, rzepak ozimy – BBCH 50). Ponadto w Serii II i III każdy pomiar wykonano na trzech kolejnych liściach: 1 – najstarszy, 2 – średni i 3 – najmłodszy.
- W oparciu o zależność intensywności Pn i E wyznaczono fotosyntetyczny współczynnik wykorzystania wody (WUE) określony warunkami środowiskowymi. Na podstawie stosunku intensywności Pn do Gs wyznaczono chwilowy fotosyntetyczny współczynnik wykorzystania wody (WUEI) określony genetycznie. Powyższe współczynniki były wyznaczone w Serii I, II oraz III, na podstawie potrzebnych do ich obliczenia parametrów fotosyntezy.
- Za pomocą fluorymetru moduowanego OS5p firmy Opti-Science, dokonano pomiarów parametrów fluorescencji chlorofilu. Do badań wykorzystano protokół pomiarowy Fv/Fm 'Protocol'. Za pomocą fluorescencji chlorofilu określono: fluorescencję początkową (F₀), maksymalną (F_M) oraz wskaźnik sprawności fotochemicznej PSII (F_v/F_M). W Serii I pierwszy pomiar wykonano po wyjęciu roślin ze słoików z pożywką, kolejne 8 pomiarów wykonywano w odstępach tygodniowych.
- Pomiar zawartości chlorofilu został wykonany za pomocą chlorofilomierza ADC: OSI CCM-200 Plus firmy Opti-Sciences. Pomiar zawartości chlorofilu wykonany został w doświadczeniach Serii I czterokrotnie na najmłodszych liściach w terminach: 1) po wyjęciu roślin ze słoików z pożywką, 2) dwa dni po przesadzeniu roślin w perlit, 3) 4 tygodnie po przesadzeniu roślin w perli, 4) 8 tygodni po przesadzeniu roślin w perlit.
- Do analiza wzrostu roślin w celu poznania ich rozwoju i produktywności wykorzystane były wskaźniki: NAR (URL)- intensywność asymilacji netto, RGR- względna intensywność wzrostu, SLA- specyficzna powierzchnia liściowa, LWR- wskaźnik masy liści, LAR- wskaźnik ulistnienia. Wskaźniki te wykonane zostały w doświadczeniach Serii I. Pierwszy zbiór roślin do analizy wzrostu odbył się w fazie BBCH 12-14 w I powtórzeniu i BBCH 13-15 w II powtórzeniu (przesadzenie roślin z pożywki do wazonów z perlitem). Drugi

zbiór roślin do analizy wzrostu przeprowadzono w fazie BBCH 57-60 w powtórzeniu I i w fazie BBCH 57-62 w powtórzeniu II (zakończenie doświadczenia).

- Cechy fizyczne korzeni roślin rzepaku określono za pomocą systemu analizy obrazu WinRhizo Pro2007a (Regent Instruments, Sainte-Foy, QC, Kanada) w połączeniu z profesjonalnym skanerem (Epson, Expression 10 000 XL, Epson America, Inc., USA). Obrazy morfologii korzenia uzyskano skanując oczyszczone korzenie. Wyznaczono następujące parametry: Len- całkowita długość korzeni (cm), SA- całkowita powierzchnia korzeni (cm²), PA- całkowita powierzchnia przeliczeniowa (cm²), Vol- całkowita objętość korzeni (cm³), AvgD- średnica korzeni (mm), Ntips- liczba korzonków, NForks- liczba rozgałęzień korzeni, NCross- liczba skrzyżowanych korzeni. Analiza korzeni została wykonana w doświadczeniach Serii I. Pierwsza analiza korzeni została przeprowadzona, gdy rośliny były w fazie BBCH 12-14 w I powtórzeniu i BBCH 13-15 w II powtórzeniu (przesadzenie roślin z pożywki do wazonów z perlitem). Drugą analizę korzeni wykonano po osiągnięciu przez rośliny fazy BBCH 57-60 w powtórzeniu I i fazy BBCH 57-62 w powtórzeniu II (zakończenie doświadczenia).
- Zawartość Fe (Seria I, II, III) i Mg (Seria II) w liściach i ogonkach liściowych oraz łodygach i korzeniach (Seria I) oznaczono metodą atomowej spektroskopii absorpcyjnej ASA (Atomic Absorption Spectroscopy – AAS) za pomocą aparatu Perkin Elmer AAS 600.
- Wykonano również pomiary: zawartość suchej masy liści, ogonków liściowych, łodyg i korzeni oraz powierzchni liści, którą wyznaczono metodą wagową w pierwszym i drugim terminie zbioru roślin do badań (Seria I); długość, szerokość, świeża i sucha masa liści oraz długość, świeża i sucha masa ogonków liściowych (Seria II i III).

3.5. Analiza statystyczna

Dla wszystkich wariantów doświadczeń wykonano analizy statystyczne wykorzystując program komputerowy Statistica 13.0 (StatSoft Polska). Ponadto dla wszystkich serii wykonano analizy wariancji (ANOVA) według modelu stałego, tj. czynniki doświadczalne jako stałe efekty oraz ich interakcje.

- **Seria I**

Analizę statystyczną wykonano dla układu całkowicie losowego w 5 powtórzeniach + obiekt kontrolny w 3 powtórzeniach. Do pomiarów biologicznych rzepaku wykorzystano model ANOVA z oceną istotności działania czynnika za pomocą wartości F przy poziomie $p = 0,05$. Do porównań średnich obiektowych wykorzystano test LSD Fishera na poziomie istotności $p = 0,05$. Dla każdej cechy określona została zgodność z rozkładem normalnym i jednorodność wariancji dla poszczególnych obiektów. Wykorzystano odpowiednie wzory do obliczeń wskaźników wzrostu i rozwoju roślin. Do analiz związków pomiędzy cechami możliwa wykorzystano analizę regresji w zależności od dawek nanożelaza (5 dawek). Ponadto wykonano obliczenia korelacji w oparciu o r -Pearsona. Zastosowano model regresji wielokrotnej, wykonanej metodą krokową postępującą, w którym w obiektach kontrolnych powierzchnia całkowita korzeni (YSA) w istotny sposób zależała od innych parametrów korzeni tj.: zawartości suchej masy, całkowitej objętości (xVOL), długości całkowitej (xLEN). Dobroć dopasowania modelu regresji wielokrotnej (R^2 skorygowane) sprawdzono za pomocą testu $F_{(3,33)}$ dla $p < 0,001$ i błędzie estymacji = 15 %.

- **Seria II**

Analizę statystyczną wykonano dla układu losowanych bloków w 5 powtórzeniach. Układ blokowy zastosowano ze względu na panujące w szklarni warunki oświetlenia wykazujące zmienność systematyczną. Do pomiarów biometrycznych liści rzepaku wykorzystano model ANOVA dwuczynnikowy (efekty główne: forma żelaza i czas stosowania mikroelementów oraz ich interakcja), natomiast do pomiarów fizjologicznych zastosowano model ANOVA trzyczynnikowy (efekty główne: forma żelaza, czas stosowania mikroelementów i faza rzepaku) oraz interakcje II i III rzędu. Ocenę istotności działania czynników oceniono za pomocą wartości F przy poziomie $p = 0,05$. Do porównań średnich obiektowych wykorzystano test LSD Fishera na poziomie istotności $p = 0,05$.

- **Seria III**

Ocenę wpływu badanych parametrów wymiany gazowej oraz fluorescencji chlorofilu wykonano w oparciu o model wielowymiarowej analizy wariancji MANOVA odrębnie dla każdej formy rzepaku (ozimej i jarej) w układzie jednoczynnikowej, biorąc jako źródło zmienności efekt nanożelaza w nalistnej aplikacji dla czterech obiektów doświadczalnych (obiekt kontrolny- 7 dni rzepak przed zastosowaniem żelaza nalistnie (K), kontrola – bez żelaza (Fe0), Fe w formie nano w stężeniu 5 ppm (Fe5), Fe w formie nano w stężeniu 10 ppm (Fe10). Statystykę wynikową test Wilksa (λ) transponowano na statystykę F , przy poziomie istotności $p = 0,05$. Po udowodnieniu istotnego wpływu nanożelaza na parametry wymiany gazowej i fluorescencji wykonano porównań średnich obiektowych za pośrednictwem testu *post* LSD Fishera na poziomie istotności $p = 0,05$. Dane dotyczące morfologicznej charakterystyki liści rzepaku jarego pod wpływem dawek nano żelaza, zawartości suchej masy oraz zawartości żelaza w organach roślinnych opracowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji. Dane zaprezentowano jako średnie wraz z błędem oraz współczynnikiem zmienności Cv.

4. Wyniki

4.1. Wskaźniki procesu fotosyntezy roślin rzepaku w zależności od fazy rozwoju, stosowania nanoFe oraz mikroelementów

Aparat szparkowy jest podstawowym elementem odpowiedzialnym za przewodność dyfuzyjną powierzchni liści. Jest wykorzystywany przez roślinę zarówno do regulacji utraty wody, jak i do asymilacji CO₂ w procesie fotosyntezy, ale jest bardzo wrażliwy na zmiany warunków środowiskowych.

Wyższe wartości fotosyntezy netto (Pn), podstawowego procesu warunkującego wzrost i plonowanie roślin, świadczy o tym, że rośliny były lepiej odżywione. W badaniach *in vitro* prowadzonych na eksplantatach rzepaku jarego otrzymano najmniejszą asymilację CO₂ (Pn- 0,280 μmol·m⁻²·s⁻¹) oraz transpirację (E- 0,539 mmol·m⁻²·s⁻¹) w początkowej fazie rozwoju roślin (BBCH 32-34) a najwyższymi wskaźnikami Pn i E cechowały się rośliny odpowiednio w fazach rozwoju pąków kwiatowych (Pn- 0,361 μmol·m⁻²·s⁻¹) i wydłużenia pędu głównego (E- 0,761 mmol·m⁻²·s⁻¹). Rośliny rzepaku wysadzone do perlitu cechowały się najwyższą aktywnością fizjologiczną (asymilacja i transpiracja) w okresie rozwoju liści (odpowiednio: 0,849 μmol·m⁻²·s⁻¹ i 3,67 mmol·m⁻²·s⁻¹), natomiast w okresie rozwoju pędów bocznych oraz pąków kwiatowych stwierdzono prawie 2-krotny spadek intensywności Pn i E. Zastosowanie Fe znacznie obniżyło sprawność procesu asymilacji w liściach rzepaku jarego z obiektów Fe0 i Fe5 oraz we wszystkich liściach rzepaku ozimego (poniżej 0,3 μmol·m⁻²·s⁻¹). Uzyskano wpływ nanocząstek żelaza na procesy asymilacji CO₂ i transpiracji roślin. Istotnie największy wzrost parametrów fotosyntezy: Pn i E otrzymano po zastosowaniu 25 i 50 ppm nanocząstek żelaza w początkowych fazach rozwoju eksplantatów rzepaku jarego w porównaniu do obiektów kontrolnych. Natomiast największe obniżenie intensywności fotosyntezy netto oraz transpiracji miało miejsce po zastosowaniu najwyższej dawki nanoFe, tj. 500 ppm.

Najwyższe przewodnictwo aparatów szparkowych odnotowano u roślin rzepaku jarego pochodzących z kultur *in vitro* w fazach rozwoju pąków kwiatowych oraz kwitnienia, średnio: 0,0489 mol·m⁻²·s⁻¹ (BBCH 51-55) i 0,0518 mol·m⁻²·s⁻¹ (BBCH 57-62). Wyższe przewodnictwo aparatów szparkowych (Gs) wynika z postępujących procesów fizjologicznych w starzejących się liściach rzepaku, które charakteryzują się niższą efektywnością wykorzystania wody w porównaniu do liści młodych. Ponadto uzyskano wzrost przewodności aparatów szparkowych liści rzepaku jarego z kultur *in vitro* w początkowych fazach rozwojowych roślin (do BBCH 46) po zastosowaniu 25 ppm nanoFe. Natomiast w końcowym okresie wzrostu eksplantatów rzepaku jarego otrzymano zdecydowany wzrost przewodności aparatów szparkowych po zastosowaniu największej dawki nanoFe (500 ppm)- 0,1300 mol·m⁻²·s⁻¹ (BBCH 51-55) i 0,1400 mol·m⁻²·s⁻¹ (BBCH 57-62). Wskazuje to na pozytywny wpływ nanoFe na zmiany fizjologiczne aparatu fotosyntetycznego w roślinach rzepaku. Zastosowanie Fe miało istotny wpływ na przewodność szparkową we wszystkich badanych liściach rzepaku jarego i ozimego uprawianego w ziemi ogrodniczo-uprawnej. Najwyższą wartość tego parametru wykazały liście z obiektu kontrolnego przed zastosowaniem żelaza (średnio dla rzepaku jarego- 0,12 mol·m⁻²·s⁻¹ i dla rzepaku ozimego- 0,09 mol·m⁻²·s⁻¹). Dwutygodniowa stabilizacja roślin po zastosowanym nawożeniu nanocząstkami żelaza spowodowała kilkukrotny spadek badanego parametru (poniżej 0,4 mol·m⁻²·s⁻¹).

Ponieważ zmiany w wielkości aparatu szparkowego mogą wpływać na dyfuzję CO₂ w przestrzeniach międzykomórkowych, a w konsekwencji na proces fotosyntezy, przeanalizowano również międzykomórkowe stężenie CO₂ – wskaźnik Ci. Wyniki rzepaku jarego uprawianego w perlicie wskazują na dodatkowy efekt zastosowanych mikroelementów (B, Cu, Mn, Mo, Zn) po 3 dniach od aplikacji nanoFe, ponieważ otrzymano istotny wzrost parametru Ci (345,8 ppm). Dostępność niezbędnych makro- i mikroelementów ma wpływ na proces fotosyntezy, jak również na wzrost i rozwój całej rośliny. W rzepaku jarym uprawianym w ziemi ogrodniczo-uprawnej uzyskano wzrost Ci po zastosowaniu dawki 10 ppm nanoFe. Dla liścia 1 stężenie CO₂ było najwyższe i wynosiło nieco powyżej 350 ppm. Aplikacja nanoFe nie miała istotnego wpływu na stężenie CO₂ w przestworach międzykomórkowych dla wszystkich badanych liści rzepaku ozimego. Natomiast w liściach eksplantatów rzepaku jarego uzyskano obniżenie Ci w fazie rozwoju wegetatywnego części roślin po zastosowaniu dawki nanoFe 500 ppm. Jednak inaczej było w końcowych fazach wzrostu rzepaku jarego (rozwój pąków kwiatowych- 343,7 μmol·mol⁻¹ oraz kwitnienie- 349,8 μmol·mol⁻¹), ponieważ Ci uległa zwiększeniu po zastosowaniu maksymalnej dawki nanoFe (500 ppm).

Szczegółowa analiza fotosyntetycznego współczynnika wykorzystania wody (WUE) oraz chwilowego fotosyntetycznego współczynnika wykorzystania wody (WUEI) roślin może przyczyniać się do rozwoju kryteriów hodowlanych, opartych o charakterystyczne dla genotypu parametry fizjologiczne i morfologiczne.

Rośliny uprawiane w perlicie nie różniły się parametrami WUE i WUEI pod wpływem stosowania nanoFe i nawożenia mikroelementami. Fotosyntetyczny współczynnik wykorzystania wody (WUE) w roślinach rzepaku kształtował się w granicach 0,23-0,25 μmol CO₂·m⁻²·s⁻¹·mmol H₂O·m⁻²·s⁻¹. Wyraźne różnice można natomiast zauważyć w chwilowym fotosyntetycznym współczynniku wykorzystania wody (WUEI 80,28-103,40 mmol CO₂·m⁻²·s⁻¹·mmol H₂O·m⁻²·s⁻¹), który spowodowany był niską przewodnością szparkową roślin. Należy podkreślić, że badania wykonano we wczesnych fazach rozwoju rzepaku oraz stosowano niewielkie dawki nanocząstek żelaza (maksymalnie 10 ppm). Uzyskane wskaźniki wskazują na brak stresu u roślin w wyniku

niedoboru wody lub innych zaburzeń wpływających na deficyt wody w roślinach. Natomiast eksplantaty rzepaku wykazały gwałtowny wzrost badanych wskaźników fotosyntezy WUE oraz WUEI przy dawce nanoFe 50 ppm. Także wyniki roślin rzepaku jarego i ozimego uprawianych w ziemi ogrodniczo-uprawnej wskazują na wzrost parametru WUE w późniejszych fazach rozwoju rzepaku oraz, że każda z zastosowanych dawek nanoFe spowodowała wzrost badanych parametrów. Największy wzrost współczynnika po aplikacji nanoFe nastąpił w przypadku liścia najmłodszego (3) rzepaku jarego (o 169,4%).

4.2. Intensywność fluorescencji chlorofilu a w roślinach rzepaku

Fluorescencja chlorofilu a to jeden z podstawowych wskaźników roślin decydujący o ich produktywności. Badania fluorescencji chlorofilu a są szeroko rozpowszechnioną metodą analizy wydajności fotosyntetycznej roślin poddanych działaniu abiotycznych i biotycznych czynników stresowych. Duże wartości fluorescencji początkowej świadczą o mniejszej sprawności przekazywania energii wzbudzenia między cząsteczkami chlorofilu. Rośliny uprawiane w perlicie (niezależnie od wieku liści) oraz w ziemi ogrodniczo-uprawnej w początkowym okresie wzrostu (faza rozwoju liści) miały najmniejsze (korzystne dla procesu fotosyntezy) wskaźniki F_0 (poniżej 250) w porównaniu do późniejszych faz rozwojowych zwłaszcza rozwoju pąków kwiatowych (powyżej 250). Natomiast rośliny w kulturach *in vitro* cechowały się najmniejszymi wartościami parametru fluorescencji w końcowych fazach rozwojowych (rozwój pąków kwiatowych i kwitnienie) – 209 w porównaniu do początkowej fazy rozwoju (229,7) rzepaku jarego. Należy również podkreślić, że w roślinach, które zostały poddane testowaniu w ziemi ogrodniczo-uprawnej, liście najmłodsze nie wykazywały zmian wielkości wskaźnika fluorescencji początkowej. Obecność nanożelaza w środowisku wzrostu roślin wpłynęło istotnie na zmianę wartości fluorescencji początkowej chlorofilu a obu form rzepaku. Po zastosowaniu każdej ilości nanoFe do perlitu niezależnie od fazy rozwoju liści uzyskano obniżenie fluorescencji początkowej. Największe obniżenie F_0 uzyskano dla liścia najmłodszego po zastosowaniu 10 ppm nanoFe – 235,5. Również współdziałanie fazy rozwoju rzepaku oraz stosowanie nanoFe miało wpływ na parametr F_0 . Zwiększanie dolistnej aplikacji nanożelaza wpłynęło na obniżenie fluorescencji minimalnej w każdej fazie rozwoju rzepaku jarego w liściach najmłodszych. Jest to korzystne dla roślin, ponieważ wskazuje na brak stresu podczas ich wzrostu. Ponadto w kulturach *in vitro* najmniejsza dawka nanożelaza 25 ppm w fazie BBCH 41-46 oraz dawka 100 ppm w BBCH 51-55 zmniejszyły fluorescencję początkową chlorofilu a odpowiednio do poziomu: 200,2 i 205,5. Jedynie w fazie kwitnienia rzepaku jarego uzyskano obniżenie fluorescencji minimalnej po zastosowaniu każdej ilości nanożelaza do pożywki. Prowadząc badania z użyciem ziemi ogrodniczo-uprawnej okazało się, że stosowanie nanocząstek żelaza przyczyniło się do wzrostu fluorescencji początkowej w liściach najstarszych rzepaku jarego oraz ozimego. Po zastosowaniu dawki 10 oraz 5 ppm nanoFe uzyskano odpowiednio: 327,8 oraz 301,5. Również w początkowych fazach rozwoju eksplantatów rzepaku jarego (BBCH 14-17 i 27-29) uzyskano niekorzystne zwiększenie fluorescencji minimalnej po zastosowaniu do podłoża nanoFe w dawce 500 ppm (246,0 i 233,7). Następnym parametrem fluorescencji świadczącym o przebiegu procesu fotosyntezy roślin jest fluorescencja maksymalna. Parametr F_M jest mierzony, gdy wszystkie centra reakcji są zamknięte. Obniżona wartość maksymalnej fluorescencji liścia przystosowanego do ciemności świadczy o większym udziale procesów fotochemicznych konkurujących o wykorzystanie energii.

Parametr F_M wykazał podobny trend do F_0 , co wskazuje na silną zależność obu parametrów w liściach roślin. Zmiany obu parametrów fluorescencji sugerują występowanie aklimatyzacji roślin do zacinienia. W badaniach nad rzepakiem jarym w perlicie i ziemi ogrodniczo-uprawnej uzyskano wzrost fluorescencji maksymalnej w początkowych fazach rozwoju roślin. Otrzymano korzystny wzrost procesu fotosyntezy roślin, ponieważ maksymalna fluorescencja eksplantatów rzepaku ulegała zwiększeniu wraz z rozwojem rzepaku a jedynie w fazie kwitnienia rzepaku parametr F_M uległ obniżeniu w porównaniu do fazy rozwoju pąków kwiatowych (BBCH 59). Różnice między poziomem fluorescencji maksymalnej stwierdzone w najmłodszym (liść 1) i najstarszym liściu (liść 3) stanowią dobry przykład wpływu redystrybucji nanoFe na wydajność fotosyntezy, która dominowała u roślin słabo zaopatrywanych w Fe. Można jednoznacznie wskazać, że dla liścia najstarszego uzyskano zdecydowanie pozytywny wpływ nanocząstek żelaza w dawce 10 ppm, ponieważ uzyskano największe wartości fluorescencji maksymalnej rzepaku jarego stosując uprawę roślin w perlicie (247,5) oraz ziemi ogrodniczo-uprawnej (1456). Także współdziałanie czynników (fazy rozwoju i stosowania nanoFe) wykazuje wyższe wartości F_M w fazie rozwoju liści zarówno najmłodszych jak i najstarszych rzepaku (BBCH 15-16) równocześnie stosując 10 ppm nanoFe. w perlicie. W rzepaku jarym pochodzącym z kultur *in vitro* zaobserwowano obniżenie wskaźnika F_M chlorofilu a wynikającej z nadmiaru nanoFe w pożywce. Uzyskano najmniejsze wartości fluorescencji maksymalnej w eksplantatach w fazie wydłużania pędu głównego oraz rozwoju wegetatywnego stosując dawkę 100 ppm nanożelaza odpowiednio: 1323,2 i 1319,4. Zmniejszenie fluorescencji maksymalnej chlorofilu a w stosunku do próby kontrolnej świadczy o wystąpieniu stresu, w wyniku którego nie wszystkie akceptory elektronów w PSII zostały całkowicie zredukowane. Uzyskano również wzrost F_M w roślinach pochodzących z kultur *in vitro* dla dawki największej, tj. 500 ppm nanoFe (BBCH 34-37) - 1469,8. Można wskazać brak reakcji eksplantatów niezależnie od ich fazy rozwoju na najmniejsze ilości stosowania nanocząstek żelaza do podłoża (10 i 25 ppm nanoFe).

Rośliny w naturalnych warunkach są narażone na różne stresy abiotyczne, na przykład wysoką i niską temperaturę, niedobór składników odżywczych, zasolenie, suszę, stres świetlny i oksydacyjny. Dla wszystkich badanych liści rzepaku jarego uprawianego w perlicie oraz dla liścia najstarszego rzepaku jarego uprawianego w ziemi ogrodniczo- uprawnej uzyskano najwyższe wartości maksymalnej wydajności fotoukładu PSII (powyżej 0,800) odpowiednio w fazie rozwoju pędów bocznych oraz wydłużania pędu głównego. Dla tych samych roślin uprawianych w ziemi ogrodniczo-uprawnej uzyskano wartości maksymalnej wydajności fotoukładu PSII powyżej 0,800 dla liści najmłodszych w fazie kwitnienia, ale jednocześnie liść najstarszy wykazywał się parametrem fluorescencji F_v/F_M poniżej 0,800. W fazie kwitnienia eksplantatów rzepaku uzyskano maksymalne wartości wskaźnika F_v/F_M średnio na poziomie 0,850 i wskazuje to na brak stresu u roślin. Również w pozostałych fazach rozwoju rzepaku pochodzących z kultur *in vitro* uzyskano wartości powyżej 0,830, które wskazują na brak stresu roślin. Eksplantaty rzepaku jarego w późniejszych fazach rozwojowych uzyskały znaczny wzrost wskaźnika F_v/F_M po zastosowaniu największych dawek nanoFe (50-500 ppm). Wartości maksymalnej wydajności fotoukładu PSII wyniosły po zastosowaniu nanoFe w dawce 50 ppm (BBCH 51-55) - 0,852 oraz 500 ppm (BBCH 57-62) - 0,856, co wskazuje na brak stresu u roślin (powyżej 0,850). Ponadto stosowanie nanoFe w ilości 10 ppm korzystnie wpłynęło na rośliny rzepaku jarego uprawiane w perlicie i ziemi ogrodniczo-uprawnej (liście najmłodsze) ponieważ uzyskano najwyższe wyniki maksymalnej wydajności fotoukładu PSII dla liści najmłodszych (powyżej 0,800). Analizując współdziałanie fazy rozwoju i stosowania nanoFe można również zauważyć, że stosowanie nanoFe w dawce 10 ppm w początkowej fazie rozwoju roślin wpływało na łagodzenie stresu u roślin (w liściach najstarszych uzyskano wartości powyżej 0,800). Należy jednak podkreślić, że różnice w zawartości składników odżywczych znacząco wpływają na fotochemiczny proces fotosyntezy, odgrywając tym samym kluczową rolę we wzroście i rozwoju roślin. Dla liścia najstarszego rzepaku jarego, uzyskano wzrost maksymalnej wydajności kwantowej PSII po zastosowaniu nawożenia mikroelementami. Nastąpiły w czasie trwania doświadczenia jednakowe zmiany w parametrze określającym maksymalną wydajność kwantową PSII (F_v/F_M). Dla roślin kontrolnych wartość F_v/F_M utrzymywała się na stałym poziomie – średnio 0,792 (niezależnie od wieku badanych liści rzepaku). Prowadząc badania z rzepakiem jarym w ziemi ogrodniczo-uprawnej oraz *in vitro* uzyskano inny efekt procesu fotochemicznego PSII po zastosowaniu nanocząstek żelaza niż w perlicie. Otrzymano najwyższą wartość wskaźnika F_v/F_M równą 0,800 dla liścia najstarszego rzepaku jarego bez stosowania nanoFe (ziemia ogrodniczo-uprawna), natomiast stosowanie każdej dawki nanożelaza (5 i 10 ppm) obniżyło wartość wskaźnika F_v/F_M , co wskazuje na stres u roślin (poniżej 0,800). Ponadto, stosowanie wysokich dawek nanoFe (powyżej 50 ppm) w początkowych fazach rozwoju eksplantatów również spowodowało spadek parametru fotochemicznego fotosyntezy PSII dla badanych liści rzepaku jarego.

Zawartość chlorofilu ma bezpośredni wpływ na fotosyntezę roślin uprawnych, ponieważ jest niezbędnym pigmentem fotosyntetycznym biorącym udział w przechwytywaniu energii świetlnej i konwersji energii. Uzyskano zawartość chlorofilu w liściach eksplantatów rzepaku w fazie rozwoju początkowej liści w zakresie od 3,7 do 45,2. Tak duże rozbieżności koncentracji chlorofilu w liściach rzepaku wpływ miało stosowanie zróżnicowanych dawek nanoFe do pożywek. Okazało się, że dodanie do pożywek w kulturach *in vitro* z rzepakiem dużych dawek nanoFe (100 i 500 ppm) zdecydowanie uległa spowodowało zwiększenie zawartości chlorofilu w liściach. Liście najmłodsze wykazywały się największą koncentracją chlorofilu w porównaniu do liści starszych. Stosowanie nanoFe znacznie zwiększyło zawartość chlorofilu w liściach rzepaku, a zawartość chlorofilu wzrosła po zastosowaniu największych dawek nanoFe tj. 100 i 500 ppm. Uzyskano wysoko istotną zależność między zawartością chlorofilu w liściach a maksymalną wydajnością kwantową PSII.

4.3. Analiza wzrostu roślin rzepaku

Wzrost roślin analizuje się wykorzystując dwa parametry, a mianowicie powierzchnię liści i suchą masę organów, a inne wielkości oblicza się na podstawie tych dwóch czynników. Wskaźnik masy liści (LWR) lub inaczej stosunek masy liści do całkowitej masy rośliny wykazał nieznaczne zmniejszenie wartości badanego parametru. Analiza danych wykazała, że w fazie rozwoju liści eksplantatów rzepaku jarego wskaźnik LWR wyniósł średnio $0,522 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, natomiast w fazie kwitnienia roślin – $0,496 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. Inaczej przedstawiał się wpływ stosowania nanocząstek żelaza na parametr LWR eksplantatów rzepaku jarego, ponieważ nie uzyskano zdecydowanych zmian wartości wskaźnika masy liści po zastosowaniu nanoFe.

Wskaźnik SLA zależał do od fazy rozwoju eksplantatów rzepaku jarego. Najwyższe wartości specyficznej powierzchni liści uzyskał rzepak jary pochodzący z kultur *in vitro* w fazie kwitnienia ($940,7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) w porównaniu do fazy rozwoju liści ($427,6 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). Wykorzystując w badaniach nanocząstki żelaza zaobserwowano ich istotny wpływ na wartość parametru SLA w fazie kwitnienia rzepaku jarego. Najwyższe wartości specyficznej powierzchni liści uzyskano po zastosowaniu w kulturach *in vitro* 50 ppm nanoFe. Ponadto zastosowanie 25 oraz 100 ppm nanożelaza wpłynęło na wzrost parametru SLA w fazie rozwoju liści oraz kwitnienia eksplantatów rzepaku jarego. Wysokie wartości SLA są ściśle związane z większą efektywnością pozyskiwania i wykorzystania dostępnych składników roślin oraz mniejszą efektywnością wzrostu i rozwoju liści.

Wskaźnikiem służącym do analizy produktywności roślin jest współczynnik powierzchni liści LAR. Parametr LAR określa wielkość powierzchni liści, jaką roślina ekspozuje na jednostkę całkowitej masy rośliny.

Dane dotyczące wskaźnika powierzchni liści (LAR) dla różnych okresów wzrostu eksplantatów rzepaku jarego wskazują na dwukrotnie wyższe wartości parametru w późniejszej fazie rozwoju. W fazie rozwoju liści rzepaku jarego z kultur *in vitro* parametr LAR wynosił średnio $219,1 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, a w fazie kwitnienia aż $458,7 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Po zastosowaniu nanocząstek żelaza nie uzyskano ich istotnego wpływu na wskaźnik powierzchni liści eksplantatów rzepaku jarego. Można jedynie wskazać na tendencję wzrostu parametru LAR po zastosowaniu do pożywki nanoFe w ilości 25 ppm.

Fizjologicznym parametrem jest wskaźnik asymilacji netto (NAR) i jest on miarą dziennego tempa zmian netto zawartości węgla w całej roślinie. Eksplantaty rzepaku jarego w fazie kwitnienia uzyskały parametr NAR (jednostkowa produktywność liści) średnio na poziomie $0,729 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$. Ponadto uzyskano wpływ stosowanych nanocząstek żelaza na wielkość intensywności asymilacji netto liści rzepaku jarego wyprodukowanego w kulturach *in vitro*. Największą wartość parametru NAR uzyskały liście eksplantatów rzepaku jarego po zastosowaniu do pożywek 500 ppm nanoFe.

Wariant wzrostu pojedynczej rośliny oparty jest na względnej szybkości wzrostu RGR (ang. Relative Growth Rate) jako iloczynu jednostkowej produktywności liści (ang. Net Assimilation Rate) i frakcji organów asymilacyjnych w masie całej rośliny (ang. Leaf Area Ratio). Wskaźnik względnej szybkości wzrostu (RGR) wyniósł średnio $0,042 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Wartość RGR rzepaku jest typowa dla danych literaturowych, biorąc pod uwagę moment wykonywania pomiarów. Zaobserwowano różnice we względnym tempie wzrostu rzepaku, na który wpływ miały nanocząstki żelaza. Jednak uzyskano niejednoznaczny wpływ nanocząstek żelaza na względną szybkość wzrostu rzepaku. Na ogół stosowanie nanoFe zmniejszyło wielkość parametru RGR rzepaku. RGR jest złożonym parametrem określanym przez szereg składowych fizjologicznych, morfologicznych i alokacji biomasy. Natomiast jedynie zastosowanie 100 ppm nanocząstek żelaza zwiększyło wartość względnej intensywności wzrostu.

4.4. Cechy biometryczne oraz jakościowe części nadziemnych roślin rzepaku

Wielkości parametrów morfologicznych liści rzepaku zależą przede wszystkim od zaawansowanego wzrostu i rozwoju roślin rzepaku (fazy rozwojowej) oraz warunków siedliskowych w których prowadzona była uprawa. Wzrost i rozwój liści rzepaku jest ściśle związany z jego biomasą i intensywnością procesu fotosyntezy. Powierzchnia liści jest głównym parametrem biorącym udział w przechwytywaniu promieniowania słonecznego, fotosyntezie, ewapotranspiracji i innych procesach roślinnych oraz ma wpływ na wielkość plonu nasion. Analizując wyniki biometrii eksplantatów rzepaku jarego uzyskano powierzchnię liści na niskim poziomie (średnio $3,14 \text{ cm}^2$). Wynika to z terminu, w którym wykonano pomiar powierzchni liści - faza rozwoju liści rzepaku. Ponadto uprawiając rzepak jary w perlicie uzyskano największą powierzchnię liści rzepaku w fazie kwitnienia. Należy jeszcze podkreślić, że w fazie kwitnienia liście najmłodsze cechowały się zdecydowanie największymi wartościami cech biometrycznych: powierzchnia liścia ($102,9 \text{ cm}^2$), świeża masa ($2,43 \text{ g}$), sucha masa ($0,230 \text{ g}$), długość ogonka ($11,5 \text{ cm}$), świeża masa ogonka ($0,99 \text{ g}$) i sucha masa ogonka ($0,065 \text{ g}$) w porównaniu do liści starszych (powierzchnia liścia – $40,5 \text{ cm}^2$, świeża masa – $0,80 \text{ g}$, sucha masa – $0,088 \text{ g}$, długość ogonka – $8,7 \text{ cm}$, świeża masa ogonka – $0,346 \text{ g}$ i sucha masa ogonka – $0,024 \text{ g}$). W fazie rozwoju pąków kwiatowych liści najmłodszych rzepaku jarego, uprawianego w perlicie oraz liści najstarszych rzepaku ozimego uprawianego w ziemi ogrodniczo-uprawnej, uzyskano istotne zwiększenie zawartości suchej masy po zastosowaniu nanocząstek żelaza. Również pozostałe cechy biometryczne liści rzepaku jarego uprawianego w perlicie wykazały większe wartości po zastosowaniu nanożelaza. Najefektywniejszą dawką okazało się zastosowanie 10 ppm nanoFe. Stwierdzono istotny wzrost cech morfologicznych liści pod wpływem zwiększonych dawek nanożelaza. Obecne badania wykazały, że maksymalne wartości pomiarów wzrostu roślinnego, w tym powierzchni liści oraz zawartości suchej masy: liści i pędu głównego, zaobserwowano w roślinach traktowanych nano cząstkami a następnie żelazem chelatowym w porównaniu z roślinami nienawożonymi. Najlepszą dawką nanożelaza zastosowaną w kulturach *in vitro* okazała się aplikacja 50 ppm.

Żelazo (Fe) jest jednym z najistotniejszych mikroelementów, mającym istotny wpływ na zdrowotność roślin, jakość plonu oraz wytwarzanie produktów ubocznych w wielu uprawach. Zawartość żelaza w eksplantatach rzepaku jarego kształtowała się w zależności od analizowanego organu roślin. Największą średnią zawartością żelaza cechowały się korzenie – 907 ppm s. m., a najmniejszą koncentracją wykazały się łodygi – 96 ppm s. m.. Większą zawartością Fe w porównaniu do łodyg miały liście rzepaku hodowane *in vitro* (średnio 171 ppm s. m.). Natomiast uprawa rzepaku jarego w perlicie wykazała ogólnie mniejszą koncentrację Fe w liściach (średnio 113 ppm s. m.). Uzyskano korzystny wpływ zastosowanych dawek nanocząstek żelaza na koncentrację Fe w rzepaku jarym. Największą zawartością żelaza cechowały się nie tylko całe eksplantaty rzepaku jarego ale wszystkie analizowane organy roślin po zastosowaniu nanoFe w dawce 500 ppm. Ponadto w roślinach uprawianych w perlicie największą koncentracją żelaza cechowały się liście rzepaku jarego po zastosowaniu 5 ppm nanocząstek ($139,77 \% \text{ s. m.}$) a w ziemi ogrodniczo-uprawnej liście najmłodsze rzepaku ozimego po aplikacji 10 ppm nanoFe ($86,4 \text{ ppm s. m.}$). Jednak należy zwrócić uwagę, że uzyskano średnio większą zawartość żelaza w liściach najmłodszych rzepaku jarego i ozimego prowadząc uprawę w ziemi ogrodniczo-uprawnej. Wzrost akumulacji Fe w liściach rzepaku traktowanych nanocząstkami żelaza w porównaniu z obiektami kontrolnymi może wynikać z

właściwości nanocząstek Fe, które charakteryzują się mniejszą powierzchnią, większą absorpcją i większym przytwierdzeniem do roślin niż inne formy żelaza

Wyniki dotyczące zawartości magnezu wskazują na większą zawartość biopierwiastka w liściach rzepaku jarego uprawianego w perlicie po zastosowaniu nanożelaza (faza rozwoju kwitnienia roślin). Ogólna zawartość magnezu w liściach rzepaku jarego wynosiła średnio 0,63 % s. m. Natomiast najkorzystniejszą dawką nanoFe okazało się zastosowanie 10 ppm (71,8 % s. m.) oraz żelaza w formie chelatu (77,9 % s. m.) ponieważ uzyskano największą koncentrację Mg w ogonkach liści rzepaku jarego. Poprawa akumulacji niezbędnych składników odżywczych Mg oraz Fe w liściach może być spowodowana większym wzrostem korzeni rzepaku aplikacją dolistną różnymi źródłami żelaza oraz poprawą wchłaniania składników odżywczych przez roślinę.

4.5. Parametry korzeni roślin rzepaku

Budowa oraz wielkość systemu korzeniowego rzepaku oraz i innych roślin, determinuje ich produktywność. Wyniki pomiarów biometrycznych korzeni eksplantatów rzepaku jarego wskazują na różnice cech korzeni wynikające z fazy rozwoju roślin. Zdecydowanie większymi parametrami wykazywały się korzenie rzepaku oceniane w fazie kwitnienia w porównaniu do fazy rozwoju liści. W przeprowadzonych badaniach należy zwrócić uwagę na wpływ stosowania nanocząstek żelaza na cechy korzeni rzepaku. Dawka 25 ppm nanoFe zastosowana do roślin w kulturach *in vitro*, przyczyniła się do uzyskania najkorzystniejszych parametrów cech morfologicznych korzeni (całkowita powierzchnia - 15,9 cm², całkowita powierzchnia przeliczeniowa - 5,07 cm², całkowita objętość - 0,678 cm³, średnica - 1,40 mm) rzepaku jarego w fazie rozwoju liści. Natomiast w fazie kwitnienia rzepaku najkorzystniejsze cechy biometryczne uzyskały korzenie po aplikacjami nanoFe do roślin w ilościach 50 oraz 100 ppm. Jedynie długość korzeni eksplantatów rzepaku jarego w fazie rozwoju liści uległa obniżeniu po zastosowaniu nanocząstek żelaza. Najmniej korzystną dawką okazało się zastosowanie nanoFe w dawce 500 ppm, gdyż uzyskano znaczne aż 2,5-krotne obniżenie długości korzenia w porównaniu do obiektu kontrolnego (71,4 cm). Należy również podkreślić, że w fazie kwitnienia eksplantatów rzepaku jarego nie uzyskano istotnego wpływu stosowania nanocząstek żelaza a jedynie tendencje do obniżenia długości korzenia po zastosowaniu każdej z zastosowanych dawek nanoFe. Ponadto w fazie kwitnienia rzepaku korzenie charakteryzowały się zwiększeniem suchej masy po zastosowaniu nanocząstek żelaza a największą zawartość tego parametru uzyskano po aplikacji nanoFe w dawkach 50 ppm (0,299 g) oraz 100 ppm (0,274 g). Dla pozostałych pomiarów biometrycznych korzeni rzepaku jarego uzyskano lepsze wartości w odniesieniu do liczby korzonków (55,7 szt.·roślina⁻¹), liczby rozgałęzień korzeni (149,1 szt.·roślina⁻¹), liczby skrzyżowanych korzeni (22,36 szt.·roślina⁻¹) po zastosowaniu 100 ppm nanoFe w fazie rozwoju liści. Natomiast w fazie kwitnienia wyższymi parametrami cechowały się korzenie po aplikacji 25 ppm nanocząstek żelaza.

5. Wnioski

1. Natężenie procesów wymiany gazowej zależało od fazy rozwojowej rzepaku jarego oraz od dawki nanocząstek żelaza niezależnie od rodzaju podłoża, w którym uprawiano rośliny. Najwyższą aktywność fizjologiczną rzepaku jarego uprawianego w perlicie uzyskano w fazie rozwoju liści. Intensywność parametrów fotosyntezy (asymilacja CO₂, transpiracja oraz przewodność aparatów szparkowych) była największa po zastosowaniu 25 ppm nanocząstek żelaza w początkowych fazach rozwojowych eksplantatów rzepaku jarego. Istotnie największe obniżenie intensywności fotosyntezy netto oraz transpiracji rzepaku jarego pochodzącego z kultur *in vitro* miało miejsce po aplikacji do podłoża 500 ppm nanoFe.
2. Rośliny uprawiane w ziemi ogrodniczo-uprawnej wskazują na wzrost parametrów wykorzystania wody w późniejszych fazach rozwoju rzepaku jarego i ozimego. Każda z zastosowanych dawek nanoFe spowodowała wzrost badanych parametrów rzepaku jarego uprawianego w ziemi ogrodniczo-uprawnej. Natomiast eksplantaty rzepaku wykazały gwałtowny wzrost o 25% wskaźnika fotosyntezy WUEI od fazy BBCH 51 przy dawce nanoFe 50 ppm.
3. Rośliny uprawiane w perlicie oraz w ziemi ogrodniczo-uprawnej w początkowym okresie wzrostu niezależnie od stosowania nanocząstek żelaza miały najmniejsze wskaźniki fluorescencji początkowej i największe fluorescencji maksymalnej, co korzystnie wpływa na proces fotosyntezy.
4. Zwiększanie aplikacji nalistnej nanożelaza na rośliny uprawiane w perlicie oraz ziemi ogrodniczo-uprawnej wpłynęło korzystnie na obniżenie fluorescencji minimalnej chlorofilu a, w każdej fazie rozwoju rzepaku jarego w liściach najmłodszych. Stosowanie nanoFe w ilości 10 ppm korzystnie wpłynęło na rośliny rzepaku jarego uprawiane w perlicie i ziemi ogrodniczo-uprawnej dla liści najmłodszych oraz w początkowej fazie rozwoju roślin w liściach najstarszych, gdzie uzyskano najwyższe wartości maksymalnej wydajności fotoukładu PSII wskazujące na złagodzenie stresu u roślin (wartości powyżej 0,800).
5. Po zastosowaniu nanoFe w zakresie dawek 50-500 ppm w kulturach *in vitro* z roślinami rzepaku jarego otrzymano w późniejszych fazach rozwojowych (BBCH 41) istotny wzrost wskaźnika F_v/F_m. Wartość maksymalnej wydajności fotoukładu PSII wynosiła powyżej 0,850. Również, po zastosowaniu do roślin

- największych dawek nanocząstek żelaza (100 i 500 ppm) uzyskano maksymalne zawartości chlorofilu a (odpowiednio: 45,2 i 38,0 CCI) w liściach rzepaku jarego.
6. W kulturach *in vitro* parametry wzrostu rzepaku jarego zależały nie tylko od fazy rozwoju eksplantatów, ale także od zastosowanych dawek nanocząstek żelaza. Najwyższe wartości SLA, NAR i RGR uzyskano po zastosowaniu w kulturach *in vitro* odpowiednio: 50, 500 i 100 ppm nanoFe.
 7. Wielkość parametrów morfologicznych liści rzepaku zależała zarówno od fazy rozwojowej roślin oraz od podłoża, w którym prowadzono hodowlę rzepaku jarego. Maksymalne wartości pomiarów wzrostu wegetatywnego, w tym powierzchni liści oraz zawartości suchej masy: liści i pędu głównego, zaobserwowano w roślinach traktowanych nanoFe a następnie żelazem chelatowym. Najlepszą dawką nanożelaza zastosowaną w kulturach *in vitro* okazała się aplikacja 50 ppm.
 8. Większą średnio o 75,2 mg·kg⁻¹ s. m. zawartością Fe w porównaniu do łodyg wykazywały się liście rzepaku jarego pochodzące z hodowli *in vitro*. Natomiast uprawa rzepaku jarego w perlicie wykazała ogólnie mniejszą koncentrację Fe w liściach. Ponadto, największą zawartością żelaza cechowały się nie tylko całe eksplantaty rzepaku jarego ale wszystkie analizowane organy roślin po zastosowaniu nanoFe w dawce 500 ppm.
 9. W roślinach uprawianych w perlicie największą koncentracją żelaza cechowały się liście po zastosowaniu 5 ppm nanocząstek żelaza, natomiast w ziemi ogrodniczo-uprawnej niezależnie od wieku liści rzepaku jarego i ozimego po aplikacji 10 ppm nanoFe. Poprawa akumulacji składników mineralnych Mg oraz Fe w liściach roślin wynikała z większego wzrostu korzeni roślin rzepaku po aplikacji nanocząstkami żelaza.
 10. Większymi parametrami wykazywały się korzenie rzepaku jarego oceniane w fazie kwitnienia (BBCH 75-62) w porównaniu do fazy rozwoju liści (BBCH 12-15). Najkorzystniejszymi parametrami cech morfologicznych (całkowita powierzchnia, całkowita powierzchnia przeliczeniowa, całkowita objętość, średnica) korzeni rzepaku jarego w fazie rozwoju liści cechowały się rośliny po aplikacji 25 ppm nanoFe. Natomiast w fazie kwitnienia stosując do pożywek nanocząstki żelaza w dawkach 50 oraz 100 ppm.
 11. W fazie kwitnienia rzepaku jarego, korzenie charakteryzowały się największym zwiększeniem suchej masy korzeni średnio o 0,031 g po zastosowaniu nanocząstek żelaza w ilości 50 oraz 100 ppm. Ponadto, uzyskano lepsze wartości liczby korzonków, liczby rozgałęzień korzeni, liczby skrzyżowanych korzeni po zastosowaniu 100 ppm nanoFe w fazie rozwoju liści rzepaku jarego a po aplikacji 25 ppm nanocząstek żelaza w fazie kwitnienia. Jednak najmniej korzystną dawką nanoFe okazało się zastosowanie 500 ppm do pożywek, gdyż uzyskano aż 69% obniżenie długości korzenia rzepaku jarego.
 12. Najlepszą dawką nanoFe do stosowania w początkowych fazach rozwoju rzepaku jarego w hodowli *in vitro* okazało się 25 ppm. Natomiast do uprawy w późniejszych fazach rozwojowych eksplantatów rzepaku jarego należy rekomendować dawkę 50 ppm nanoFe, ponieważ uzyskano korzystniejsze cechy jakościowe roślin. Jednak rośliny rzepaku jarego uprawiane w perlicie cechowały się najlepszymi parametrami fizjologicznymi, fluorescencji chlorofilu a, zawartością Fe i Mg w liściach oraz wskaźnikami biometrycznymi liści po zastosowaniu nanoFe w dawce 10 ppm. Ponadto po aplikacji nanocząstek Fe w dawce 5 ppm na rośliny uprawiane w ziemi ogrodniczo-uprawnej uzyskano na ogół korzystny wzrost wszystkich badanych parametrów rzepaku jarego.

Bibliografia:

1. Álvarez-Fernández A., García-Marco S., Lucena J.J. (2005), Evaluation of synthetic iron (III)-chelates (EDDHA/Fe³⁺, EDDHMA/Fe³⁺ and the novel EDDHSA/Fe³⁺) to correct iron chlorosis. *European Journal of Agronomy*, 22(2), 119-130, <https://doi.org/10.1016/j.eja.2004.02.001>.
2. El-Gioushy S.F., Ding Z., Bahloul A.M., Gawish M.S., Abou El Ghit H.M., Abdelaziz A.M., El-Desouky H.S., Sami R., Khojah E., Hasim T.A., Kheir A.M., Zewail R.M. (2021), Foliar application of nano, chelated, and conventional iron forms enhanced growth, nutritional status, fruiting aspects, and fruit quality of washington navel orange trees (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plants*, 10(12), 2577, <https://doi.org/10.3390/plants10122577>.
3. Gorlach E., Mazur T. (2002), *Chemia rolna*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
4. Grillo R., Mattos B.D., Antunes D.R., Forini M.M., Monikh F.A., Rojas O.J. (2021), Foliage adhesion and interactions with particulate delivery systems for plant nanobionics and intelligent agriculture. *Nano Today*, 37, 101078, <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101078>.
5. Guerinot M.L., Yi Y. (1994), Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant physiology*, 104(3), 815-820, <https://doi.org/10.1104/pp.104.3.815>.
6. Hanhart P., Thieß M., Amari K., Bajdzienko K., Giavalisco P., Heinlein M., Kehr, J. (2017), Bioinformatic and expression analysis of the *Brassica napus* L. cyclophilins. *Scientific Reports*, 7(1), 1-17, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01596-5>.
7. Jankowski K., Budzyński W. (2007), Reakcja różnych form hodowlanych rzepaku ozimego na termin i gęstość siewu. II. Plon nasion i jego składowe. *Rosliny Oleiste*, 28(2), 195-207.

8. Jeong J., Guerinot M.L. (2009), Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends in plant science*, 14(5), 280-285, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.02.006>.
 9. Joshi H., Choudhary P., Mundra S.L. (2019), Future prospects of nanotechnology in agriculture. *Int. J. Chem. Stud*, 7(2), 957-963.
 10. Kandhol N., Singh V.P., Ramawat N., Prasad R., Chauhan D.K., Sharma S., Grillo R., Sahi S., Peralta-Videa J., Tripathi D.K. (2022), Nano-priming: Impression on the beginner of plant life. *Plant Stress*, 5, 100091, <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100091>.
 11. Khan Z., Khan S.H., Ghouri M.Z., Shahzadi H., Arshad S.F., Waheed U., Firdous S., Mehboob Q., Ahmad, A. (2019), Nanotechnology: An Elixir to Life Sciences, Preprints 2019020235, <https://doi.org/10.20944/preprints201902.0235.v1>.
 12. Kołota E., Komosa A., Chohura P. (2006), Wpływ chelatów żelazowych Librel Fe-DP7, Pionier Fe 13 i Top 12 na plonowanie pomidora szklarniowego uprawianego w wełnie mineralnej. *Acta Agrophysica*, 7(3), 599-609.
 13. Komosa A., Chohura P., Roszyk J. (2005), Wpływ temperatury i czasu użytkowania pożywki na zawartość żelaza dostępnego w chelatach żelazowych. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Rolnictwo*, 86, 259-265.
 14. Mahanta N., Kurmi K., Das J.C., Basumatary A. (2019), Nutrient content, uptake and oil content of rapeseed as influenced by reduced tillage, mulching and INM practices. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 3291-3295.
 15. Majumdar S., Peralta-Videa J.R., Trujillo-Reyes J., Sun Y., Barrios A.C., Niu G., Flores-Margez J.P., Gardea-Torresdey J.L. (2016), Soil organic matter influences cerium translocation and physiological processes in kidney bean plants exposed to cerium oxide nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 569, 201-211, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.087>.
 16. Prasad R., Shivay Y.S., Kumar D. (2014), Agronomic biofortification of cereal grains with iron and zinc. *Advances in agronomy*, 125, 55-91, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800137-0.00002-9>.
 17. Rudko T. (2011), Uprawa rzepaku ozimego, Rzepak- zasady uprawy-zdrowa żywność: poradnik dla producentów. Wydawnictwo Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN.
 18. Sheykhbaglou R., Sedghi M., Shishevan M.T., Sharifi R.S. (2010), Effects of nano-iron oxide particles on agronomic traits of soybean. *Notulae Scientia Biologicae*, 2(2), 112-113, <https://doi.org/10.15835/nsb224667>.
 19. Szymańska M. (2014), Rzepak-co przyniesie nowy sezon?. *Tygodnik Poradnik Rolniczy*, (23).
 20. Tyksiński W., Komosa A. (2007), Wpływ chelatów żelaza na plonowanie i zawartość żelaza w salacie szklarniowej. *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Ogrodnictwo*, 41, 637-641.
 21. Weymann W., Böttcher U., Sieling K., Kage H. (2015), Effects of weather conditions during different growth phases on yield formation of winter oilseed rape. *Field Crops Research*, 173, 41-48, <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.01.002>.
 22. Wu H., Li Z. (2022), Recent advances in nano-enabled agriculture for improving plant performance. *The Crop Journal*, 10(1), 1-12, <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.06.002>.
 23. Ylivainio K., Jaakkola A., Aksela R. (2004), Effects of Fe compounds on nutrient uptake by plants grown in sand media with different pH. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 167(5), 602-608, <https://doi.org/10.1002/jpln.200420412>.
 24. Zheng S.J. (2010), Iron homeostasis and iron acquisition in plants: maintenance, functions and consequences. *Annals of botany*, 105(5), 799-800, <https://doi.org/10.1093/aob/mcq082>.
-