

mgr inż. Justyna Pelc

Zastosowanie kwasu askorbinowego celem ograniczenia toksyczności związków
fluoru w glebie i roślinie

Application of ascorbic acid in order to reduce the toxicity of fluorine
compounds in the soil and the plant

Rozprawa doktorska

Napisana pod kierunkiem:

dr hab. inż. Beata Smolik, prof. ZUT

promotor pomocniczy: dr inż. Martyna Śnioszek

Katedra Bioinżynierii

Szczecin, 2023

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi
mojej rozprawy doktorskiej
Pani dr hab inż. Beacie Smolik, prof. ZUT
za cenne porady, a zwłaszcza za poświęcony czas i pomoc
w przygotowaniu niniejszej pracy*

*Pragnę również podziękować
Pani dr inż. Martynie Śnioszek
za pomoc podczas realizacji niniejszej pracy.*

*Chciałabym również podziękować Rodzinie i Przyjaciółom
za wyrozumiałość oraz wsparcie*

Spis treści

1. Przegląd literatury	14
1.1. Naturalne i antropogeniczne źródła fluoru w środowisku	14
1.2. Toksyczność fluoru wobec roślin.....	16
1.3. Stres oksydacyjny wywołany fluorem oraz mechanizmy detoksykujące	20
1.4. Wybrane antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne	23
1.4.1. Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6).....	23
1.4.2. Peroksydazy (POX, EC 1.11.1.7)	24
1.4.3. Kwas L-askorbinowy oraz enzymy cyklu askorbinowo-glutationowego.....	25
1.5. Chlorofil a, b oraz karotenoidy – barwniki fotosyntetyczne.....	27
1.6. Prolina i dialdehyd malonowy – wskaźniki stresu oksydacyjnego	27
1.7. Aktywność enzymów glebowych – wskaźnik zanieczyszczenia gleby	28
2. Materiał i metody	30
2.1. I etap – doświadczenie <i>in vitro</i>	30
2.2. II etap – doświadczenie <i>in vitro</i>	32
2.3. III etap – doświadczenie wazonowe	33
2.4. IV etap badań – dwuletnie doświadczenie wazonowe.....	34
2.5. Charakterystyka gleby użytej w etapie III, IV badań.....	35
2.6. Metoda pomiaru długości siewki i korzenia oraz indeksu kiełkownia	35
2.7. Metoda pomiaru świeżej masy roślin.....	36
2.8. Metody oznaczania parametrów biochemicznych i fizjologicznych	36
2.8.1. Metoda oznaczania zawartości wolnej proliny (Pro) w tkance roślinnej.....	36
2.8.2. Metoda oznaczania zawartości dialdehydu malonowego (MDA) w tkance roślinnej 36	
2.8.3. Metoda oznaczania zawartości barwników asymilacyjnych w tkance roślinnej 37	
2.8.4. Metoda oznaczania zawartości kwasu L-askorbinowego (Asc)	37
2.8.5. Metoda oznaczania aktywności katalazy (CAT) – [EC 1.11.1.6] w tkance roślinnej 37	
2.8.6. Metoda oznaczania aktywności peroksydaz (POX) – [EC 1.11.1.7] w tkance roślinnej 37	
2.9. Metoda oznaczenia aktywności fosfataz glebowych	37
2.10. Metoda oznaczenia aktywności dehydrogenaz glebowych.....	38
2.11. Obliczenia statystyczne	38
2.12. Warunki atmosferyczne	38
3. Wyniki	39

3.1.	Etap I.....	39
3.1.1.	Długość koleoptylu i korzenia 10-dniowych siewek.....	39
3.1.2.	Wartość świeżej masy i indeksu kiełkowania 10-dniowych siewek.....	42
3.1.3.	Zawartość proliny w 10-dniowych siewkach wybranych gatunków roślin uprawnych.....	44
3.1.4.	Zawartość chlorofilu a, b i karotenoidów w 10-dniowych siewkach różnych gatunkach roślin uprawnych.....	45
3.1.5.	Podsumowanie wyników I etapu badań.....	48
3.2.	Etap II.....	48
3.2.1.	Długość koleoptyli, korzeni, wartości indeksu kiełkowania oraz świeża masa 10-dniowych siewek pszenicy.....	49
3.2.2.	Zawartość MDA i wolnej proliny w liściach 10-dniowych siewek pszenicy jarej odmiany Bryza.....	51
3.2.3.	Zawartość chlorofilu a, b i karotenoidów w liściach 10-dniowych siewek pszenicy jarej odmiany Bryza, rosnącej w szalkach z dodatkiem 10 i 20 mM NaF oraz 0,5; 1 i 2 mM Asc.....	53
3.2.4.	Podsumowanie wyników II etapu badań.....	55
3.3.	Etap III.....	56
3.3.1.	Zawartość wolnej proliny i MDA w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc.....	56
3.3.2.	Zawartość chlorofilu a, b i karotenoidów w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc.....	60
3.3.3.	Zawartość kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc.....	63
3.3.4.	Aktywność katalazy i peroksydazy w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc.....	65
3.3.5.	Aktywność fosfatazy zasadowej i kwaśnej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru.....	68
3.3.6.	Aktywność dehydrogenaz w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc.....	71
3.3.7.	Podsumowanie wyników III etapu badań.....	72
3.4.	Etap IV.....	73
3.4.1.	Zawartość wolnej proliny w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej.....	73
3.4.2.	Synteza średniej zawartości wolnej proliny w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej pszenicy z dwóch lat badań 2016-2017.....	76
3.4.3.	Zawartość MDA w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej.....	77
3.4.4.	Synteza średniej zawartości MDA w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017.....	80

3.4.5.	Zawartość chlorofilu a w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej.....	81
3.4.6.	Synteza średnich zawartości chlorofilu a w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017	84
3.4.7.	Zawartość chlorofilu b w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej.....	85
3.4.8.	Synteza średnich wyników zawartości chlorofilu b w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017	87
3.4.9.	Zawartość karotenoidów w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej.....	88
3.4.10.	Synteza średnich wyników zawartości karotenoidów w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017	90
3.4.11.	Aktywność peroksydazy w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej.....	91
3.4.12.	Synteza średnich aktywności peroksydazy w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017	94
3.4.13.	Aktywność katalazy w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej.....	95
3.4.14.	Synteza średnich aktywności katalazy w liściach pszenicy jarej odmiany bryza rosnącej rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017	98
3.4.15.	Zawartość kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej.....	99
3.4.16.	Synteza średnich zawartości kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy jarej odmiany bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017	100
3.4.17.	Podsumowanie wyników IV etapu badań.....	102
4.	Dyskusja	103
5.	Wnioski.....	113
6.	Bibliografia	114

Streszczenie

Postępujące zmiany klimatu, działalność przemysłowa człowieka (w tym spalanie paliw kopalnych), jak również postępująca industrializacja, powodują zanieczyszczenie wszystkich komponentów środowiska poprzez emisję wielu szkodliwych związków, w tym fluoru. Pierwiastek ten, w hierarchii trucizn środowiskowych, klasyfikowany jest na piątym miejscu i charakteryzuje się wysoką toksycnością. Dotychczas nie wykazano pozytywnego wpływu fluoru na rośliny, wręcz przeciwnie zaobserwowano wiele negatywnych efektów z objawami fitotoksyczności włącznie. Na poziomie komórkowym związek ten odpowiedzialny jest za indukowanie stresu oksydacyjnego, degradację DNA i białek, peroksydację lipidów oraz inhibicję wielu enzymów, co skutkuje redukcją plonów rolnych dochodzącą nawet do ponad 50%. W związku z tym, niezwykle ważne i kluczowe jest opracowanie skutecznych metod zwiększających odporność roślin na toksycność fluoru. Hodowla roślin odpornych na dany czynnik stresowy jest metodą bardzo efektywną niestety długotrwałą, konieczne jest więc opracowanie metod, które w sposób szybki przyczynią się do niwelowania bądź łagodzenia efektów toksycznych u roślin. Egzogenne wykorzystanie związków naturalnie występujących w roślinach, mających właściwości antyoksydacyjne, wydaje się skutecznym sposobem zwiększenia odporności roślin. Do takich substancji zaliczamy między innymi kwas L-askorbinowy (wit. C), który jest jednym z najbardziej efektywnych antyoksydantów, szeroko rozpowszechnionych w komórkach roślinnych. Jest kofaktorem wielu enzymów oraz posiada zdolność odwracalnego utleniania i redukcji, dzięki czemu utrzymuje prawidłowy stan redoks komórki.

Głównymi celami określonymi w pracy były wybranie odpowiedniej dawki i formy aplikacji kwasu L-askorbinowego najefektywniej niwelujących stres fluorowy. Niniejsze cele zrealizowano podczas 4 etapów badań: dwa doświadczenia *in vitro* (etap I i II) i dwa doświadczenia wazonowe (etap III i IV).

W etapie I badań dokonano oceny reakcji 10 gatunków roślin na stres wywołany 10 mM NaF na podstawie pomiarów: biometrycznych, fizjologicznych i biochemicznych. Jedną z najbardziej wrażliwych roślin była pszenica, dlatego też to ją wybrano do kolejnych etapów badań.

Etap II dotyczył oceny łagodzenia stresu wywołanego przez 10 i 20 mM NaF poprzez zastosowanie trzech stężeń kwasu L-askorbinowego: 0,5 mM, 1 mM i 2 mM, na podstawie pomiarów: biometrycznych, fizjologicznych i biochemicznych. Uzyskane

wyniki wykazały, że stężenia 1 i 2 mM Asc najefektywniej niwelują stres wywołany 10 i 20 mM NaF

Podczas III etapu badań oceniono egzogenny (doglebowy) wpływ 1 mM i 2 mM kwasu L-askorbinowego, na stres wywołany 25 i 50 mM NaF w doświadczeniu wazonowym. W trzech terminach badań, dokonano oceny wpływu wyżej wymienionych czynników na parametry fizjologicznych oraz biochemicznych w roślinie, natomiast w glebie oznaczono aktywność enzymów: dehydrogenaz i fosfataz. Uzyskane wyniki wykazały, że kwas L-askorbinowy zastosowany w dwóch stężeniach łagodzi stres wywołany obecnością soli fluoru w roślinie, natomiast w glebie pogłębia nieznacznie stres.

W ostatnim IV etapie badań skupiono się na wybraniu najefektywniejszej formy aplikacji 0,5 mM kwasu L-askorbinowego, przy stresie wywołanym 50 mM NaF. Podczas tego doświadczenia badano wpływ trzech form aplikacji 0,5 mM kwasu L-askorbinowego (moczenia nasion, oprysku i podlewania) na stopień niwelowania toksyczności wywołanej obecnością 50 mM NaF w glebie. Wprowadzane 0,5 mM kwasu L-askorbinowego w postaci podlewania jak i dolistnego oprysku odbywało się cyklicznie w odstępach czasowych. Pobór próbek do badań odbywał się w następujących fazach rozwojowych pszenicy: trzeciego liścia, krzewienia, strzelania w źdźbło oraz kłoszenia. Ocenę stopnia łagodzenia stresu wywołanego fluorem wykonano na podstawie pomiarów: fizjologicznych i biochemicznych. Uzyskane wyniki wykazały, że zastosowane formy aplikacji kwasu askorbinowego skutecznie niwelują toksyczność wywołaną 50 mM NaF, a za najefektywniejszą formę aplikacji uznano podlewanie.

Słowa kluczowe: zanieczyszczenie środowiska, fluor, kwas L-askorbinowy, stres oksydacyjny

Abstract

Progressive climate change, human industrial activity (including the burning of fossil fuels), as well as ongoing industrialization are causing pollution of all environmental components through the emission of many harmful compounds including fluorine. This element is ranked fifth in the hierarchy of environmental poisons and is characterized by high toxicity. Until now, fluorine has not been shown to have a positive effect on plants, on the contrary, it causes many negative effects including symptoms of phytotoxicity. At the cellular level, this compound is responsible for the induction of oxidative stress, DNA and protein degradation, lipid peroxidation and inhibition of many enzymes resulting in up to 50% reduction in agricultural. Therefore, it is critical and important to develop effective methods to increase plant resistance to fluoride toxicity. Breeding plants that are resistant to a given stress is a very effective but unfortunately long-lasting method, so it is necessary to develop methods that will quickly contribute to leveling or mitigating toxic effects in plants. The exogenous use of naturally occurring compounds in plants that have antioxidant properties seems to be an effective way to increase plants resistance. Such substances include L-ascorbic acid (vitamin C), which is one of the most effective antioxidants widely distributed in plant cells. It is a cofactor of many enzymes and has the ability of reversible oxidation and reduction, thus maintaining the normal redox state of the cell.

The main objectives of the study were to select the appropriate dose and form of application of L-ascorbic acid which most effectively reduces fluoride stress. These objectives were achieved during 4 stages of research: two in vitro experiments (stages I and II) and two vase experiments (stages III and IV).

In stage I of the study, the response of 10 plant species to stress induced by 10 mM NaF was evaluated based on the following measurements: biometric, physiological and biochemical. One of the most sensitive plants was wheat therefore it was selected for the next stages of the study.

Stage II was run to evaluating the effects of mitigating stress induced by 10 and 20 mM NaF by applying three concentrations of L-ascorbic acid 0.5 mM, 1 mM and 2 mM based on measurements: biometric, physiological and biochemical. The results showed that concentrations of 1 and 2 mM Asc most effectively offset the stress induced by 10 and 20 mM NaF.

During stage III of the study, the exogenous (soil) effect of 1 mM and 2 mM L-ascorbic acid, on stress induced by 25 and 50 mM NaF in a pot experiment, was evaluated. On 3 dates, the effects of the above-mentioned factors on physiological and biochemical parameters in the plant were measured, while enzyme activities of dehydrogenases and phosphatases were determined in the soil. The results showed that L-ascorbic acid applied in two concentrations alleviated the stress caused by the presence of fluoride salts in the plant and soil.

The final IV stage of the study focused on selecting the most effective form of application of 0.5 mM L-ascorbic acid under stress induced by 50 mM NaF. Sampling for testing took place at the following developmental stages of wheat: third leaf, tillering, stem shooting and earing. The degree of fluoride-induced stress alleviation was evaluated based on measurements of physiological and biochemical parameters. The results showed that the applied forms of ascorbic acid effectively offset the toxicity induced by 50 mM NaF, and watering was considered the most effective form of Asc application.

Keywords: environmental pollution, fluoride, L-ascorbic acid, oxidative stress

Spis skrótowców

A – substrat utleniony

Asc – askorbinian, kwas L-askorbinowy, witamina C

AH₂ – substrat zredukowany

APX – peroksydaza askorbinianowa [EC 1.11.1.11]

cAPX – peroksydaza askorbinianowa (występującą w cytozolu)

CAT – katalaza [1.11.1.6]

Chl a – chlorofil a

Chl b – chlorofil b

DHA – dehydroaskorbinian

DHAR – reduktaza dehydroaskorbinianowa [EC 1.8.5.1]

F – fluor

F⁻ – jon fluorkowy

Flav – flawonoidy

GR – reduktaza glutationowa [GR 1.8.1.7]

GSH – glutation zredukowany

H₂O₂ – nadtlenuk wodoru

HO₂[•] – rodnik wodoronadtlenkowy

MDA – dialdehyd malonowy

MDHA – monodehydroaskorbinian

MDHAR – reduktaza monodehydroaskorbinianowa [1.6.5.4]

NADP⁺ – utleniona forma fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

NADPH – zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

NBT – błękit nitrotetrazoliowy

O₂^{•-} – anionrodnik ponadtlenkowy

¹O₂ – tlen singletowy

[•]OH – rodnik hydroksylowy

Phe – fenole

POX – peroksydaza gwajakolowa [EC 1.11.1.7]

RFT – reaktywne formy tlenu

s.m. – sucha masa

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa [EC 1.15.1.1]

ś.m. – świeża masa

Wstęp

Rośliny podczas wegetacji, są stale narażone na działanie różnorodnych czynników biotycznych oraz abiotycznych, które mogą być przyczyną stresów środowiskowych. Postępujący wzrost poziomu zanieczyszczenia środowiska m.in. związkami fluoru może wpływać na coraz to większe obciążenie organizmów roślinnych oraz środowiska glebowego. Konieczne wydaje się więc opracowanie metod, które w relatywnie szybki sposób złagodzą lub zniwelują skutki stresu wywołanego toksycznością fluorków np. poprawiając wzrost i rozwój roślin. Metody te mogą opierać się na aplikowaniu substancji biologicznie czynnych, które naturalnie występują w roślinach zarówno w sposób dolistny jak i doglebowy. Kwas L-askorbinowy jest jednym z najefektywniejszych, nieenzymatycznych antyoksydantów występujących naturalnie w tkankach roślinnych. Egzogeny dodatek tego związku może wpływać na zwiększenie endogennej puli askorbinianu w roślinie, jak również modulować aktywność innych związków antyoksydacyjnych. Dlatego egzogenne stosowanie związków regulujących wzrost roślin takich jak kwas L-askorbinowy może być wydajnym i prostym sposobem radzenia sobie ze szkodliwym wpływem m.in. związków fluoru na rośliny.

W dotychczasowej literaturze przedmiotu brak jest informacji na temat zastosowania kwasu L-askorbinowego w zapobieganiu toksyczności związków fluoru w roślinach. Witamina ta stosowana była dotychczas głównie przy stresach solnym oraz suszy. Były to badania w większości krótkoterminowe, nieuwzględniające wpływu kwasu L-askorbinowego na parametry zarówno biometryczne, fizjologiczne, biochemiczne roślin jak i aktywność biologiczną gleby.

W niniejszej pracy podjęto próbę ustalenia najbardziej efektywnego stężenia oraz sposobu aplikacji kwasu L-askorbinowego niwelującego toksyczny wpływ fluoru wobec roślin i środowiska glebowego.

Cel i zakres badań

W dostępnej literaturze zarówno krajowej jak i zagranicznej brak jest informacji dotyczących łagodzącego wpływu kwasu L-askorbinowego na rośliny oraz glebę poddanych toksycznemu działaniu związku fluoru (NaF). Stąd też, celem niniejszej pracy było ograniczenie toksyczności związków fluoru poprzez egzogenne zastosowanie kwasu L-askorbinowego. Cel ten zrealizowano poprzez cele szczegółowe, którymi były:

- Ocena i wybór gatunku rośliny uznanej za wrażliwą na podstawie parametrów morfologicznych, fizjologicznych oraz biochemicznych siewek 10-ciu roślin uprawnych powszechnie stosowanych w testach ekotoksykologicznych.
- Egzogenne zastosowanie Asc w celu złagodzenia stresu wywołanego przez NaF w roślinie wrażliwej, w warunkach *in vitro* i w doświadczeniu wazonowym.
- Określenie wpływu zastosowanie egzogennego Asc na aktywność enzymów glebowych w glebie zanieczyszczonej NaF.
- Wybranie najbardziej efektywnej metody aplikacji kwasu L-askorbinowego łagodzącej stres wywołany NaF w roślinie wrażliwej.

1. Przegląd literatury

1.1. Naturalne i antropogeniczne źródła fluoru w środowisku

Zmiany klimatu i wynikające z nich ekstremalne zjawiska pogodowe będą coraz intensywniejsze oraz coraz bardziej nieprzewidywalne, a potęgować je będzie rosnące zanieczyszczenie środowiska spowodowane działalnością przemysłową człowieka. Wśród groźnych związków, zatruwających środowisko często wymieniane są fluorki, który jak twierdzi Dutkiewicz (1995), zajmuje piąte miejsce w hierarchii trucizn środowiskowych.

Fluor wraz z metalami ciężkimi uważany jest za jeden z najbardziej niebezpiecznych pierwiastków odpowiadających za skażenie środowiska (Polkowska i in. 2010). Jego toksyczność spowodowana jest wąskim zakresem bezpieczeństwa dla organizmów żywych (Evdokimova 2001).

Fluor (F) powszechnie występuje w środowisku naturalnym, a jego całkowita zawartość w skorupie ziemskiej szacowana jest na 0,077% (Cai i in. 2017). Pierwiastek ten jest niemetalem z grupy fluorowców charakteryzującym się najwyższą elektroujemnością spośród wszystkich pierwiastków, co czyni go jednym z najbardziej reaktywnych. Dlatego też, fluor praktycznie nie występuje w przyrodzie w stanie wolnym (Kabata – Pendias i Pendias 1999). W postaci gazowej fluor występuje jako fluorowódor (HF) lub jako cząsteczka dwuatomowa (F₂). Naturalnymi źródłami tego pierwiastka są głównie gazy pochodzące z erupcji wulkanicznych oraz minerały takie jak apatyt (Ca₅(PO₄)₃F), kriolit (Na₃AlF₆), fluoryt (CaF₂) i topaz (Al₂(SiO₄)F₂), których wymywanie prowadzi do akumulacji fluoru w glebach (Cronin i in. 2000; Gadi i in. 2012).

W większości gleb, stężenie tego pierwiastka mieści się w przedziale między 20 a 500 mg·kg⁻¹. Ilości te są przede wszystkim zależne od rodzaju gleby, ponieważ zachowanie fluoru w glebach zależy głównie od zawartości w niej minerałów ilastych i od pH. Najwyższy poziom fluoru występuje w glebach gliniastych oraz wulkanicznych, w których jego zawartość może przekraczać 1000 mg F·kg⁻¹ gleby (Bhat i in. 2015). Nawet wyższy poziom tego pierwiastka, dochodzący aż do 5300 mg·kg⁻¹ suchej masy gleby obserwowano w glebach, w których zastosowano wysokie dawki nawozów fosforowych (ponieważ fosforyty zawierają około 4% F⁻, i jest on trudny w usunięciu podczas produkcji nawozów) (Kinnunen i in. 2003). W tabeli 1. przedstawiono zawartość fluoru w powierzchniowych warstwach gleb różnego typu w wybranych krajach.

Tab. 1. Zawartość fluoru w powierzchniowych warstwach gleb w różnych krajach – $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. (Kabata-Pendias i Pendias 1999)

Rodzaj lub typ gleby	Kraj	Zakres stężenia fluoru w glebie [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m.]	Średnie stężenie fluoru w glebie [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m.]
Piaszczyste (bielicowe)	Polska	20 – 150	85
	Szwecja	40 – 200	90
Pyłowe (lessy)	Polska	120 – 330	175
	USA	20 – 600	395
Gliniaste	Polska	250 – 750	420
	Szwecja	250 – 660	450
	USA	<10 – 800	410
	Wielka Brytania	110 – 700	460
Czarnoziemy	Rosja	455 – 1195	520
	USA	<10 – 940	350
Organiczne	Rosja	30 – 200	335
	Szwecja	40 – 125	75
	USA	10 – 300	250

Fluor na ogół nie podlega akumulacji w powierzchniowych warstwach gleby, gdyż znaczna jego część jest wypłukiwana i w konsekwencji przedostaje się do wód gruntowych. Do największego miejscowego wzbogacenia wody w ten pierwiastek dochodzi w strefach charakteryzujących się wzmożoną aktywnością wulkaniczną (Rajković i Novaković 2007; Polkowska i in. 2010). Zawartość fluoru w wodach powierzchniowych zazwyczaj nie przekracza $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Tylko około 20% ogólnej zawartości fluoru jest wiązana przez składniki mineralne osadów w morzach, natomiast pozostała ilość trafia wraz z parą wodną do atmosfery i ponownie opada z deszczem i śniegiem (Kabata-Pendias i Pendias 1999). Wysoka zawartość fluorków w wodzie (powyżej $1,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) związana jest z dużą ilością minerałów zawierających ten pierwiastek i występuje w większości państw Bliskiego Wschodu, Azji Wschodniej i Środkowej oraz Afryki (Petersen i Lennon 2004; WHO 2004).

Problem zanieczyszczenia środowiska związkami fluoru został zauważony stosunkowo niedawno i związany jest głównie z działalnością przemysłową człowieka, produkcją nawozów sztucznych (superfosfatów) oraz emisją związków fluoru do atmosfery w formie pyłowej i gazowej z hut aluminium w postaci fluorków sodu, glinu i węgla oraz kriolitu (Gautam i Bhardawaj 2010; Rajpoli i Tomaszewska 2011).

Istotnym źródłem fluoru, poza wyżej wymienionymi, są materiały używane do wypełnień stomatologicznych oraz środki stosowane w profilaktyce próchnicy takie jak: pasty, lakiery czy płukanki. W ich skład wchodzi głównie fluorki nieorganiczne, takie

jak: fluorek sodu (NaF) i potasu (KF), difluorek cyny (SnF₂), monofluorofosforan sodu (Na₂PFO₃) i sześćofluorokrzemian amonu (NH₄)₂SiF₆. W efekcie resztki tych substancji trafiają do wody a następnie do gleby (Kaczmarek i Kosior 2002; Gelmboldt i in. 2018).

Innym źródłem, bardzo często pomijanym lub nawet nieuwzględnianym, są farmaceutyki zawierające w swoim składzie związki fluoru. Są to między innymi leki przeciwgrzybicze zawierające fluorocytozynę, leki przeciwwymiotne stosowane podczas chemioterapii np. aprepitant (C₂₃H₂₁F₇N₄O₃), fluorouracyl (C₄H₃FN₂O₂), ofloksacyna (C₁₈H₂₀FN₃O₄), cyprofloksacyna (C₁₇H₁₈FN₃O₃) oraz inne z grupy fluorochinolonów, które praktycznie w sposób niezmienny wydalone są z organizmu człowieka. Do leków zawierających fluor zalicza się także niektóre antybiotyki m.in. flukloksacylinę (C₁₉H₁₇FCIN₃O₅S) oraz wiele innych związków stosowanych w leczeniu hipercholesterolemii, alergii i depresji (O'Hagan 2010; Amorima i in. 2014).

Fluor odgrywa coraz ważniejszą rolę w dziedzinach, takich jak badania medyczne czy materiałoznawstwo. W ostatnich 30 latach obserwuje się zwiększone wykorzystanie związków fluoru w badaniach agrochemicznych (Giornal i in. 2013). Obecnie około 25% herbicydów zawiera co najmniej jeden atom fluoru, lub fluor w postaci grup difluoro- i trifluorometylowych, co w znacznym stopniu przyczyniło się do rozwoju produktów przemysłu agrochemicznego (Fujiwara i O'Hagan 2014). Wprowadzenie fluoru do cząsteczek organicznych zwiększa właściwości lipofilowe herbicydów oraz szybkość penetracji komórek roślinnych i przyspiesza blokowanie miejsc aktywnych enzymów. Zjawisko to wykorzystywane jest w celu wzmocnienia właściwości grzybobójczych herbicydów (Guan i in. 2014).

1.2. Toksyczność fluoru wobec roślin

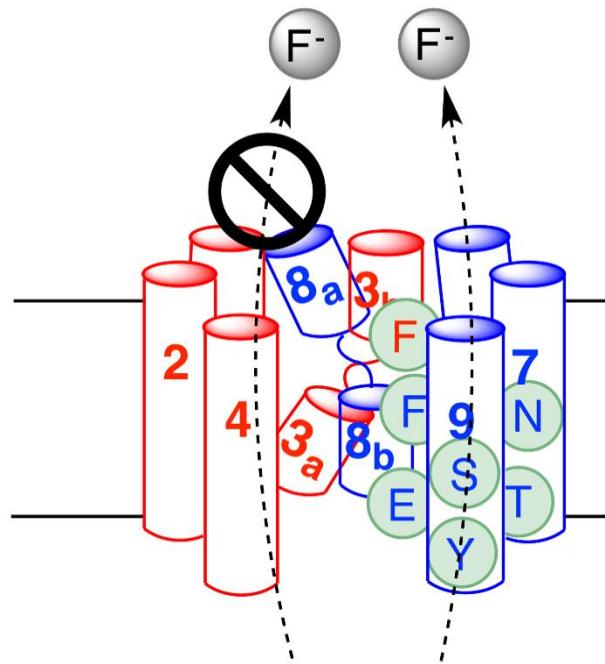
Fluor jest jednym z najbardziej toksycznych pierwiastków dla roślin i dotychczas nie wykazano jego pozytywnego wpływu na tę grupę organizmów.

Rośliny absorbują fluor głównie z powietrza za pomocą aparatów szparkowych. Pobór fluorków przez szparki w toku wymiany gazowej nasila się w wyniku działania czynników abiotycznych takich jak nasłonecznienie, wysoka temperatura i duża wilgotność (Gramowska i Siepak 2002). Natomiast fluor występujący w glebie jest pierwiastkiem przeważnie trudno dostępnym dla roślin. Jednak specyficzne warunki, takie jak wysokie stężenie F⁻, kwaśne pH gleby oraz wysoka zawartość materii nieorganicznej, zwiększają jego biodostępność (Machoy 1990; Rajesh i in. 2012). Pierwiastek ten pobierany jest przez korzenie, następnie przemieszcza się przez tkanki

roślinne do liści, w których jest odkładany, powodując szereg niekorzystnych zmian (Mezghani i in. 2005; Kumar i Rani 2010; Rajesh i in. 2012; Saini i in. 2013; Singh i Verma 2013). Biokumulacja fluoru w tkankach roślin odbywa się w różnym stopniu nasilenia np. zawartość w liściach może znacząco przewyższać jego stężenie w powietrzu oraz glebie (Gramowska i Siepak 2002; Joshi i Bhardwaj 2007; Radha i Bhardwaj 2010; Rajesh i in. 2012).

Należy jednak podkreślić, że tylko niewielkie ilości F^- przechodzą do wnętrza komórek. Najwięcej F^- znajduje się w ścianach komórkowych i przestrzeniach międzykomórkowych (apopląście). Jest to związane z tym, że endoderma działa jak bariera, przez co ogranicza transport F^- do układu przewodzącego i dalej do pędów. Ponadto jon fluorowy podobnie jak ściany komórkowe posiada ładunek ujemny (F^-) przez co tylko niewielkie ilości tego pierwiastka są w stanie przedostać się przez barierę endodermalną – stąd tak duże ilości F^- w apopląście (Weinstein i Davison 1998).

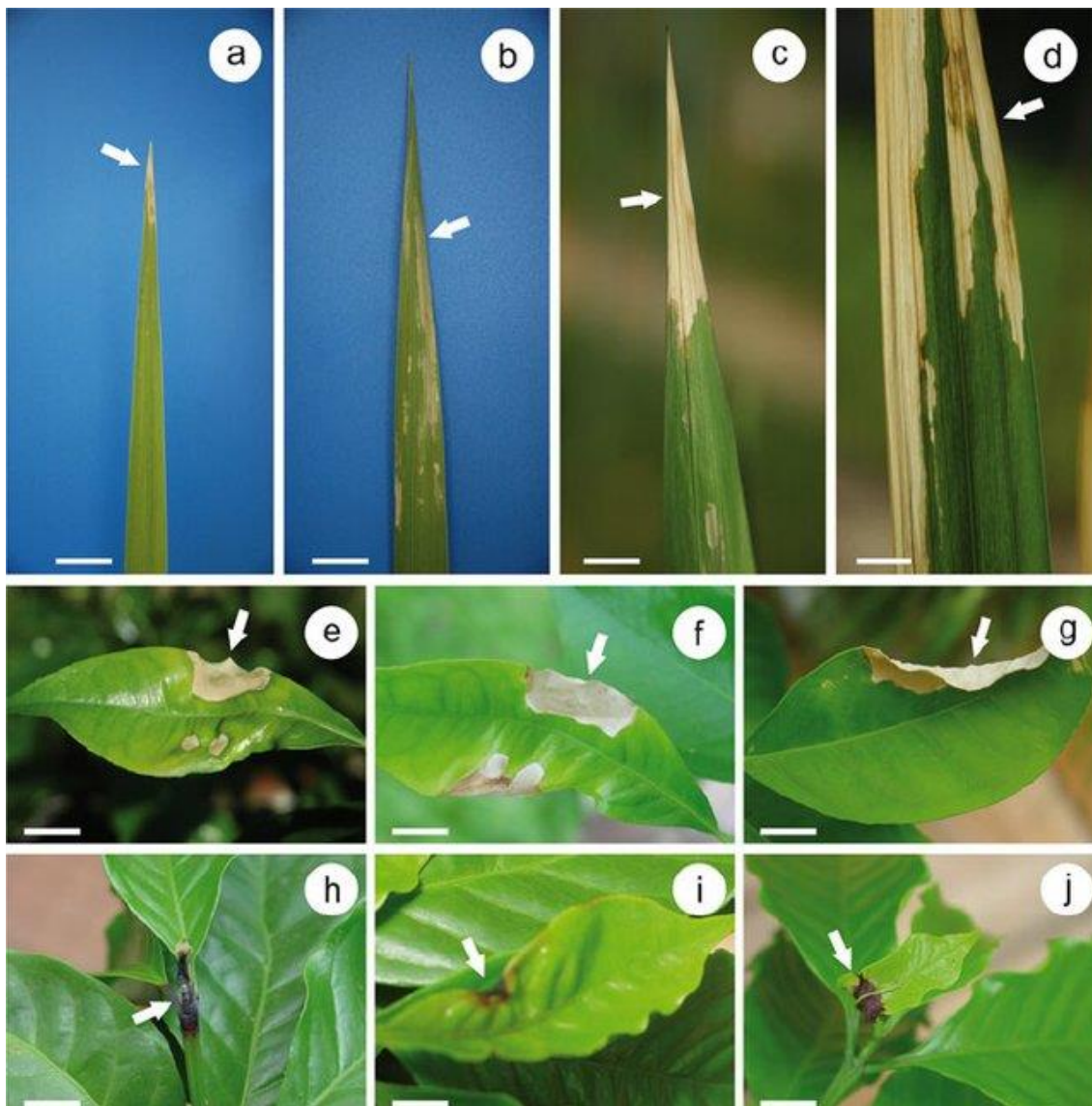
W 2013 roku badacze z USA odkryli, że za różną tolerancją organizmów roślinnych na fluor mogą stać specyficzne białka FEX (ang. Fluoride EXporters channels). W wyniku doświadczenia na drożdżach piekarskich *S. cerevisiae*, z niedoborem FEX wykazano, że organizmy te są bardziej wrażliwe nawet na niskie stężenia F (poniżej 1,5 mM). Po dopasowaniu sekwencji FEX odkryto te specyficzne białka również w organizmach roślinnych (Li i in. 2013). Rolą tych białek jest zapewnienie mechanizmu detoksykacji organizmom eukariotycznym oraz zwiększenie poziomu tolerancji na fluor (Berbasova i in. 2017). Na rys. 1 przedstawiono białka FEX z zaznaczonym kierunkiem transportu F^- z wnętrza komórki. Pierwotnie białka te składały się z dwóch kanałów, jednakże rośliny w toku ewolucji utraciły funkcjonalność jednego z nich. Pomimo tej ewolucyjnej zmiany, ogólna architektura kanału jest identyczna zarówno dla bakterii jak i eukariotów (Stockbridge i in. 2015).



Rys. 1. Białka FEX z zaznaczonym kierunkiem transportu jonu fluorkowego – na czerwono zaznaczono kanał nieaktywny – który w toku ewolucji utracił zdolność transportu jonu fluorkowego; na niebiesko zaznaczono kanał funkcjonujący jako aktywny transporter jonu fluoru (Li i in. 2013)

Szybkość powstawania objawów toksyczności na fluor u roślin, zależna jest od wielu czynników, takich jak: rodzaj i stężenie tego pierwiastka, odległość od źródła emisji fluoru, czas trwania ekspozycji oraz warunków meteorologicznych (np.: opady, kierunek wiatru) (Kumar i Rani 2010). Wyróżnia się dwie formy uszkodzeń roślin powstałych w efekcie toksycznego działania fluoru: chlorozy i nekrozy (rys. 2).

Powstawanie chlorozy spowodowane jest rozrywaniem błon chloroplastowych oraz blokowaniem przez fluor syntezy kwasu δ -aminolewulinowego, który jest prekursorem biosyntezy chlorofilu (Bhargava i Bhardwaj 2010; Chakrabarti i Patra 2013b). Następstwem chloroz są nekrozy (martwice) liści, postępujące od wierzchołka do układu waskularnego. Pomiędzy zdrową a martwiczą częścią liścia wyróżnia się brązowo-czarna linia, w której obrębie występuje największe stężenie fluoru (Gramowska i Siepak 2002). Najbardziej wrażliwe na fluor są młode rozwijające się liście i to właśnie na nich już przy niskich stężeniach fluorków pojawiają się wyżej wymienione uszkodzenia (Davison i Weinstein 1998; Singh i in. 2013; Gautam i Bhardwaj 2010). Objawy toksyczności fluoru przedstawiono na rys. 2.



Rys. 2. Objawy uszkodzenia liści u roślin spowodowane przez związki fluoru; a-d: mieczyk, objawy zaczynające się na wierzchołku liścia (wskazane strzałką) i przechodzące w ostrze liścia (wskazane strzałką); e-g: cytrusy, objawy zaczynające się od krawędzi liści (wskazane strzałką) i przechodzące w ostrze liścia (wskazane strzałką); h-j: kawa, łodyga i liście z czarnymi plamkami martwiczymi (wskazane strzałką) przechodzącymi w blaszkę liścia (Mesquita i in. 2011)

Chloroplasty są głównym miejscem akumulacji fluoru. Nadmiar jonów fluorkowych wpływa niekorzystnie na przebieg procesu fotosyntezy głównie poprzez redukcję syntezy chlorofilu oraz przez degradację struktury chloroplastów i hamowanie reakcji Hill'a. Wysokie stężenie F^- zmniejsza dostępność jonów Fe^{2+} niezbędnych do syntezy chlorofilu oraz prowadzi do zwiększenia aktywności enzymów degradujących chlorofil, takich jak chlorofilaza. Ponadto F^- hamuje transport elektronów, szczególnie w fotosystemie II (Radha i Bhardwaj 2010; Rajesh i in. 2012).

Jednym z najlepiej poznanych mechanizmów działania fluoru w tkance roślinnej jest blokowanie enolazy, która jest kluczowym enzymem glikolitycznym. Enzym ten katalizuje dehydratację 2-fosfoglicerynianu do fosfenolopirogronianu (2-fosfo-D-glicerynianu \leftrightarrow fosfoenolopirogronianu + H₂O) w ostatnich etapach katabolicznego szlaku glikolitycznego. Fluor wpływa na metabolizm energetyczny w tkance roślinnej poprzez utworzenie kompleksu z Mg²⁺ w miejscu aktywnym enolazy, co całkowicie ją inaktywuje, a także poprzez hamowanie enzymów syntetyzujących ATP w chloroplastach, mitochondriach i błonie plazmatycznej odpowiedzialnych za tworzenie ATP. Pierwiastek ten blokuje również enzymy takie jak karboksylazę rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO) oraz syntazę sacharozy (Miller i Miller 1974; Rakowski 1997).

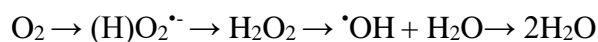
W wyniku pobierania fluorków przez rośliny dochodzi również do spadku zawartości wapnia (Ca²⁺) i żelaza (Fe³⁺) w tkankach oraz obniżenia wchłaniania manganu (Mn²⁺) przez system korzeniowy (Kim i in. 2003; Elloumi i in. 2005; Kumar i Rani 2010). Ponadto w wyniku procesu detoksykacji może dochodzić do uszkodzenia liści, ponieważ w celu zmniejszenia toksyczności fluoru, jony Mg²⁺, będące elementem budowy chlorofilu, tworzą kompleks MgF₂ (Elloumi i in. 2005). Może to prowadzić do spadku zawartości chlorofilu w liściach nawet o 80%, a także uniemożliwiać dalszą syntezę chlorofilu a i b oraz innych barwników w tym karotenoidów (Gupta i in. 2009; Gadi i in. 2012; Pal i in. 2012).

Nawet przy niskich stężeniach fluorków (1 mM) może dochodzić do szeregu fizjologicznych i biochemicznych zmian w tkankach, które nie powodują widocznych obrażeń organów roślinnych. Rośliny takie są mniej odporne na choroby wirusowe i działanie patogenów takich jak owady pasożytnicze i bakterie. W wyniku zaburzeń metabolizmu hormonów roślinnych, niemożliwe jest zapłodnienie lub dochodzi do zapłodnienia tylko niektórych kwiatów. Owoce są mniej liczne, często dojrzewają przedwcześnie lub nierównomiernie i szybko ulegają zepsuciu (Davison i Weinstein 1998). Singh i Verna (2013) w badaniach przeprowadzonych na topoli wykazali, że już 1 mM stężenie NaF wpływa hamująco na syntezę hormonów z grupy auksyn, przez co niemożliwy jest prawidłowy wzrost drzew (Datta i in. 2012; Chakrabarti i Patra 2013a).

1.3. Stres oksydacyjny wywołany fluorem oraz mechanizmy detoksykujące

W wyniku naturalnie przebiegających procesów metabolicznych oraz pod wpływem m.in. związków fluoru w roślinie powstają, jako produkty uboczne, reaktywne formy tlenu (RFT) (Allen 1995; Yadu i in. 2016).

W pierwszym etapie redukcji tlenu cząsteczkowego O₂ powstaje relatywnie krótko żyjący i słabo dyfundujący rodnik wodoronadtlenkowy (HO₂[•]) oraz anionorodnik ponadtlenkowy (O₂^{•-}).



Rodniki te mogą tworzyć hydroksynadtlenki reagując z dienaniami, jak również utleniać aminokwasy (np.: histydynę, metioninę i tryptofan). Dalsza redukcja powstałych rodników tlenowych generuje nadtlenek wodoru (H₂O₂), który ma relatywnie długi okres półtrwania (1 ms). Jego toksyczność wiąże się z utlenianiem grup tiolowych (-SH) oraz utlenianiem jonów metali przejściowych (np. Fe²⁺ do Fe³⁺, Cu⁺ do Cu²⁺). Utlenianie Fe²⁺ do Fe³⁺ prowadzi do powstawania rodnika hydroksylowego (•OH) (Szymańska i Strzałka 2010).



Rodzaje i właściwości wybranych RFT przedstawiono w tab. 2.

W normalnych warunkach istniejące systemy antyoksydacyjne komórki utrzymują odpowiednią równowagę pomiędzy produkcją a usuwaniem RFT (Sharma i in. 2012). Nadmiar powstających metabolitów tlenowych w wyniku działania związków fluoru prowadzi do stresu oksydacyjnego. Pojęciem stresu oksydacyjnego określa się zaburzenia homeostazy prowadzące do zwiększania produkcji reaktywnych form tlenu (Bartosz 2013, Halliwell 2006, Sharma i in. 2012, Cai i in. 2017). Podwyższone stężenie każdej z reaktywnych form tlenu jest szkodliwe dla roślin, a brak mechanizmów obronnych może poważnie zakłócić prawidłowy metabolizm komórkowy i doprowadzić do uszkodzenia białek, lipidów, węglowodanów, kwasów nukleinowych, inhibicji enzymów, aktywacji szlaku programowanej śmierci komórkowej (PCD, z *ang.* programmed cell death) i ostatecznie do śmierci komórki (Gill i Tuteja 2010; Datta i in. 2012; Gadi i in. 2012; Chakrabarti i Patra 2013a; Parkhey i in. 2014). Fluor powoduje nie tylko zwiększoną produkcję RFT, ale również inaktywację enzymów niezbędnych do ich rozkładu (Allen 1995; Saleh i Abdel-Kader 2003; Barbier i in. 2010; Datta i in. 2012, Gadi i in. 2012, Chakrabarti i Patra 2013a; Parkhey i in. 2014; Yadu 2016; Cai i in. 2017).

Tab. 2. Rodzaje i właściwości reaktywnych form tlenu (Nowicka i Kruk 2013)

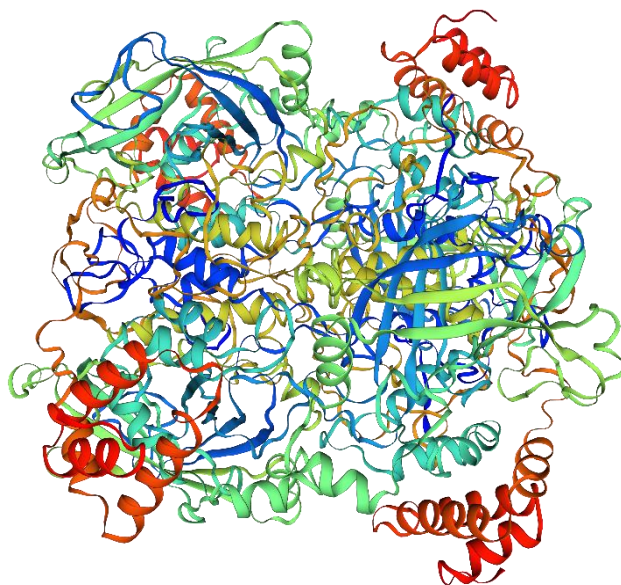
Tlen singletowy $^1\text{O}_2$	<ul style="list-style-type: none">- indukuje peroksydację lipidów- uszkadza białka,- utlenia DNA, głównie guaninę- utlenia chlorofil- utlenia inne związki zawierające wiązania nienasycone, tworząc cykloaddukty, wodoronadtlenki oraz endoperoksydy
Anionorodnik ponadtlenkowy $\text{O}_2^{\cdot-}$	<ul style="list-style-type: none">- krótki czas życia- uszkadza centra żelazo-siarkowe (Fe-S) w enzymach- może redukować jony metali przejściowych np. Fe^{3+}, Cu^{2+}- reaguje z grupami tiolowymi cysteiny, może także utleniać histydynę, metioninę, tryptofan- może reagować ze związkami zawierającymi wiązania nienasycone dając hydroksynadtlenki- reaguje z tlenkiem azotu, dając bardzo silnie utleniający i szkodliwy dla komórek nadtlenoazotyn
Rodnik wodoronadtlenkowy HO_2^{\cdot}	<ul style="list-style-type: none">- występuje przede wszystkim w przedziałach o niskim pH- może przechodzić przez błony biologiczne- aktywność podobna do $^1\text{O}_2$
Nadtlenek wodoru H_2O_2	<ul style="list-style-type: none">- mniej reaktywny, relatywnie stabilny, większy zasięg działania- elektrycznie obojętny, może dyfundować przez błony- wchodzi w reakcje z grupami tiolowymi, indolowymi, imidazolowymi, fenolowymi, tioestrowymi i metionylowymi- uszkadza klaster Mn w centrum rozkładającym wodę w PS II oraz grupy hemowe
Rodnik hydroksylowy $\cdot\text{OH}$	<ul style="list-style-type: none">- najbardziej reaktywna forma tlenu- reaguje z każdą napotkaną cząsteczką z szybkością ograniczoną jedynie przez dyfuzję- najmniej trwały, jego działanie ograniczone jest do miejsc jego powstawania

Jednakże, rośliny w toku ewolucji wykształciły mechanizmy radzenia sobie ze stresem oksydacyjnym poprzez wykształcenie tzw. systemu antyoksydacyjnego (Fujita i in. 2006), dzięki któremu usuwają lub detoksykują RFT. System ten obejmuje enzymatyczne oraz nieenzymatyczne przeciwutleniacze (Gill i Tuteja 2010). Do enzymatycznych przeciwutleniaczy zalicza się dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę (CAT), peroksydazę (POX), enzymy cyklu askorbinianowo-glutationowego (Asc-GSH), takie jak peroksydaza askorbinianowa (APX), reduktaza monodehydroaskorbinowa (MDHAR), reduktaza dehydroaskorbinianowa (DHAR) i reduktaza glutationowa (GR). Do nieenzymatycznych zalicza się min. kwas L-askorbinowy (Asc), glutation (GSH), flawonoidy i polifenole.

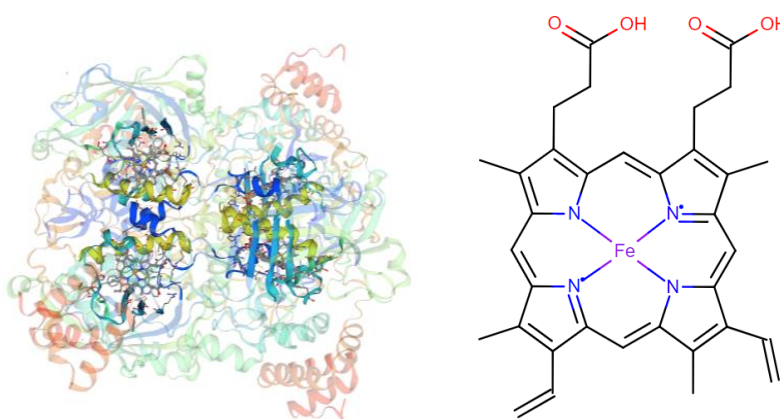
1.4. Wybrane antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne

1.4.1. Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6)

Katalaza jest enzymem, który katalizuje reakcję dysproporcjonowania nadtlenu wodoru. Enzym ten, jest hemotetramerem, w którym w każdej jednostce osadzony jest układ hemowy z położonym centralnie atomem żelaza, związanym w centrum aktywnym wiązaniami koordynacyjnymi – rys. 3 i 4 (Gałęcka i in. 2008).



Rys. 3. Hemotetramer cząsteczki katalazy (SWISS model <https://swissmodel.expasy.org/templates/4qol.1> <https://www.rcsb.org/ligand/HEM>)



Rys. 4. Hemotetramer katalazy z zaznaczonymi układami hemowymi (po lewej) oraz budowa układu hemowego z centralnym atomem żelaza (po prawej) (<https://swissmodel.expasy.org/templates/4qol.1> <https://www.rcsb.org/ligand/HEM>).

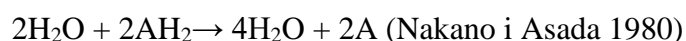
Dotychczas wyizolowano trzy formy izomeryczne katalazy: CAT-1, CAT-2, CAT-3. Dwie pierwsze występują w peroksysomach, glioksysomach i cytozolu, czyli w miejscach obfitego powstawania nadtlenu wodoru, natomiast trzecia forma występuje w mitochondriach (Małecka i Tomaszewska 2005; Gill i Tuteja 2010).

Enzym ten jest obecny praktycznie we wszystkich organizmach tlenowych i służy do szybkiego usuwania nadtlenu wodoru (Reilly i in. 2001). W ciągu sekundy rozkłada ok. 200 tysięcy cząsteczek (Gałecka i in. 2008). Dysproporcjonowanie H_2O_2 przebiega w dwóch etapach. W pierwszym etapie, dzięki jonowi żelaza Fe (III) układu hemowego, nadtlenek wodoru jest redukowany do wody, w drugim natomiast, kolejna cząstka nadtlenu wodoru jest utleniana przy pomocy Fe (V)-CAT do tlenu cząsteczkowego i wody (Gałecka i in. 2008).

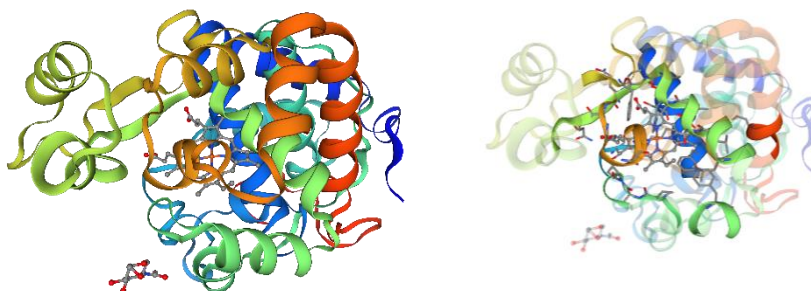
Katalaza wykazuje również właściwości peroksydazowe, co oznacza, że może rozkładać H_2O_2 , utleniając inne substancje, przede wszystkim etanol, metanol, formaldehyd, azotany (III) i chinony. Enzym ten zdecydowanie szybciej reaguje z nadtlentem wodoru niż typowe peroksydazy roślinne (Sala i Lafuente 2000; Małecka i Tomaszewska 2005; Bartosz 2013).

1.4.2. Peroksydazy (POX, EC 1.11.1.7)

Peroksydazy to powszechnie występujące w roślinach enzymy, katalizujące rozkład H_2O_2 , jednak nie bezpośrednio – jak katalaza – do H_2O i O_2 , lecz poprzez utlenianie odpowiednich substratów (Małecka i Tomaszewska 2005).



Peroksydazy podobnie jak katalazy są hemoproteinami (rys. 5).



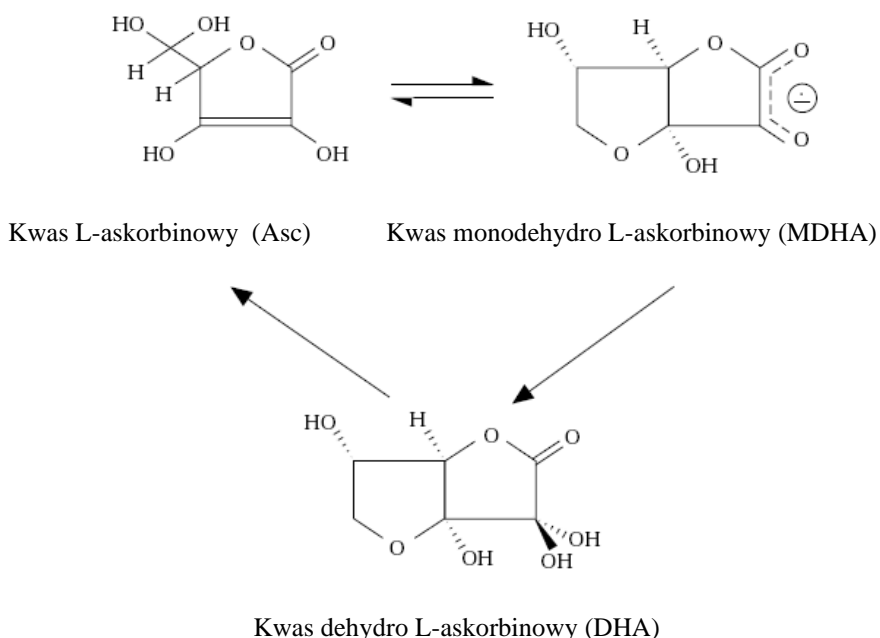
Rys. 5. Cząsteczka peroksydazy (po lewej) oraz cząsteczka peroksydazy z zaznaczonym układem hemowym z atomem żelaza w centrum (po prawej) (<https://swissmodel.expasy.org/templates/4qol.1> <https://www.rcsb.org/ligand/HEM>)

Dzieli się je na dwa rodzaje: utleniające produkty będące donorami elektronów oraz biorące udział w zmiataniu H_2O_2 i nadtlenków organicznych. W roślinach, peroksydazy pierwszej grupy biorą udział, np. w degradacji kwasu indolo-3-octowego i syntezie etylenu. Do grupy tej należą, tzw. peroksydazy pirogallowe/gwajakolowe, używające szerokiego zakresu donorów elektronów. Usuwają one nadtlenek wodoru i organiczne nadtlenki, które powstają w wyniku działania oksydaz, w ściśle kontrolowanych warunkach, jako odpowiedź na środowiskowe i komórkowe sygnały (Asada 1992).

1.4.3. Kwas L-askorbinowy oraz enzymy cyklu askorbinowo-glutationowego

Kwas L-askorbinowy (askorbinian, witamina C, Asc) jest jednym ze związków występujących w komórkach roślinnych w stężeniu od 10 do 100 mM. Występuje głównie w apoplacie, cytozolu, plastydach i wakuoli (Kacperska 2002). Jest kofaktorem enzymów biorących udział w fotosyntezie i biosyntezie hormonów, w tym etylenu (ET), kwasu jasmonowego (JA), kwasu salicylowego (SA), kwasu abscysynowego (ABA) i kwasu giberelinowego (GA_3), przez co uczestniczy w procesach regeneracji innych przeciwutleniaczy (Khan i in. 2011). Ponadto kwas L-askorbinowy działa jako cząsteczka sygnałowa zaangażowana w odpowiedź roślin na czynniki środowiskowe, a także reguluje polaryzację komórek podczas rozwoju zarodka, moduluje czas kwitnienia i początek starzenia (Gallie 2013). Oprócz wyżej wymienionych funkcji, kwas L-askorbinowy jest jednym z najefektywniejszych nieenzymatycznych antyoksydantów. Obok glutationu i α -tokoferolu bierze czynny udział w detoksykacji wytworzonych pod wpływem stresów reaktywnych form tlenu (Dolatabadian i Jouneghanic 2009; Kumar i in. 2013; Kostopoulou i in. 2015). Askorbinian jest częścią systemu usuwania wolnych rodników, który jest niezwykle skomplikowany i obejmuje szeregi związków antyoksydacyjnych oraz enzymów detoksykujących. Antyoksydacyjne właściwości kwasu askorbinowego wynikają z możliwości odwracalnego odłączania protonów i przyjmowania elektronów. W cyklu Halliwella-Asady, dwie cząsteczki kwasu askorbinowego są wykorzystywane przez APX do redukcji H_2O_2 do wody przy równoczesnym wytwarzaniu rodnika monodehydroaskorbinowego (MDHA). Dlatego też askorbinian jest jednym z najważniejszych związków zaangażowanych w usuwanie H_2O_2 w roślinach (Hong i in. 2008; Sharma i in. 2012). Asc może zostać odtworzony w komórce roślinnej za pomocą kilku różnych mechanizmów, w szczególności poprzez krótko żyjący MDHA, powstały w wyniku utleniania Asc. Rodnik ten ulega redukcji przez reduktazę monodehydroaskorbinianową (MDAR) lub dysproporcjonowaniu do

dehydroaskorbinianu (DHA) i Asc (rys. 6). Poprzez ciągłe odtwarzanie oraz utrzymywanie stałego poziomu kwasu askorbinowego i jego stanu redoks, Asc odgrywa bardzo ważną rolę w unieszkodliwianiu reaktywnych form tlenu, powstałych w warunkach m.in. stresu fluorkowego (Gallie 2013; Liu i in. 2014; Macknight i in. 2017; Suekawa i in. 2017).



Rys. 6. Budowa askorbinianu (Asc) i jego form utlenionych: monodehydroaskorbinianu (MDHA) i dehydroaskorbinianu (DHA) (Smirnoff 1996)

Utrzymywanie wysokiej zdolności antyoksydacyjnej do usuwania toksycznych RFT wiąże się ze zwiększoną tolerancją roślin na stropy środowiskowe co ma istotne znaczenie m.in. w rolnictwie (Sharma i Dubey 2007; Sharma i in. 2012). Zawartość Asc w tkance roślinnej można zwiększyć egzogeniie, np. poprzez zaprawianie lub moczenie nasion, oprysk liści, podlewanie i nawożenie roztworami tej witaminy (Khan i Ashraf 2008). Celem zaprawiania i moczenia nasion różnymi stężeniami Asc jest zabezpieczenie kiełkujących nasion przed patogenami i szkodnikami przenoszonymi na nasionach i występującymi w glebie. Proces ten w połączeniu z nawożeniem przedsiewnym nasion pozwala również na poprawienie niektórych procesów metabolicznych niezbędnych w procesie kiełkowanie oraz stymuluje rozwój systemu korzeniowego roślin (Nawaz i in. 2013). Zabiegi te wpływają również na aktywację różnych procesów biochemicznych oraz na szybkość kiełkowania. Wstępne nasączenie nasion w roztworze Asc zwiększa dostępność zarówno substancji nieorganicznych, jak i organicznych (Capron i in. 2000). Według Kaya i in. (2006) oraz Farooq i in. (2009) technika ta jest jedną z najbardziej praktycznych aczkolwiek krótkoterminowych czynności łagodzących skutki suszy

i innych stresów środowiskowych. Ziarna poddane takim zabiegom charakteryzują się zwykle szybszym kiełkowaniem (Brocklehurst i in. 1984; Kaya i in. 2006; Farooq i in. 2009). Liczne badania wykazały, że egzogenne stosowanie kwasu L-askorbinowego odgrywa istotną rolę w poprawie tolerancji roślin na stres abiotyczny (Farooq i in. 2012; Venkatesh i Park 2014). Wykazano także korzystny wpływ aplikacji Asc na metabolizm komórkowy w różnych roślinach uprawianych w warunkach stresów abiotycznych np. rzepaku (Bybordi 2012), okry *Abelmoschus esculentus*, kukurydzy *Zea Mays* w warunkach stresu solnego (Agami 2014; Raza i in. 2019), czy rzepaku *Brassica napus* L. w warunkach stresu wodnego (Shafiq i in. 2014).

1.5. Chlorofil a, b oraz karotenoidy – barwniki fotosyntetyczne

Barwniki fotosyntetyczne takie jak chlorofil a oraz b odgrywają kluczową rolę w procesie fotosyntezy u roślin. Rolą obu tych związków jest pochłanianie energii świetlnej w zakresie widzialnym, a ich główne pasma pochłaniania znajdują się w niebieskiej i czerwonej części widma absorpcji wzbudzonych elektronów na fotoukłady. W wyniku tego procesu możliwe jest przekształcenie energii świetlnej w energię chemiczną oraz redukcja NADP^+ do $\text{NADPH} + \text{H}^+$ i wytworzenie ATP niezbędnych w cyklu Calvina-Bensona. W wyniku działania stresów abiotycznych może dojść do zaburzenia produkcji chlorofilu a i b, co skutkuje zaburzeniem procesu fotosyntezy i może doprowadzić do śmierci rośliny.

Karotenoidy natomiast są to barwniki asymilacyjne, które odgrywają jedną z głównych ról w ochronie roślin przed procesami fotooksydacyjnymi. Są skutecznymi przeciwutleniaczami wychytującymi singletowy tlen cząsteczkowy i rodniki nadtlenowe. Oprócz likwidacji potencjalnych źródeł $^1\text{O}_2$, karotenoidy są zaangażowane w wygaszenie wzbudzonej cząsteczki chlorofilu w stanie trypletowym ($^3\text{Chl}^*$) i rozproszeniu energii w postaci ciepła, co zapobiega powstaniu tlenu singletowego (Szymańska i Strzałka 2010). Dzięki temu karotenoidy chronią przed działaniem RFT głównie nienasycone kwasy tłuszczowe lipidów chloroplastowych (Solovchenko 2013).

1.6. Prolina i dialdehyd malonowy – wskaźniki stresu oksydacyjnego

Prolina jest aminokwasem, który w roślinach pełni rolę osmoregulatora, a jej akumulacja występuje w odpowiedzi na różnego rodzaju obciążenia środowiskowe. Wyniki licznych badań sugerują, że występuje dodatnia korelacja między wysoką zawartością proliny a tolerancją roślin na czynniki stresowe, takie jak: zasolenie, susza, niskie temperatury, niedobór składników odżywczych, metale ciężkie, ataki patogenów

i niskie pH (Dar i in. 2016). Akumulacja proliny przyczynia się do wzrostu tolerancji na stres na wiele sposobów m.in. poprzez udział w utrzymaniu integralności białek i zwiększenie aktywności różnych enzymów. Liczne badania wskazują, że ten aminokwas działa również jak przeciwutleniacz, zmiatając RFT oraz wygaszając cząsteczki tlenu singletowego (Ashraf 2009). Wysokie stężenie proliny wykorzystuje się jako wskaźnik działania stresów środowiskowych na roślinę (Liu i in. 2014).

Drugim powszechnie badanym markerem stresu oksydacyjnego jest dialdehyd malonowy (MDA), powstający na skutek rozpadu reszt kwasów tłuszczowych wielonienasyconych. Peroksydacja lipidów to wolnorodnikowy proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych lub innych lipidów, w którym powstają nadtlene tych związków (Puzanowska-Tarasiewicz i in. 2008). Ten wieloetapowy proces kończy się powstaniem, kilkunastowęglowych fragmentów, spośród których dialdehyd malonowy jest najczęściej wykorzystywany jako wskaźnik uszkodzeń lipidów w układach biologicznych. Reaktywne formy tlenu prowadzą do utleniania nienasyconych reszt kwasów tłuszczowych powodując destabilizację oraz rozpad lipidów z jednoczesnym wytworzeniem aldehydów i alkoholi, co skutkuje uszkodzeniami błon komórkowych, chloroplastów i mitochondriów (Møller i in. 2007; Olko i Kujawska 2011)

1.7. Aktywność enzymów glebowych – wskaźnik zanieczyszczenia gleby

Każda gleba poza materią nieorganiczną taką jak minerały, woda oraz powietrze zawiera również materię organiczną. Wśród niej wyróżniamy związki organiczne, próchnicę, resztki roślin oraz bakterie i pierwotniaki (Kostecki i Fruzińska 2012). Ten złożony i różnorodny ekosystem przyczynia się do szerokiego zakresu przemian biochemicznych, niezbędnych do zrównoważonego funkcjonowania i produktywności roślin (Barrios 2007). Oddziaływanie zanieczyszczeń takich jak np. związki fluoru na stan biochemiczny gleby można skutecznie ocenić na podstawie aktywności enzymów glebowych m.in. dehydrogenaz i fosfataz glebowych (Koper i Piotrowska 1999; Bielińska i Mocek-Płóćiniak 2010). Zmiany w aktywności enzymów glebowych w stresie ryzosferowej wskazują na zaburzenia środowiska, które oddziałują na glebę oraz rosnące w niej rośliny. Dehydrogenazy reprezentują enzymy, których aktywność pozwala na ocenę stanu gleby i jej aktywności mikrobiologicznej (Gil-Sotres i in. 2005). Rola dehydrogenaz polega na biologicznym utlenianiu materii organicznej w glebie poprzez przeniesienie wodoru z podłoża organicznego do akceptorów nieorganicznych (Stręk i Telesiński 2015). Brzezińska i in. (2001) ustalili, że enzymy te mogą wykorzystywać

nie tylko cząsteczki tlenu jako akceptory elektronów, ale także inne związki obecne w komórkach mikroorganizmów beztlenowych. Tak więc aktywność dehydrogenaz odzwierciedla szybkość przemian zachodzących w glebie.

Fosfatazy odgrywają ważną rolę w glebie poprzez stymulację przemian organicznych związków fosforu w nieorganiczne fosforany (HPO_4^{2-} i H_2PO_4^-), związki te są następnie bezpośrednio dostępne dla organizmów glebowych oraz roślin (Bielińska 2005; Mocek-Płóćiniak 2010). Zawartość organicznego fosforu w wierzchnich warstwach gleb waha się w szerokich granicach od 5% do ponad 60% ogólnej zawartości fosforu (w glebach polskich na ogół 20-40%), a asymilacja tego fosforu przez rośliny i mikroorganizmy odbywa się za pośrednictwem fosfataz (Sapek 2014). Aktywność tych enzymów w glebie jest uważana za dobry wskaźnik aktywności biologicznej gleby ponieważ odzwierciedla aktywność enzymów związanych z substancjami humosowymi i koloidami glebowymi, wolnymi fosfatazami w roztworze glebowym oraz fosfatazami związanymi z żywymi i martwymi komórkami roślin i mikroorganizmów (Nannipieri i Bollag 1991).

2. Materiał i metody

Realizowane w pracy badania zaplanowano w formie 4 etapów. Przeprowadzono je w latach 2014-2017. Pierwszy etap badań, dowiadczanie *in vitro*, przeprowadzono w warunkach kultur tkankowych w laboratorium Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, natomiast etap drugi, w laboratorium Katedry Bioinżynierii. Trzeci etap – doświadczanie wazonowe – przeprowadzono w laboratorium Katedry Bioinżynierii. Doświadczania te, miały na celu dobór gatunków roślin, dawek i form aplikacji kwasu L-askorbinowego oraz dawek fluorku sodu. Wyniki pierwszych trzech etapów badań posłużyły do zaplanowania czwartego etapu, 2-letniego doświadczania wazonowego przeprowadzonego w Hali Wegetacyjnej WKŚiR, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

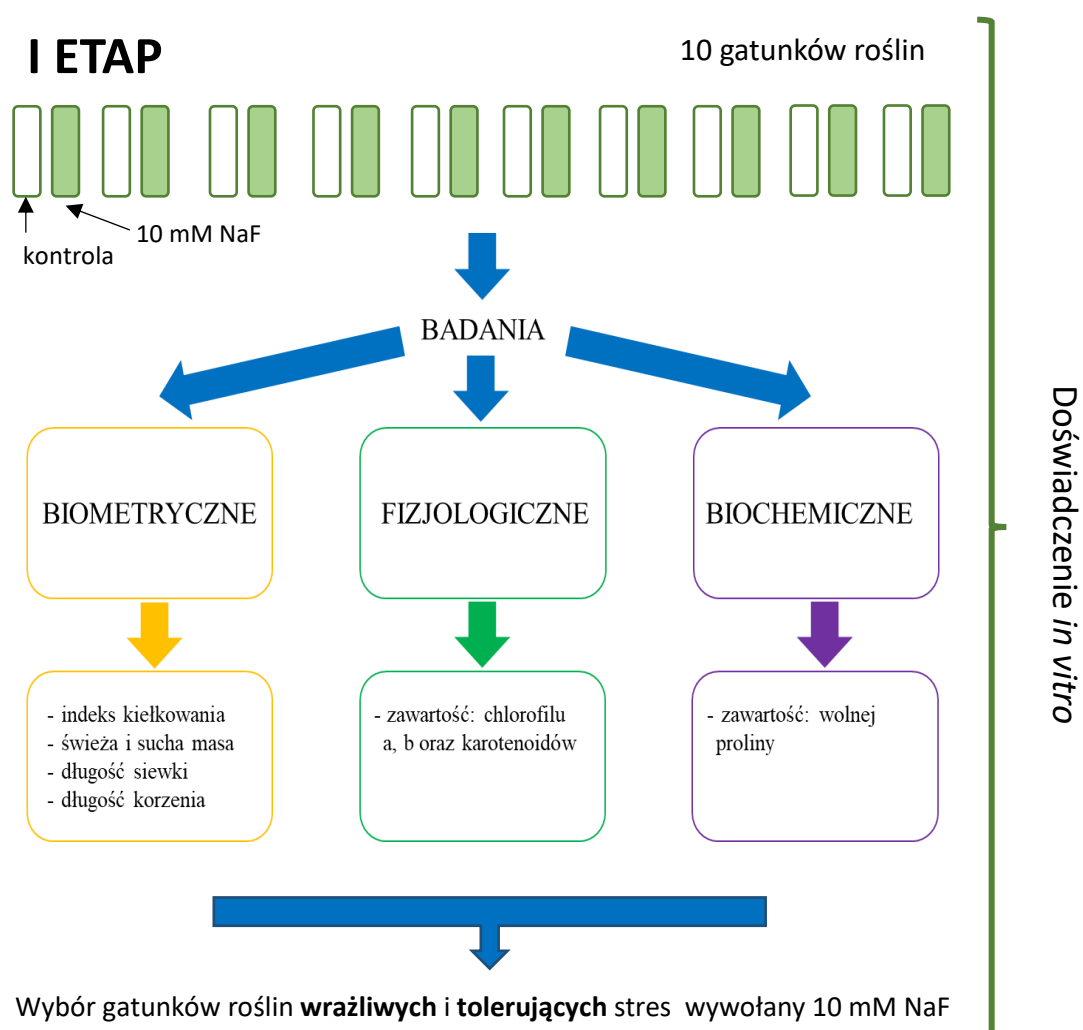
2.1. I etap – doświadczanie *in vitro*

W I etapie badań określono wpływ działania 10 mM NaF na kształtowanie się wybranych parametrów biometrycznych, fizjologicznych i biochemicznych w liściach 10-dniowych siewek u różnych gatunków roślin uprawnych. Materiał do badań stanowiły:

1. Rzodkiewka zwyczajna (*Raphanus sativus* L.) cv. 'Carmen'
2. Rzodkiew zwyczajna (*Raphanus sativus* L.) cv. 'Minowase Summer Cross'
3. Jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) cv. 'Eunova'
4. Żyto zwyczajne (*Secale cereale* L.) cv. 'Bojko'
5. Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) cv. 'Bryza'
6. Łubin wąskolistny (*Lupinus angustifolius* L.) cv. 'Caro'
7. Słonecznik zwyczajny (*Helianthus annuus* L.) cv. 'Bella'
8. Ogórek zwyczajny (*Cucumis sativus* L.) cv. 'Ela'
9. Lucerna siewna (*Medicago sativa* L.) cv. 'Triade'
10. Pomidor zwyczajny (*Lycopersicon esculentum* L.) cv. 'Faworyt'

Nasiona do badań odkażono w 70% (w/w) roztworem etanolu przez 30 s, następnie umieszczono je w wodzie dejonizowanej. Po wstępnej dezynfekcji nasiona umieszczono w 10% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl), po czym przepłukano 3 – krotnie wodą dejonizowaną. Następnie nasiona wyłożono na plastikowe płytki Petriego (Ø20 cm) wyłożone papierem filtracyjnym i zwilżonym odpowiednio: 20 cm³ wodą dejonizowaną (próba kontrolna) i 20 cm³ roztworu 10 mM soli NaF. Doświadczanie założono w sześciu powtórzeniach, po 10 nasion w powtórzeniu.

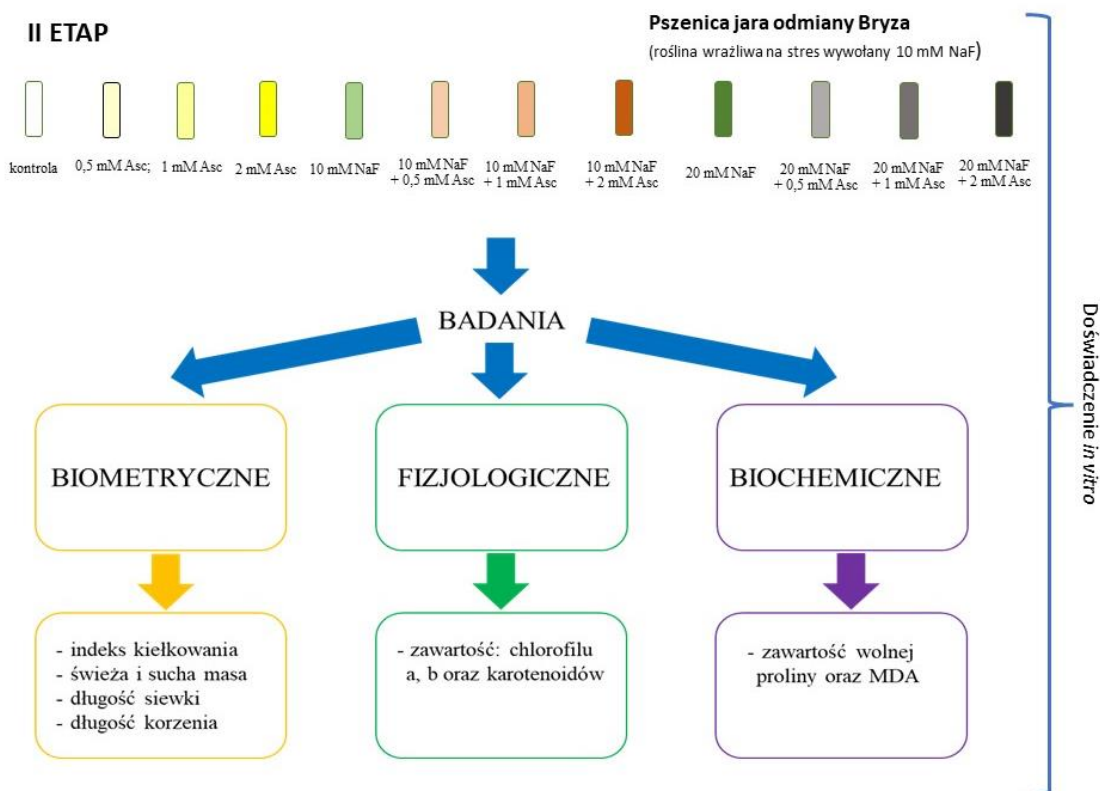
Płytki inkubowano w temperaturze 21⁰C w ciemności przez 72 godziny. Następnie przeniesiono je do fitotronu o temperaturze powietrza 21⁰C, oświetleniu 40 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ oraz fotoperiodzie 16h/8h. Po dziesięciu dniach wzrostu, w roślinach oznaczono parametry morfologiczne (długość siewki, długość korzenia, świeżą masę oraz indeks kiełkowania i indeks tolerancji), parametry fizjologiczne (zawartość chlorofilu a i b, karotenoidów) oraz parametry biochemiczne (zawartość wolnej proliny) – rys. 7. Na podstawie wyników badań z I etapu wybrano gatunek wrażliwy na stres wywołany 10 mM NaF.



Rys. 7. Schemat przeprowadzonych analiz w I etapie badań

2.2. II etap – doświadczenie *in vitro*

Oceniono stopień łagodzenia stresu wywołanego przez NaF poprzez egzogenne zastosowanie różnych stężeń kwasu L-askorbinowego u gatunku wrażliwego na podstawie parametrów: biometrycznych (długość siewki, długość korzenia, świeżej masy, indeksu kiełkowania), fizjologicznych (chlorofil a,b, karotenoidy) oraz biochemicznych (zawartość wolnej proliny i MDA). Materiał do badań stanowiły niezaprawione nasiona pszenicy jarej (*Triticum aestivum* L.) odmiany Bryza. Nasiona poddane były ocenie wrażliwości na obecność 10 mM i 20 mM NaF oraz stopniu niwelowania toksyczności NaF poprzez zastosowanie kwasu L-askorbinowego w trzech stężeniach 0,5; 1; i 2 mM. W etapie II szalki Petriego przygotowano analogicznie jak w etapie I, przy czym natężenie oświetlenia wyniosło $90 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Kombinacje przyjęte w doświadczeniu to: 1) kontrola (woda dejonizowana); 2) 0,5 mM Asc; 3) 1 mM Asc; 4) 2 mM Asc; 5) 10 mM NaF; 6) 10 mM NaF + 0,5 mM Asc; 7) 10 mM NaF + 1 mM Asc; 8) 10 mM NaF + 2 mM Asc; 9) 20 mM NaF; 10) 20 mM NaF + 0,5 mM Asc; 11) 20 mM NaF + 1 mM Asc; 12) 20 mM NaF + 2 mM Asc (rys. 8)



Rys. 8. Schemat przeprowadzonych analiz w II etapie badań

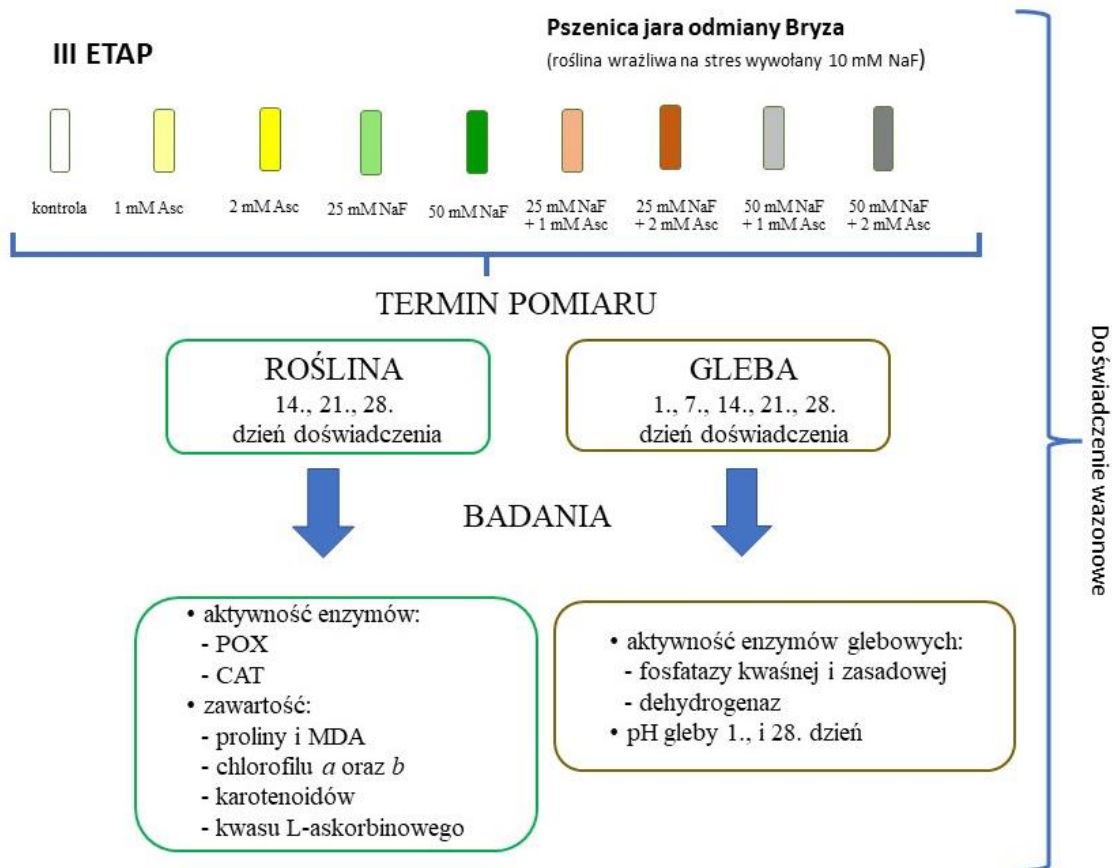
2.3. III etap – doświadczenie wazonowe

Podczas tego etapu oceniono wpływ egzogennej Asc o stężeniach 1 i 2 mM (doglebowo) przy stresie wywołanym 25 i 50 mM NaF, w doświadczeniu wazonowym, w 3 terminach badań.

Pobrane próbki glebowe przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm i podzielono na odpowiednie naważki. Do poszczególnych naważek wprowadzono wodne roztwory soli NaF oraz kwasu L-askorbinowego, jednocześnie doprowadzając wilgotność gleby do 60% maksymalnej pojemności wodnej. Następnie glebę dokładnie wymieszano i odważono po 1 kg z każdej kombinacji, tak przygotowaną glebę przechowywano w szczelnie zamkniętych pojemnikach polietylenowych w temp. 20°C, z dodatkowo przygotowano próbę kontrolną tzn. glebę bez dodatku badanych substancji. W poszczególnych próbach, w odstępach kilkudniowych a następnie kilkunastogodniowych (1., 7., 14., 21., i 28. dniu), oznaczono aktywność fosfatazy zasadowej i kwaśnej oraz dehydrogenaz (rys. 9).

Pozostałą część przygotowanej do doświadczenia gleby umieszczono w wazonach (po 10 kg do każdego). Następnie do wazonów wysiano po 10 nasion pszenicy.

W materiale roślinnym (liście) pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) cv. 'Bryza' w 14., 21., i 28. dniu doświadczenia dokonano pomiarów: fizjologicznych (zawartość chlorofilu a, b, karotenoidów) oraz biochemicznych (zawartość proliny, MDA, aktywność CAT i POX, zawartość Asc). Kombinacje przyjęte w doświadczeniu to: 1) kontrola (woda dejonizowana); 2) 1 mM kwas L-askorbinowy; 3) 2 mM kwas L-askorbinowy 4) 25 mM NaF; 5) 50 mM NaF; 6) 25 mM NaF + 1 mM kwas L-askorbinowy; 7) 25 mM NaF + 2 mM kwas L-askorbinowy; 8) 50 mM NaF + 1 mM kwas L-askorbinowy; 9) 50 mM NaF + 2 mM kwas L-askorbinowy.



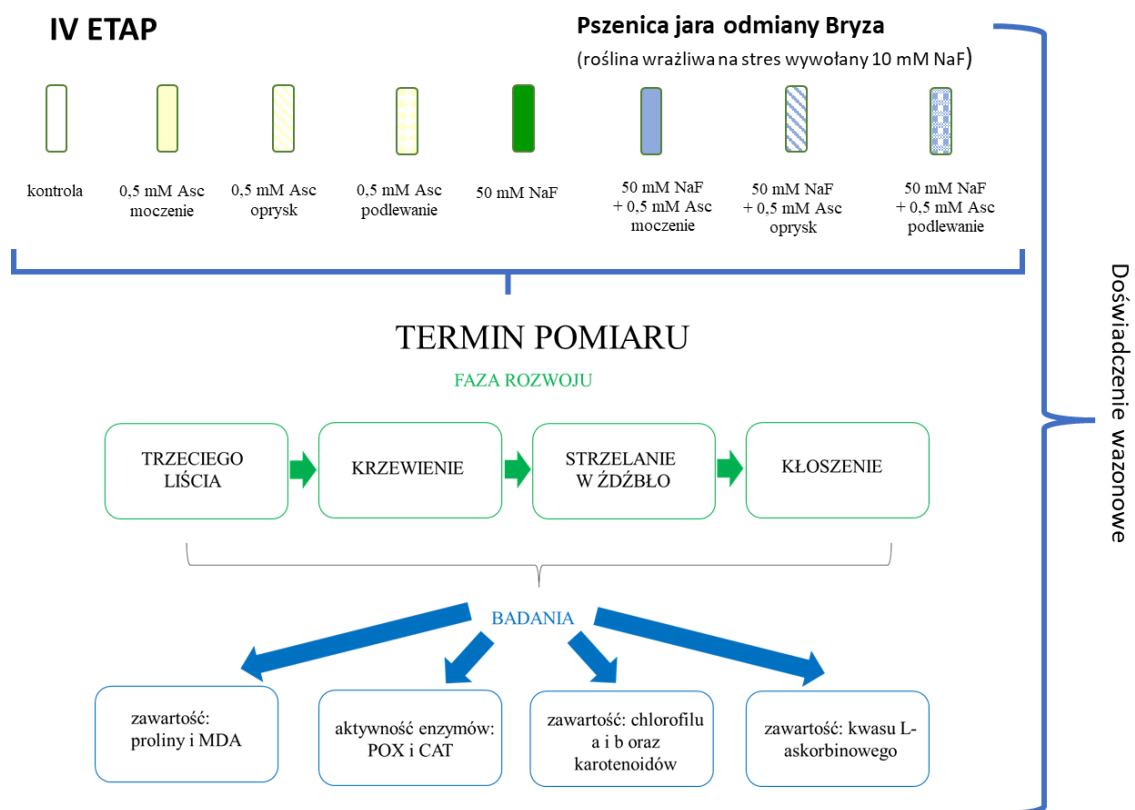
Rys. 9. Schemat przeprowadzanych analiz w III etapie badań

2.4. IV etap badań – dwuletnie doświadczenie wazonowe

Celem tego etapu badań była ocena działania wpływu egzogenego 0,5 mM Asc (zastosowanego w formie moczenia nasion, oprysku oraz podlewania) na stres wywołany 50 mM NaF w doświadczeniu wazonowym wg schematu zamieszczonego na rys. 10. Pobraną próbkę gleby przygotowano analogicznie jak w etapie III, następnie podzielono ją na osiem części, do czterech części dodano 50 mM NaF. Tak przygotowaną glebę napełniono wazon, do każdego wazonu wysiano po 10 nasion pszenicy poddanej wcześniej procesowi imbibicji w wodzie demineralizowanej lub w 0,5 mM kwasie L-askorbinowym. W doświadczeniu przyjęto następujące kombinacje: 1) kontrola – gleba bez dodatku NaF; 2) 0,5 mM Asc - moczenie; 3) 0,5 mM Asc - oprysk; 4) 0,5 mM Asc - podlewanie; 5) 50 mM NaF; 6) 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie; 7) 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk (co 10 dni); 8. 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie (co 10 dni 100 ml roztworu Asc).

W okresie wegetacji obserwowano wzrost i rozwój roślin. Pomiary wykonano w następujących fazach rozwojowych pszenicy zwyczajnej cv. 'Bryza': trzeciego liścia, krzewienia, strzelania w źdźbło oraz kłoszenia. Podczas wyżej wymienionych faz

przeprowadzono pomiary: fizjologiczne (zawartość chlorofilu a, b, karotenoidów) oraz biochemiczne (zawartość wolnej proliny, MDA, aktywność CAT i POX, zawartość Asc).



Rys. 10. Schemat przeprowadzonych analiz w IV etapie badań

2.5. Charakterystyka gleby użytej w etapie III, IV badań

Doświadczenia z III i IV etapu przeprowadzono na glebie pobranej z warstwy ornopróchnicznej (0-30 cm) z pola uprawnego czarnych ziem Równiny Gumienieckiej. Gleba ta charakteryzuje się składem granulometrycznym gliny lekkiej pylastej, z dużą ilością frakcji pylastych (25-40% cząsteczek pyłowych). W związku z czym odznacza się dobrymi właściwościami magazynowania wody. Odczyn gleby był od lekko kwaśnego do obojętnego (pH 6,1– 6,2). Gleba charakterywała się niską zawartością próchnicy (1,2 – 1,8%), wysoką zawartością przyswajalnego fosforu oraz zawartością od średniej do wysokiej przyswajalnego potasu i magnezu. Zawartość fluoru w glebie wynosiła 2 mg F·kg⁻¹ s.m.

2.6. Metoda pomiaru długości siewki i korzenia oraz indeksu kiełkownia

Pomiaru długości korzenia badanych gatunków roślin dokonano przy pomocy linijki i podano w cm z dokładnością do 1 mm natomiast wartości indeksu kiełkowania

wyrażono w %. Po 3 dniach od założenia doświadczenia obliczono indeks kiełkowania (GI%) badanych gatunków roślin według wzoru Barbero i in. (2001) – przy czym za skielkowane nasiona uznano te, które posiadały korzeń o długości min. 2 mm.

$$GI\% = \frac{(GS \cdot LS)}{(GC \cdot LC)} \cdot 100\%$$

GS – liczba nasion wykiełkowanych na szalkach z NaF

LS – długość korzeni po 3 dniach wzrostu na szalkach z NaF

GC – liczba nasion wykiełkowanych na szalkach kontrolnych

LC – długość korzeni po 3 dniach wzrostu na szalkach kontrolnych

2.7. Metoda pomiaru świeżej masy roślin

W I i II etapie doświadczenia pomiar wartości świeżej masy siewek wykonano metodą wagową na wadze analitycznej z dokładnością do 0,00 g po 10 dniach wzrostu roślin.

2.8. Metody oznaczania parametrów biochemicznych i fizjologicznych

W celu oznaczenia badanych parametrów biochemicznych i fizjologicznych ze szczytowych liści pobierano świeżą tkankę roślinną. Następnie liście homogenizowano z odpowiednimi roztworami ekstrakcyjnymi w schłodzonych mrożdziarach (4°C). Otrzymany nadsącz wykorzystano do niżej opisanych oznaczeń biochemicznych i fizjologicznych. Wartość analizowanych parametrów biochemicznych i fizjologicznych oraz aktywności enzymów w roślinie i w glebie oznaczono spektrofotometrycznie przy użyciu spektrofotometru UV-1800 (Shimadzu).

2.8.1. Metoda oznaczania zawartości wolnej proliny (Pro) w tkance roślinnej

Zawartość wolnej proliny oznaczono metodą Batesa i in. (1973). Polega ona na pomiarze absorbancji, wyekstrahowanego toluenem barwnego kompleksu proliny i kwaśnej ninhydryny, przy długości fali $\lambda = 520$ nm. Zawartość proliny przeliczono z krzywej wzorcowej i wyrażono w $\mu\text{mol Pro} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. rośliny.

2.8.2. Metoda oznaczania zawartości dialdehydu malonowego (MDA) w tkance roślinnej

Zawartość dialdehydu malonowego w materiale roślinnym oznaczono według metody Sudhakara i in. (2001) w reakcji z kwasem tiobarbiturowym. MDA w kwaśnym środowisku i w podwyższonej temperaturze, reaguje z kwasem tworząc barwny związek, którego zabarwienie zmierzono spektrofotometrycznie przy dwóch długościach fal $\lambda =$

532 nm i $\lambda = 600$ nm. Zawartość dialdehydu malonowego przeliczono z krzywej wzorcowej wyrażono w $\text{nmol MDA} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. rośliny.

2.8.3. Metoda oznaczania zawartości barwników asymilacyjnych w tkance roślinnej

Zawartość chlorofilu a, b i karotenoidów oznaczono przy użyciu 80% acetonu i określono spektrofotometrycznie odpowiednio przy $\lambda = 663, 645$ i 440 nm. Stężenie chlorofilu a i b obliczono zgodnie z metodą Arnona i in. (1956) w modyfikacji Lichtenthaler i Wellburn (1983), podczas gdy stężenie karotenoidów zgodnie z metodą Hagera i Meyera-Berthenratha (1966). Stężenia chlorofilu a,b oraz karotenoidów przeliczono z krzywej wzorcowej i wyrażono jako $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. rośliny.

2.8.4. Metoda oznaczania zawartości kwasu L-askorbinowego (Asc)

Zawartość kwasu L-askorbinowego oznaczano spektrofotometrycznie za pomocą 2,6-dichlorofenyloindofenolu dla $\lambda = 600$ nm wg. metody Guri i in. (1983). Zawartość Asc przeliczono z krzywej wzorcowej podano w $\mu\text{g Asc} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. rośliny.

2.8.5. Metoda oznaczania aktywności katalazy (CAT) – [EC 1.11.1.6] w tkance roślinnej

Aktywność katalazy roślinnej została oznaczona metodą Lücka (1963). Oznaczenie polegało na pomiarze spadku absorpcji światła ultrafioletowego (dla $\lambda = 240$ nm) podczas rozkładu H_2O_2 przez badany enzym. Aktywność katalazy przeliczono z krzywej wzorcowej i wyrażono w $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. rośliny $\cdot \text{min}^{-1}$.

2.8.6. Metoda oznaczania aktywności peroksydaz (POX) – [EC 1.11.1.7] w tkance roślinnej

Aktywność peroksydazy oznaczono za pomocą metody Chance'a i Maehly'ego (1955) za Kłyszajko-Stefanowicz (2003). Oznaczenie polegało na pomiarze zawartości purpurogaliny powstałej poprzez utlenienie pirogalolu w obecności H_2O_2 (dla $\lambda = 430$ nm). Aktywność peroksydazy przeliczono z krzywej wzorcowej wyrażono w $\mu\text{M purpurogaliny} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. rośliny $\cdot \text{min}^{-1}$.

2.9. Metoda oznaczenia aktywności fosfataz glebowych

Aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej oznaczono spektrofotometrycznie z użyciem p-nitrofenolu jako substratu według metody Tabatabai i Bremner (1969). Metoda ta oparta jest na zdolności fosfatazy do hydrolizy p-nitrofenylofosforanu do

p-nitrofenolu (p-NP). Aktywność enzymów przeliczono z krzywej wzorcowej i wyrażono ilością powstałego p-nitrofenolu [$\mu\text{g p-NP}\cdot(\text{g}^{-1} \text{ s.m. gleby}\cdot\text{h})^{-1}$].

2.10. Metoda oznaczenia aktywności dehydrogenaz glebowych

Aktywność dehydrogenaz glebowych oznaczono spektrofotometrycznie roztworem TTC wg metody Thalmanna (1968) za pomocą spektrofotometru. Aktywność enzymów przeliczono z krzywej wzorcowej i wyrażono ilością powstałego 2,3,5-trifenyloformazanu [$\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1} \text{ s.m. gleby}\cdot\text{2h})^{-1}$].

2.11. Obliczenia statystyczne

Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej za pomocą programu STATISTICA 10.0. Dane z trzech pomiarów ($n=3$) analizowano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji i testu t-studenta (etap I) oraz dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA (etap II, III i IV), a następnie testu post-hoc Tukeya, co pozwoliło na wyznaczenie grup jednorodnych. Różnice istotne przeanalizowano na poziomie $p<0,05$. Wyniki wyrażono jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe.

2.12. Warunki atmosferyczne

Średnie miesięczne warunki atmosferyczne w kwietniu, maju, czerwcu i lipcu w 2016 i 2017 roku przedstawiono w tab. 3.

Średnia miesięczna temperatura w kwietniu, maju i czerwcu w 2016 roku wahała się w granicach od 13,6 do 15,5°C. W lipcu, średnia dobową temperaturę wyniosła średnio 18,6°C. W 2017 średnia miesięczna wahała się od 8,5 do 19,0°C. W 2016 średnia suma opadów była znacząco niższa niż w 2017 roku. Wilgotność w 2016 i 2017 roku były na podobnym poziomie.

Tab. 3. Średnie miesięczne warunki atmosferyczne w doświadczeniu

Temperatura [°C]				Opady [mm/m ³]				Wilgotność [%]			
2016											
Miesiące				miesiące				miesiące			
IV	V	VI	VII	IV	V	VI	VII	IV	V	VI	VII
13,6	12,2	15,5	18,6	3,0	9,4	6,4	2,0	71,7	70,2	72,9	69,2
2017											
Miesiące				miesiące				miesiące			
IV	V	VI	VII	IV	V	VI	VII	IV	V	VI	VII
8,5	15,9	18,5	19,0	23,2	17,4	51,2	51,2	71,7	64,3	72,5	72,7

3. Wyniki

3.1. Etap I

Wpływ 10 mM NaF na wybrane parametry morfologiczne (długość korzenia i siewki, świeża masa, indeks tolerancji), fizjologiczne (zawartość chlorofilu a,b oraz karotenoidów) i biochemiczne (zawartość wolnej proliny) 10 gatunków roślin uprawnych w warunkach *in vitro*.

3.1.1. Długość koleoptyli i korzenia 10-dniowych siewek

Oceniając reakcję siewki dziesięciu gatunków roślin pod względem cech morfologicznych (tab. 4) stwierdzono, że różnie reagowały one na dodatek 10 mM NaF. Czynniki ten wpłynął istotnie na zmniejszenie długości koleoptyli w przypadku rzodkiewki (47,2%), rzodkwi (18,3%), łubinu (38,6%), słonecznika (50,4%), ogórka (46,4%) oraz lucerny (33,7%) w porównaniu z długością koleoptyli wariantów kontrolnych. Największą redukcję długości koleoptyli spośród badanych roślin stwierdzono u pszenicy 58,2% (5,16 cm). Nie wykazano natomiast istotnych różnic w długości koleoptyli u jęczmienia, żyta oraz pomidora.

Porównując długość korzeni siewek rosnących w obecności 10 mM NaF w odniesieniu do roślin kontrolnych, wykazano istotne obniżenie tej cechy u rzodkiewki (65,9%), pszenicy (62,8%), słonecznika (78,2%), ogórka (87,1%), lucerny (65,2%) i pomidora (47,6%). Spośród tych gatunków największym obniżeniem długości korzeni charakteryzowały się: ogórek (obniżenie długości o 8,5 cm co stanowiło 87,4%), rzodkiewka (obniżenie długości o 5,2 cm, 65,9%), lucerna (obniżenie długości 2,2 cm, 65,2%) pszenica (obniżenie długości o 4,7 cm, 62,8%) w porównaniu do kontroli.

U rzodkwi, jęczmienia i żyta nie stwierdzono istotnych różnic długości korzeni pomiędzy roślinami z wariantu kontrolnego a roślinami z dodatkiem 10 mM NaF. Różnice we wzroście siewek 10 wybranych gatunków roślin zobrazowano na rys. 11.

Tab. 4. Wpływ dodatku 10 mM NaF na długość koleoptyli i korzeni wybranych gatunków 10-dniowych roślin uprawnych *in vitro*

Gatunek rośliny i odmiana	Długość koleoptyla [cm]			Długość korzenia [cm]		
	Kontrola	10 mM NaF	NIR _{0,05}	Kontrola	10 mM NaF	NIR _{0,05}
Rzodkiewka zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Carmen	1,95 ± 0,82	1,03 ± 0,22	0,58*	7,90 ± 2,51	2,69 ± 1,41	3,52*
Rzodkiew zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Minowase Summer Cross	2,31 ± 1,24	1,88 ± 0,43	0,70*	2,34 ± 1,44	2,11 ± 0,77	r.n.
Jęczmień zwyczajny (<i>Hordeolum vulgare</i> L.) cv. Eunova	3,42 ± 1,24	3,09 ± 0,58	r.n.	2,55 ± 0,83	2,18 ± 0,65	r.n.
Żyto zwyczajne (<i>Secale cereale</i> L.) cv. Bojko	2,96 ± 1,41	1,67 ± 0,58	r.n.	4,73 ± 1,25	2,53 ± 0,82	r.n.
Pszenica zwyczajna (<i>Triticum aestivum</i> L.) cv. Bryza	12,35 ± 1,93	5,16 ± 3,54	1,97*	7,53 ± 3,65	2,8 ± 1,93	2,81*
Łubin wąskolistny (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) cv. Caro	3,91 ± 1,57	2,40 ± 0,52	0,81*	1,50 ± 0,65	1,28 ± 0,98	r.n.
Słonecznik zwyczajny (<i>Helianthus annuus</i> L.) cv. Bella	1,35 ± 0,47	0,67 ± 0,29	0,36*	5,18 ± 2,38	1,13 ± 0,66	2,14*
Ogórek zwyczajny (<i>Cucumis sativus</i> L.) cv. Ela	2,07 ± 0,88	1,11 ± 0,23	0,70*	9,80 ± 2,4	1,27 ± 0,89	1,98*
Lucerna siewna (<i>Medicago sativa</i> L.) cv. Triade	0,86 ± 0,41	0,57 ± 0,28	0,23*	3,33 ± 1,61	1,16 ± 0,78	0,90*
Pomidor zwyczajny (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.) cv. Faworyt	2,47 ± 0,52	2,10 ± 0,71	r.n.	7,82 ± 4,39	4,10 ± 1,43	1,96*

r.n. – różnica nieistotna statystycznie; * - wartość NIR dla p<0,05; NIR-najmniejsza istotna różnica



Rys. 11. Różnica reakcji we wzroście 10 –dniowych siewek wybranych gatunków roślin uprawnych rosnących w K – kontroli (woda destylowana) oraz z dodatkiem 10 mM NaF. 1 – rzodkiewka zwyczajna 2 – rzodkiew zwyczajna 3 –jęczmień zwyczajny 4 – żyto zwyczajne 5 – pszenica zwyczajna 6 – łubin wąskolistny 7 – słonecznik zwyczajny 8 – ogórek zwyczajny 9 – lucerna siewna 10 – pomidor zwyczajny

3.1.2. Wartość świeżej masy i indeksu kiełkowania 10-dniowych siewek

Analizując wpływ dodatku 10 mM NaF na wartość świeżej masy 10 wybranych gatunków roślin (tab. 5). Zaobserwowano istotne zmniejszenie wartości świeżej masy w obecności 10 mM NaF w stosunku do roślin kontrolnych u rzodkiewki, łubinu, słonecznika i lucerny. W przypadku rzodkiewki stwierdzono obniżenie świeżej masy o 0,18 g (36,4%), łubinu 0,06 g (37,5%), słonecznika 0,06 g (40%) oraz lucerny 0,04 g (57,1%) w porównaniu z roślinami kontrolnymi (rosnącymi w szalkach bez dodatku 10 mM NaF).

Najwyższym indeksem kiełkowania nasion charakteryzowały się rzodkiew (90,2%), jęczmień (85,5%), łubin (85,3%) oraz żyto (74%) (tab.4.). Natomiast najniższą wartością indeksu kiełkowania stwierdzono u następujących gatunków roślin: ogórka (13%), słonecznika (21,8%), rzodkiewki (34%), lucerny (34,8%) i pszenicy (50,5%) (tab.4).

Tab. 5. Wpływ dodatku 10 mM NaF na świeżą masę oraz indeks kiełkowania 10-dniowych siewek badanych roślin uprawnych rosnących w warunkach in vitro na szalkach z dodatkiem 10 mM NaF

Gatunek rośliny i odmiana	Świeża masa [g]			Indeks kiełkowania [%]
	Kontrola	10 mM NaF	NIR _{0.05}	
Rzodkiewka zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Carmen	0,11 ± 0,05	0,07 ± 0,03	0,04*	34,05
Rzodkiew zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Minowase Summer Cross	0,08 ± 0,04	0,07 ± 0,02	r.n.	90,17
Jęczmień zwyczajny (<i>Hordeolum vulgare</i> L.) cv. Eunova	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02	r.n.	85,49
Żyto zwyczajne (<i>Secale cereale</i> L.) cv. Bojko	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,01	r.n.	74,00
Pszenica zwyczajna (<i>Triticum aestivum</i> L.) cv. Bryza	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,03	r.n.	50,46
Łubin wąskolistny (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) cv. Caro	0,48 ± 0,09	0,30 ± 0,08	0,04*	85,33
Słonecznik zwyczajny (<i>Helianthus annuus</i> L.) cv. Bella	0,15 ± 0,05	0,09 ± 0,03	0,03*	21,81
Ogórek zwyczajny (<i>Cucumis sativus</i> L.) cv. Ela	0,17 ± 0,07	0,11 ± 0,05	r.n.	12,96
Lucerna siewna (<i>Medicago sativa</i> L.) cv. Triade	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02*	34,83
Pomidor zwyczajny (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.) cv. Faworyt	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01	r.n.	52,43

r.n. – różnica nieistotna statystycznie; * - wartość NIR dla p<0,05; NIR-najmniejsza istotna różnica

3.1.3. Zawartość proliny w 10-dniowych siewkach wybranych gatunków roślin uprawnych

Stwierdzono istotne różnice w zawartości wolnej proliny w siewkach rzodkiewki, żyta, pszenicy, słonecznika, ogórka, lucerny i pomidora rosnących z 10 mM NaF (tab. 6). Nie wykazano natomiast istotnych różnic w przypadku rzodkwi, jęczmienia i łubinu w porównaniu do kontroli. Pod wpływem dodatku 10 mM NaF we wszystkich badanych roślinach, poza jęczmieniem nastąpił wzrost zawartości wolnej proliny w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Największy wzrost zaobserwowano w przypadku lucerny (o 91,4%), pomidora (o 80%), słonecznika (o 72,4%) rzodkiewki (o 65,2%) oraz pszenicy (o 39,6%).

Tab. 6. Zawartość wolnej proliny w 10-dniowych siewkach wybranych gatunków roślin uprawnych rosnących z dodatkiem 10 mM NaF

Gatunek rośliny i odmiana	Prolina [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.]		
	Kontrola	10 mM NaF	NIR _{0,05}
Rzodkiewka zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Carmen	12,01 ± 0,58	19,84 ± 0,95	1,52*
Rzodkiew zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Minowase Summer Cross	57,22 ± 0,25	57,47 ± 0,01	r.n.
Jęczmień zwyczajny (<i>Hordeolum vulgare</i> L.) cv. Eunova	25,92 ± 0,38	24,02 ± 1,46	r.n.
Żyto zwyczajne (<i>Secale cereale</i> L.) cv. Bojko	10,21 ± 0,42	12,12 ± 0,16	0,62*
Pszenica zwyczajna (<i>Triticum aestivum</i> L.) cv. Bryza	3,21 ± 0,33	4,48 ± 0,21	0,53*
Łubin wąskolistny (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) cv. Caro	35,27 ± 3,51	36,26 ± 4,00	r.n.
Słonecznik zwyczajny (<i>Helianthus annuus</i> L.) cv. Bella	7,91 ± 0,30	13,64 ± 0,52	0,82*
Ogórek zwyczajny (<i>Cucumis sativus</i> L.) cv. Ela	3,88 ± 0,29	4,71 ± 0,47	0,75*
Lucerna siewna (<i>Medicago sativa</i> L.) cv. Triade	1,17 ± 0,30	2,24 ± 0,28	0,57*
Pomidor zwyczajny (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.) cv. Faworyt	11,01 ± 0,58	19,83 ± 0,95	1,52*

r.n. - różnica nieistotna statystycznie; * - wartość NIR dla $p < 0,05$; NIR-najmniejsza istotna różnica

3.1.4. Zawartość chlorofilu a, b i karotenoidów w 10-dniowych siewkach różnych gatunkach roślin uprawnych

Wpływ dodatku 10 mM NaF na zawartość chlorofilu a w badanych siewkach roślin przedstawiono w tab. 7. Nie stwierdzono istotnego wpływu 10 mM NaF na zawartość chlorofilu a w siewkach dwóch badanych gatunków roślin: jęczmienia oraz ogórka. W pozostałych ośmiu badanych gatunkach wykazano istotny wpływ 10 mM NaF na zawartość chlorofilu a. W gatunkach tych zastosowana sól wpłynęła na obniżenie zawartości chlorofilu a w siewkach w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Największą redukcję chlorofilu a stwierdzono u słonecznika o $110,32 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (co stanowiło spadek o 58,3%), rzodkwi $51,70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (49,7%), lucerny $100,08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (49,4%) pszenicy $171,32 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (48,5%) oraz łubiniu $88,54 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (44,4%). W pozostałych gatunkach również zaobserwowano spadek zawartości tego związku pod wpływem 10 mM NaF: u rzodkiewki $24,94 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (spadek o 24%), żyta $36,11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (23,2%) oraz pomidora $23,24 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (16,6%) w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

W tab. 7 przedstawiono wpływ 10 mM NaF na zawartość chlorofilu b. Podobnie jak w przypadku chlorofilu a nie wykazano istotnego wpływu 10 mM NaF na zawartość chlorofilu b u jęczmienia. Brak istotności stwierdzono również w przypadku rzodkwi. Największe obniżenie chlorofilu b pod wpływem działania 10 mM NaF stwierdzono u pszenicy $132,64 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (spadek o 51,1%), lucerny $89,09 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (49,7%), pomidora $51,51 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (47,3%) oraz słonecznika $115,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (45,1%). 10 mM NaF obniżył również zawartość chlorofilu b u rzodkiewki o $98,76 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (37,5%), ogórka o $47,74 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (36,2%), łubinu o $28,20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (14,9%) oraz u żyta o $18,99 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (8,6%).

Wykazano istotne różnice zawartości karotenoidów (tab. 8.) w rzodkiewce, rzodkwi, pszenicy, łubinie, słoneczniku, ogórku, lucernie oraz pomidorze. Największe obniżenie zawartości tych związków zaobserwowano w rzodkiewce spadek o $42,57 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (o 65,74%), pszenicy spadek o $36,02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (41,45%), słonecznika spadek o $26,63 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (48,19%) oraz lucernie spadek o $34,26 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (50,24%). Nie wykazano natomiast istotnych różnic w zawartości karotenoidów pod wpływem 10 mM NaF w siewkach jęczmienia i żyta.

Tab. 7. Zawartość chlorofilu a w 10-dniowych siewkach wybranych gatunków roślin uprawnych rosnących z dodatkiem 10 mM NaF

Gatunek rośliny i odmiana	Chlorofil a [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]		
	Kontrola	10 mM NaF	NIR _{0,05}
Rzodkiewka zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Carmen	104,05 ± 0,5	79,11 ± 0,02	9,25
Rzodkiew zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Minowase Summer Cross	104,10 ± 3,1	52,40 ± 0,11	13,66
Jęczmień zwyczajny (<i>Hordeolum vulgare</i> L.) cv. Eunova	113,94 ± 0,1	90,94 ± 0,09	r.n.
Żyto zwyczajne (<i>Secale cereale</i> L.) cv. Bojko	155,40 ± 0,19	119,29 ± 0,06	8,66
Pszenica zwyczajna (<i>Triticum aestivum</i> L.) cv. Bryza	353,35 ± 0,17	182,03 ± 0,08	16,26
Łubin wąskolistny (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) cv. Caro	199,45 ± 0,12	110,91 ± 0,01	24,27
Słonecznik zwyczajny (<i>Helianthus annuus</i> L.) cv. Bella	189,18 ± 0,11	78,86 ± 0,09	10,99
Ogórek zwyczajny (<i>Cucumis sativus</i> L.) cv. Ela	128,79 ± 0,13	97,00 ± 0,10	r.n.
Lucerna siewna (<i>Medicago sativa</i> L.) cv. Triade	202,73 ± 0,14	102,65 ± 0,11	19,60
Pomidor zwyczajny (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.) cv. Faworyt	140,29 ± 0,15	117,05 ± 0,12	24,68

r.n. - różnica nieistotna statystycznie; * - wartość NIR dla $p < 0,05$; NIR-najmniejsza istotna różnica

Tab. 8. Zawartość chlorofilu b w 10-dniowych siewkach wybranych gatunków roślin uprawnych rosnących z dodatkiem 10 mM NaF

Gatunek rośliny i odmiana	Chlorofil b [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]		
	Kontrola	10 mM NaF	NIR _{0,05}
Rzodkiewka zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Carmen	263,51 ± 0,09	164,75 ± 0,11	26,855
Rzodkiew zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Minowase Summer Cross	141,29 ± 0,11	135,34 ± 0,09	r.n.
Jęczmień zwyczajny (<i>Hordeolum vulgare</i> L.) cv. Eunova	93,11 ± 0,10	87,81 ± 0,03	r.n.
Żyto zwyczajne (<i>Secale cereale</i> L.) cv. Bojko	221,70 ± 0,12	202,71 ± 0,02	4,727
Pszenica zwyczajna (<i>Triticum aestivum</i> L.) cv. Bryza	258,87 ± 0,08	126,51 ± 0,03	11,988
Łubin wąskolistny (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) cv. Caro	188,64 ± 0,09	160,44 ± 0,14	4,863
Słonecznik zwyczajny (<i>Helianthus annuus</i> L.) cv. Bella	255,00 ± 0,11	139,90 ± 0,06	14,281
Ogórek zwyczajny (<i>Cucumis sativus</i> L.) cv. Ela	131,95 ± 0,15	84,21 ± 0,10	6,060
Lucerna siewna (<i>Medicago sativa</i> L.) cv. Triade	179,06 ± 0,13	89,97 ± 0,08	4,835
Pomidor zwyczajny (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.) cv. Faworyt	108,96 ± 0,10	57,45 ± 0,03	6,425

r.n. - różnica nieistotna statystycznie; * - wartość NIR dla $p < 0,05$; NIR-najmniejsza istotna różnica

Tab. 9. Zawartość karotenoidów w 10-dniowych siewkach wybranych gatunków roślin uprawnych rosnących z dodatkiem 10 mM NaF

Gatunek rośliny i odmiana	Karotenoidy [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]		
	Kontrola	10 mM NaF	NIR _{0,05}
Rzodkiewka zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Carmen	64,76 ± 0,34	22,19 ± 0,95	1,39*
Rzodkiew zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i> L.) cv. Minowase Summer Cross	29,15 ± 0,88	20,01 ± 2,04	3,03*
Jęczmień zwyczajny (<i>Hordeolum vulgare</i> L.) cv. Eunova	33,60 ± 1,59	32,39 ± 1,25	r.n.
Żyto zwyczajne (<i>Secale cereale</i> L.) cv. Bojko	31,91 ± 1,05	28,03 ± 1,91	r.n.
Pszenica zwyczajna (<i>Triticum aestivum</i> L.) cv. Bryza	86,91 ± 3,59	50,89 ± 3,72	7,04*
Łubin wąskolistny (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) cv. Caro	53,34 ± 6,68	39,52 ± 0,74	1,36*
Słonecznik zwyczajny (<i>Helianthus annuus</i> L.) cv. Bella	55,26 ± 0,76	28,63 ± 2,75	3,89*
Ogórek zwyczajny (<i>Cucumis sativus</i> L.) cv. Ela	31,65 ± 1,88	21,03 ± 0,95	1,78*
Lucerna siewna (<i>Medicago sativa</i> L.) cv. Triade	68,19 ± 1,09	33,93 ± 2,65	3,91*
Pomidor zwyczajny (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.) cv. Faworyt	34,26 ± 1,27	26,51 ± 1,63	2,82*

r.n. - różnica nieistotna statystycznie; * - wartość NIR dla $p < 0,05$; NIR-najmniejsza istotna różnica

3.1.5. Podsumowanie wyników I etapu badań

W oparciu o przeprowadzone badania wykazano, że 10 mM roztwór NaF wpłynął negatywnie na wzrost i rozwój oraz badane parametry fizjologiczne i biochemiczne 10-dniowych siewek wybranych gatunków roślin. Na podstawie uzyskanych wyników pięć badanych gatunków (pszenica, rzodkiewka, lucerna, słonecznik, pomidor) uznano jako nietolerancyjne oraz trzy (jęczmień, rzodkiew, łubin) jako tolerancyjne na fluor. Spośród roślin nietolerancyjnych do kolejnych etapów badań wybrano pszenicę zwyczajną odmiany Bryza.

3.2. Etap II

Wpływ różnych stężeń soli NaF oraz Asc zastosowanych osobno i razem na wybrane parametry morfologiczne, fizjologiczne i biochemiczne 10 dniowych siewek pszenicy jarej odmiany Bryza

3.2.1. Długość koleoptyli, korzeni, wartości indeksu kiełkowania oraz świeża masa 10-dniowych siewek pszenicy

Długość koleoptyli pszenicy, badanych jako kontrolne, wyniosła średnio 14,7 cm. Wykazano, że trzy zastosowane stężenia kwasu L-askorbinowego wpłynęły pozytywnie na kształtowanie się tej cechy w porównaniu do roślin kontrolnych. Największy wzrost (średnio o 19%) zaobserwowano u siewek z dodatkiem 2 mM Asc (tab. 9).

Zastosowanie 10 oraz 20 mM stężeń NaF wpłynęło negatywnie na kształtowanie się średniej długości koleoptyli pszenicy w porównaniu z roślinami kontrolnymi (rys. 12). Stężenie 10 mM NaF obniżyło długość koleoptyli średnio do 1,5 cm, natomiast stężenie 20 mM NaF – obniżyło wartość tej cechy do 0,8 cm, co stanowiło odpowiednio 10% i 5% kontroli (tab. 9). Wykazano, że zastosowanie Asc w trzech stężeniach (0,5; 1 oraz 2 mM) wpłynęło pozytywnie na zminimalizowanie toksyczności indukowanej solą NaF zastosowanej w stężeniach odpowiednio 10 i 20 mM. Największy przyrost średniej długości koleoptyli odnotowano dla kombinacji 10 mM NaF + 1 mM Asc (78% kontroli). Zaobserwowano, że Asc wykazała zdecydowanie mniejszy efekt łagodzący na toksyczność soli NaF, zastosowanej w stężeniu 20 mM NaF.

Długość korzeni pszenicy dla kontroli wyniosła średnio 10,9 cm (tab. 10). Zastosowanie 0,5 mM Asc nie wpłynęło na wzrost tej cechy. Pozytywny wpływ zaobserwowano dopiero po zastosowaniu dwóch stężeń Asc (1 mM i 2 mM). W ich obecności siewki wykształciły dłuższe korzenie, średnio o 17% i 19% (tab. 9).

Zastosowanie 10 i 20 mM NaF, negatywnie wpłynęło na średnią długość korzeni w porównaniu do siewek kontrolnych. Średnio, najniższą długość korzeni stwierdzono w kombinacji 20 mM NaF (zmniejszenie o 85,36% w stosunku do kontroli). Wprowadzenie do roztworów 10 i 20 mM NaF dodatku kwasu L-askorbinowego w trzech stężeniach (0,5; 1 oraz 2 mM Asc) pozytywnie wpłynęło na średni wzrost długości korzeni. Najwyższy przyrost średniej długości korzeni zanotowano dla kombinacji: 10 mM NaF + 2 mM Asc (58% kontroli) oraz 20 mM NaF + 0,5 mM Asc (29% kontroli).

Wartość świeżej masy siewek pszenicy rosnących w roztworach z dodatkiem 10 i 20 mM NaF wyniosła odpowiednio 0,101 g (54% kontroli) i 0,039 g (21%), podczas gdy dla kontroli 0,188 g.

Dodanie do szalek odpowiednio 0,5; 1 i 2 mM Asc do 10 mM NaF wpłynęło pozytywnie na wzrost wartości świeżej masy siewek kolejno: 90%, 104% oraz 96% kontroli. Wraz ze wzrostem stężenia Asc wzrastała wartość świeżej masy roślin (odpowiednio 0,051; 0,080 oraz 0,095 g).

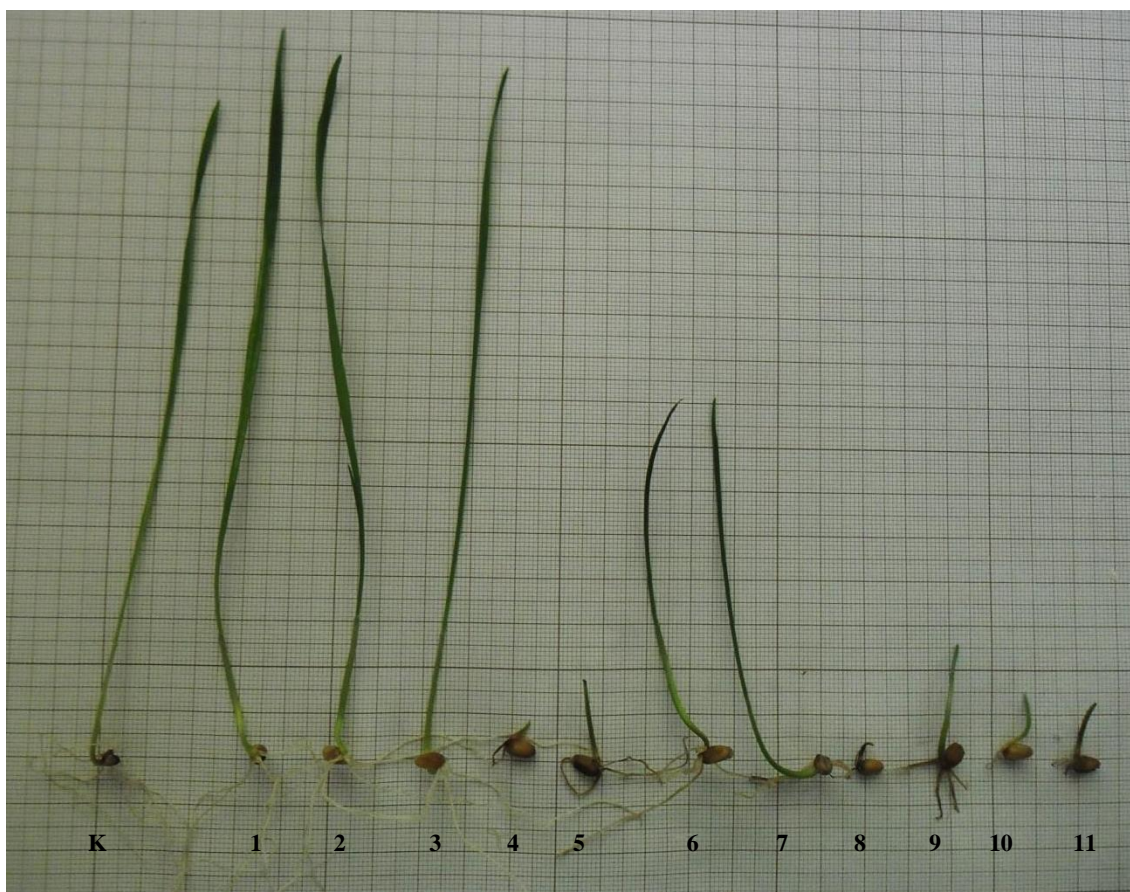
Zastosowanie kwasu L-askorbinowego w stężeniu 1 i 2 mM wpłynęło pozytywnie na wzrost wartości indeksu kiełkownia (średnio o 3% i 8%) w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Najniższe wartości IG% stwierdzono u siewek rosnących w roztworach soli 10 i 20 mM NaF w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Dla kombinacji 10 i 20 mM NaF spadek indeksu kiełkowania wyniósł 62,2% oraz 70,1%. Dodatek kwasu L-askorbinowego wpłynął na obniżenie toksyczności NaF i zwiększył wartości indeksu kiełkowania najbardziej efektywnie dla kombinacji 10 mM NaF + 2 mM Asc (54,1%) (tab. 10).

Tab. 10. Wartości indeksu tolerancji, długości koleoptyli i korzeni oraz świeżej masy 10-dniowych siewek pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w szalkach Petriego z dodatkiem odpowiednio 10 i 20 mM NaF oraz 0,5; 1 i 2 mM Asc

Kombinacje w doświadczeniu	Długość koleoptyli [cm] (% kontroli)	Długość korzenia [cm] (% kontroli)	Świeża masa [g] (% kontroli)	Indeks kiełkowania IG [%]
Kontrola	14,6 ± 0,7 ^b (100)	10,9 ± 0,7 ^f (100)	0,188 ± 0,002 ⁱ (100)	100
0,5 mM Asc	15,7 ± 0,2 ^a (107)	9,9 ± 0,4 ^b (91)	0,183 ± 0,006 ^b (97)	90,55
1 mM Asc	17,1 ± 0,6 ^c (117)	11,2 ± 0,3 ^f (103)	0,190 ± 0,003 ⁱ (101)	102,44
2 mM Asc	17,4 ± 0,6 ^c (119)	11,8 ± 0,5 ^f (108)	0,196 ± 0,005 ^a (104)	108,54
10 mM NaF	1,5 ± 0,1 ^h (10)	4,1 ± 0,3 ^d (38)	0,101 ± 0,009 ^e (54)	37,80
10 mM NaF + 0,5 mM Asc	10,5 ± 0,9 ^c (71)	4,7 ± 0,5 ^c (43)	0,170 ± 0,012 ^e (90)	43,29
10 mM NaF + 1 mM Asc	11,4 ± 1,5 ^f (78)	6,3 ± 0,1 ^g (58)	0,195 ± 0,006 ^e (104)	58,23
10 mM NaF + 2 mM Asc	11,1 ± 1,4 ^f (76)	6,4 ± 0,3 ^g (59)	0,180 ± 0,001 ^j (96)	58,27
20 mM NaF	0,8 ± 0,06 ^d (5)	1,4 ± 0,21 ⁱ (13)	0,039 ± 0,005 ^h (21)	29,88
20 mM NaF + 0,5 mM Asc	1,5 ± 0,06 ^h (10)	3,2 ± 0,21 ^e (29)	0,090 ± 0,010 ^g (48)	31,11
20 mM NaF + 1 mM Asc	2,2 ± 0,26 ^h (15)	1,6 ± 0,10 ^{hi} (15)	0,119 ± 0,002 ^e (63)	36,63
20 mM NaF + 2 mM Asc	2,5 ± 0,40 ^g (17)	1,8 ± 0,10 ^h (17)	0,134 ± 0,015 ^e (71)	36,46

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$



Rys. 12. Siewki pszenicy rosnącej w szalkach w następujących wariantach: **K**- kontrola (woda destylowana); **1** – 0,5 mM Asc; **2** – 1 mM Asc; **3** – 2 mM Asc; **4** – 10 mM NaF; **5** – 10 mM NaF+0,5 mM Asc; **6** – 10 mM NaF+1mM Asc; **7** – 10 mM NaF+2 mM Asc; **8** – 20 mM NaF; **9** – 20 mM NaF + 0,5 mM Asc; **10** – 20 mM NaF +1mM Asc; **11** – 20 mM NaF +2 mM Asc

3.2.2. Zawartość MDA i wolnej proliny w liściach 10-dniowych siewek pszenicy jarej odmiany Bryza

Stwierdzono istotny wpływ badanych substancji na zawartość MDA oraz wolnej proliny w siewkach (tab. 11.). Zawartość MDA w siewkach pszenicy z kombinacji kontrolnej wyniosła $52,80 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ ś.m.}$ Zastosowanie dwóch stężeń Asc (oprócz 0,5 mM) wpłynęło nieznacznie na wzrost zawartości MDA w siewkach. Największy wzrost zanotowano dla stężenia 1 mM Asc (116%).

Najwyższą zawartością MDA spośród badanych kombinacji charakteryzowały się liście pszenicy z kombinacji 10 i 20 mM NaF. Obydwa stężenia soli NaF wpłynęły pozytywnie na wzrost zawartości MDA w liściach, co stanowiło 176% kontroli (dla 10 mM NaF) i 223% kontroli (dla 20 mM NaF).

Zastosowanie kwasu L-askorbinowego w trzech stężeniach do 10 i 20 mM NaF wpłynęło na obniżenie toksyczności wywołanej związkami fluoru powodując spadek

ilości MDA w pszenicy. Największe obniżenie zawartości MDA dla 10 mM NaF zaobserwowano w kombinacji 10 mM NaF + 2 mM Asc (161% kontroli). Dodatek wszystkich trzech stężeń kwasu L-askorbinowego do 20 mM NaF wpłynął na spadek ilości MDA na podobnym poziomie, obniżając zawartość tego parametru z 213% do 211% kontroli.

Zawartość wolnej proliny w siewkach pszenicy z kombinacji kontrolnej wyniosła $1,92 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. Zastosowanie dwóch stężeń Asc (0,5 i 2 mM) wpłynęło na obniżenie zawartości wolnej proliny w liściach pszenicy, wartości te wyniosły odpowiednio: 56% i 88% kontroli (tab. 11). Natomiast 1 mM Asc wpłynął nieznacznie na wzrost wolnej proliny (do 104%) w porównaniu z kontrolą.

Najwyższym stężeniem tego związku charakteryzowały siewki z kombinacji 10 i 20 mM NaF, odpowiednio $6,53 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (340% kontroli) i $32,52 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (1694% kontroli). Po zastosowaniu kwasu L-askorbinowego w trzech stężeniach, podobnie jak w przypadku MDA odnotowano obniżenie zawartości wolnej proliny w liściach pszenicy. Przy stresie wywołanym 10 mM NaF, zastosowanie 0,5; 1 i 2 mM Asc obniżyło zawartość wolnej proliny średnio o ponad 50%, a najbardziej efektywnie w kombinacji 10 mM NaF+1 mM Asc (106% kontroli). Zastosowanie kwasu L-askorbinowego przy stresie wywołanym 20 mM NaF również zredukowało zawartość wolnej proliny w siewkach pszenicy.

Tab. 11. Zawartość MDA i prolina w 10-dniowych siewkach pszenicy rosnącej w szalkach z dodatkiem 10 mM i 20 mM NaF oraz 0,5; 1; 2 mM Asc

Kombinacje w doświadczeniu	MDA [nmol·g⁻¹ ś.m.] (% kontroli)	Prolina [μmol·g⁻¹ ś.m.] (% kontroli)
Kontrola	52,80 ± 0,61 ¹ (100)	1,92 ± 0,19 ^h (100)
0,5 mM Asc	53,01 ± 0,52 ^k (100)	1,08 ± 0,08 ^j (56)
1 mM Asc	61,51 ± 0,52 ⁱ (116)	1,99 ± 0,47 ^k (104)
2 mM Asc	57,26 ± 0,65 ^j (108)	1,69 ± 0,24 ⁱ (88)
10 mM NaF	101,40 ± 0,65 ^e (192)	6,53 ± 0,36 ^e (340)
10 mM NaF + 0,5 mM Asc	92,69 ± 0,25 ^f (176)	3,17 ± 0,42 ^g (165)
10 mM NaF + 1 mM Asc	92,53 ± 0,61 ^g (175)	2,03 ± 0,37 ^k (106)
10 mM NaF + 2 mM Asc	84,95 ± 0,25 ^h (161)	3,92 ± 0,09 ^f (204)
20 mM NaF	117,74 ± 1,29 ^a (223)	32,52 ± 0,14 ^a (1694)
20 mM NaF + 0,5 mM Asc	112,26 ± 0,85 ^b (213)	21,33 ± 0,44 ^c (1111)
20 mM NaF + 1 mM Asc	111,34 ± 0,25 ^c (211)	18,37 ± 0,11 ^d (957)
20 mM NaF + 2 mM Asc	111,24 ± 0,25 ^b (211)	21,59 ± 0,13 ^b (1124)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy p<0,05

3.2.3. Zawartość chlorofilu a, b i karotenoidów w liściach 10-dniowych siewek pszenicy jarej odmiany Bryza, rosnącej w szalkach z dodatkiem 10 i 20 mM NaF oraz 0,5; 1 i 2 mM Asc

Wykazano istotny wpływ zastosowanych substancji na zawartość chlorofilu a w liściach. Zawartość chlorofilu a w kontroli wyniosła 270,38 μg·g⁻¹ ś.m. Natomiast najwyższe stężenie tego związku stwierdzono w kombinacji 1 mM Asc 310,74 μg·g⁻¹ ś.m., wartość ta stanowiła 115% kontroli. Pozostałe kombinacje 0,5 Asc oraz 2 mM Asc charakteryzowały się również wyższą zawartością chlorofilu a, odpowiednio: 104% i 111% kontroli.

Najniższe stężenia chlorofilu a, spośród wszystkich badanych kombinacji zanotowano w kombinacjach 10 i 20 mM NaF. Dla roślin rosnących z dodatkiem 10 mM NaF wykazano spadek stężenia chlorofilu a do 11% kontroli, natomiast dla 20 mM NaF

do 8% kontroli. Zastosowanie trzech stężeń Asc do soli 10 mM NaF wpłynęło na zwiększenie zawartości chlorofilu a w siewkach: 15-19% kontroli. Natomiast dodatek wszystkich trzech stężeń Asc do kombinacji z 20 mM NaF wpłynął na wzrost stężenia chlorofilu a w siewkach do 15% kontroli.

Podobnie jak w przypadku chlorofilu a wykazano istotny wpływ zastosowanych substancji na zawartość chlorofilu b w siewkach pszenicy (tab.12).

Stężenie chl b w roślinach kontrolnych wyniosło $130,18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. Najwyższe zawartości chlorofilu b zawierała kombinacja z 1 mM Asc (108% kontroli). Podobnie jak w przypadku chlorofilu a stężenie chlorofilu b było najniższe w kombinacjach z 10 mM (15% kontroli) i 20 mM NaF (8% kontroli). Dodatek Asc zarówno do 10 jak i 20 mM NaF wpłynął na zwiększenie zawartości chlorofilu b w liściach pszenicy. Wzrost stężenia chlorofilu b dla kombinacji zawierających 10 mM NaF i trzy stężenia Asc kształtował się na tym samym poziomie i wyniósł 16% kontroli. Natomiast w kombinacjach z 20 mM NaF najbardziej efektywnie na zwiększenie zawartości chlorofilu b wpłynął 0,5 mM Asc, zwiększając zawartość chl b do 39% kontroli.

Zawartość ostatniego z oznaczanych parametrów – karotenoidów różniła się istotnie pomiędzy badanymi kombinacjami. W roślinach kontrolnych zawartość karotenoidów wyniosła $79,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ i była najwyższa wśród badanych kombinacji (tab. 12). Zastosowanie 0,5; 1 i 2 mM kwasu L-askorbinowego wpłynęło na obniżenie zawartości karotenoidów w siewkach pszenicy stanowiąc kolejno 73,85 i 67% kontroli.

Podobnie jak w przypadku chlorofilu a i chlorofilu b, najniższym stężeniem karotenoidów charakteryzowały się rośliny z kombinacji 10 mM (11% kontroli) i 20 mM NaF (6% kontroli). Zastosowanie wszystkich trzech stężeń Asc zarówno do 10 jak i 20 mM NaF wpłynęło na zwiększenie zawartości karotenoidów w 10-dniowych siewkach pszenicy. W obydwu kombinacjach z solami NaF najwyższy wzrost zawartości karotenoidów odnotowano po zastosowaniu 0,5 mM Asc.

Tab. 12. Zawartość chlorofilu a, b i karotenoidów w 10-dniowych siewkach pszenicy rosnącej w szalkach z dodatkiem 10 i 20 mM NaF oraz 0,5; 1; 2 mM Asc

Kombinacje w doświadczeniu	Chlorofil a [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)	Chlorofil b [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)	Karotenoidy [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)
Kontrola	270,38 ± 0,09 ^d (100)	130,18 ± 0,03 ^c (100)	79,00 ± 0,01 ^a (100)
0,5 mM Asc	280,74 ± 0,12 ^c (104)	120,02 ± 0,07 ^d (92)	58,01 ± 0,04 ^c (73)
1 mM Asc	310,74 ± 0,01 ^a (115)	140,54 ± 0,10 ^a (108)	67,12 ± 0,03 ^b (85)
2 mM Asc	300,91 ± 0,03 ^b (111)	130,91 ± 0,08 ^c (101)	53,10 ± 0,02 ^d (67)
10 mM NaF	30,95 ± 0,01 ^k (11)	20,16 ± 0,01 ^k (15)	9,01 ± 0,01 ^h (11)
10 mM NaF + 0,5 mM Asc	40,03 ± 0,02 ^j (15)	20,99 ± 0,04 ^f (16)	19,03 ± 0,04 ^e (24)
10 mM NaF + 1 mM Asc	40,12 ± 0,09 ⁱ (15)	20,35 ± 0,03 ^j (16)	11,10 ± 0,01 ^k (14)
10 mM NaF + 2 mM Asc	50,65 ± 0,07 ^e (19)	20,39 ± 0,01 ⁱ (16)	14,01 ± 0,01 ^g (18)
20 mM NaF	20,76 ± 0,03 ^l (8)	10,99 ± 0,08 ^l (8)	5,02 ± 0,01 ^j (6)
20 mM NaF + 0,5 mM Asc	40,33 ± 0,01 ^h (15)	50,52 ± 0,03 ^e (39)	19,03 ± 0,01 ^f (24)
20 mM NaF + 1 mM Asc	40,42 ± 0,02 ^g (15)	20,84 ± 0,07 ^g (16)	7,03 ± 0,01 ⁱ (9)
20 mM NaF + 2 mM Asc	40,88 ± 0,05 ^f (15)	20,62 ± 0,02 ^h (16)	11,07 ± 0,01 ^k (14)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.2.4. Podsumowanie wyników II etapu badań

Wyniki badań wykazały, że zastosowane dwa stężenia soli 10 i 20 mM NaF wpływają toksycznie na wzrost, rozwój oraz parametry fizjologiczne i biochemiczne 10-dniowych siewek pszenicy badanej *in vitro*. Wykazano również, że egzogenne zastosowanie kwasu L-askorbinowego w stężeniu 0,5; 1 i 2 mM skutecznie łagodzi toksyczność wywołaną wyżej wymienionymi solami u pszenicy. Spośród zastosowanych stężeń kwasu L-askorbinowego do III etapu badań (doświadczenie wazonowe) wybrano dawki 1 i 2 mM Asc.

3.3. Etap III

Wpływ 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc na zawartość proliny, MDA, witaminy C, aktywność enzymów CAT i POX u pszenicy jarej odmiany Bryza oraz na aktywność wybranych enzymów glebowych w tym fosfataz zasadowej i kwaśnej oraz dehydrogenaz

3.3.1. Zawartość wolnej proliny i MDA w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc

Zawartość wolnej proliny w liściach pszenicy w kontroli podczas trzech terminów pomiaru wyniosła odpowiednio: 7,00; 6,90 i 9,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (tab.13). Dodanie do gleby 1 mM Asc wpłynęło na jej obniżenie podczas I terminu pomiaru (87,1 % kontroli). Natomiast zastosowanie 2 mM Asc wpłynęło na obniżenie zawartości proliny w I i II terminie pomiaru do poziomu 75,7 i 75,4% kontroli.

Zawartość proliny w liściach pszenicy, była wyraźnie zależna od zawartości fluoru w glebie i wzrastała proporcjonalnie do wzrostu jego stężenia w glebie. Wysoką zawartością wolnej proliny we wszystkich terminach pomiaru charakteryzowały się rośliny badane w kombinacji z 25 mM NaF: 33,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (I termin 475,7% kontroli); 30,90 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (II termin 447,8% kontroli); przy czym w III terminie zawartość wolnej proliny spadła do poziomu 37,60 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (408,7% kontroli). Najwyższą zawartością wolnej proliny spośród wszystkich badanych kombinacji charakteryzowały się rośliny z kombinacji 50 mM NaF. Zawartość tego aminokwasu wzrastała wraz z terminem pomiaru i wyniosła odpowiednio: 40,60 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (I termin 572,3% kontroli); 60,70 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (II termin 879,7% kontroli); 98,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (III termin 1066,3% kontroli).

Po zastosowaniu kwasu L-askorbinowego do gleby zaobserwowano, że zarówno 1 mM jak i 2 mM Asc wpłynęły na obniżenie zawartości wolnej proliny w pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem NaF. Wprowadzony 1 mM Asc do gleby z 25 mM NaF wpłynął na obniżenie zawartości wolnej proliny do 222,1% (I termin), 258% (II termin) oraz 141,3% (III termin) kontroli. Dodatek 2 mM Asc również obniżył zawartość tego aminokwasu w siewkach pszenicy we wszystkich trzech terminach pomiaru, do poziomu 257,1% (I termin), 258% (II termin) oraz 191,3% (III termin). Zastosowanie Asc do 50 mM NaF wpłynęło na obniżenie zawartości wolnej proliny w liściach pszenicy. Zastosowanie 1 mM Asc dla tej kombinacji obniżyło bardziej efektywnie zawartość wolnej proliny niż 2 mM Asc. Spadek zawartości tego aminokwasu dla 1mM Asc w liściach wyniósł odpowiednio: 508,6% (I termin), 676,8% (II termin) i 495,6% kontroli

(III termin), natomiast spadek po zastosowaniu 2 mM Asc wyniósł 810 (I termin), 839,3 (II termin) oraz 871,7% kontroli (III termin).

Wszystkie badane kombinacje charakteryzował wzrost zawartości MDA wraz z terminem pomiaru (tab. 14). Rośliny rosnące w glebie kontrolnej charakteryzowały się najniższym stężeniem MDA spośród wszystkich badanych kombinacji, podczas każdego terminu pomiaru. Zawartości te wyniosły kolejno 42,31; 28,65 i 50,48 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ś.m}$ (tab.14). Dodatek dwóch stężeń kwasu L-askorbinowego do gleby wpłynął na wzrost ilości MDA w liściach pszenicy, w każdym terminie pomiaru ilości te były wyższe niż w kombinacji kontrolnej. Dla kombinacji 1 mM Asc wzrost ten wyniósł kolejno: 107,1; 116,7 i 110,4% w stosunku do kontroli. Natomiast dla kombinacji 2 mM zawartość MDA początkowo była niższa niż w kombinacji 1 mM Asc i wyniosła podczas I terminu pomiaru 105,8% kontroli następnie wzrosła do 119,8% kontroli (II pomiar) i podczas III terminu pomiaru ponownie była niższa niż w kombinacji 1 mM Asc: 106,7% kontroli (tab.14)

Najwyższą zawartością MDA we wszystkich terminach pomiaru charakteryzowały się kombinacje z 25 mM i 50 mM NaF w porównaniu do kontroli. W wariantach tych najwyższy wzrost wartości MDA wykazano w III pomiarze: 140% (25 mM NaF) i 156,7% (50 mM NaF). Dodatek kwasu L-askorbinowego do gleby z 25 mM i 50 mM NaF zarówno w stężeniu 1 mM jak i 2 mM wpłynął na obniżenie zawartości MDA we wszystkich terminach pomiaru. Oba zastosowane stężenia kwasu L-askorbinowego obniżyły zawartość MDA w roślinach rosnących w glebie z solami NaF na podobnym poziomie. W I terminie pomiaru najniższą zawartością MDA w liściach charakteryzowała się kombinacja 50 mM NaF + 1 mM Asc (110 % kontroli), w II terminie 50 mM NaF + 2 mM Asc (127,5 % kontroli) natomiast w III terminie pomiaru 25 mM NaF + 1 mM Asc (114,7 % kontroli).

Tab. 13. Zawartość wolnej proliny w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru

Kombinacja	Prolina [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)		
	I 14 dzień	II 21 dzień	III 28 dzień
Kontrola	7,00 ± 0,16 ^e (100)	6,90 ± 0,11 ^e (100)	9,20 ± 0,01 ^h (100)
1 mM Asc	6,10 ± 0,10 ^e (87,1)	7,70 ± 0,05 ^e (111,6)	11,00 ± 0,23 ^g (119,6)
2 mM Asc	5,30 ± 0,03 ^e (75,7)	5,20 ± 0,01 ^e (75,4)	9,30 ± 0,03 ^h (101,1)
25mM NaF	33,30 ± 0,08 ^c (475,7)	30,90 ± 0,05 ^c (447,8)	37,60 ± 0,04 ^d (408,7)
50 mM NaF	40,06 ± 0,08 ^b (572,3)	60,70 ± 0,14 ^a (879,7)	98,10 ± 0,03 ^a (1066,3)
25 mM NaF + 1 mM Asc	15,55 ± 0,02 ^d (222,1)	17,80 ± 0,16 ^d (258)	13,0 ± 0,06 ^f (141,3)
25 mM NaF + 2 mM Asc	18,00 ± 0,50 ^d (257,1)	19,80 ± 0,12 ^d (287)	17,60 ± 0,23 ^e (191,3)
50 mM NaF + 1 mM Asc	35,60 ± 0,22 ^c (508,6)	46,70 ± 0,32 ^b (676,8)	45,60 ± 0,05 ^c (495,7)
50 mM NaF + 2 mM Asc	56,70 ± 0,81 ^a (810)	57,91 ± 0,30 ^a (839,3)	61,80 ± 0,07 ^b (671,7)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

Tab. 14. Zawartość MDA w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru

Kombinacja	MDA [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)		
	I 14 dzień	II 21 dzień	III 28 dzień
Kontrola	42,31 ± 5,52 ^d (100)	28,65 ± 4,20 ^d (100)	50,48 ± 2,71 ^b (100)
1 mM Asc	45,32 ± 2,19 ^d (107,1)	33,41 ± 0,09 ^d (116,7)	55,75 ± 0,33 ^b (110,4)
2 mM Asc	44,78 ± 1,46 ^d (105,8)	34,33 ± 1,35 ^d (119,8)	53,87 ± 2,52 ^{ab} (106,7)
25mM NaF	53,54 ± 0,41 ^b (126,5)	69,00 ± 0,81 ^a (240,8)	70,69 ± 1,47 ^{ab} (140)
50 mM NaF	60,37 ± 1,77 ^a (142,7)	66,55 ± 1,88 ^{ab} (232,3)	79,08 ± 1,04 ^a (156,7)
25 mM NaF + 1 mM Asc	48,33 ± 1,80 ^c (114,2)	44,41 ± 4,68 ^{cd} (155)	57,90 ± 2,53 ^b (114,7)
25 mM NaF + 2 mM Asc	48,81 ± 4,23 ^c (115,4)	36,61 ± 1,29 ^d (127,8)	59,78 ± 2,21 ^{ab} (118,4)
50 mM NaF + 1 mM Asc	46,55 ± 2,69 ^c (110)	37,09 ± 5,19 ^{cd} (129,5)	67,15 ± 1,36 ^{ab} (133)
50 mM NaF + 2 mM Asc	51,66 ± 0,41 ^b (122,1)	36,52 ± 3,66 ^d (127,5)	60,1 ± 1,42 ^b (119,1)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.3.2. Zawartość chlorofilu a, b i karotenoidów w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc

W tabeli 15 przedstawiono zawartość chlorofilu a w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc. Najwyższą zawartością chlorofilu a charakteryzowały się rośliny kontrolne podczas I terminu pomiaru ($114,96 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), jednakże w kolejnych pomiarach wartości te zmniejszyły się do $92,19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ w III terminie pomiaru. U roślin rosnących w glebie w kombinacji 1 mM Asc i 2 mM Asc zaobserwowano zmniejszenie się zawartości chlorofilu a w I i III pomiarze, 1 mM Asc: 83,3 (I); 98,4 % (III) oraz 2 mM Asc: 62,6 (I) 96,8% kontroli (III) od roślin rosnących w kombinacji kontrolnej. Natomiast w II terminie pomiaru wartości chlorofilu a w obu kombinacjach wzrosły do wartości powyżej $100,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ i były wyższe niż w kontroli ($97,43 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Przy czym najwyższą zawartością w II terminie charakteryzowała się kombinacja 2 mM Asc (106,9% kontroli).

Dodatek 25 mM i 50 mM NaF do gleby obniżył zawartość chlorofilu a w liściach pszenicy we wszystkich terminach pomiaru w porównaniu z kontrolą. Najniższe zawartości charakteryzowały rośliny rosnące w kombinacji 25 mM NaF, w pierwszych dwóch terminach pomiaru, 60,8 (I) i 62,9% kontroli (II). Natomiast w III terminie pomiaru najniższą zawartością chlorofilu a charakteryzowały się rośliny z kombinacji 50 mM NaF (70,8% kontroli). Zastosowanie 1 mM i 2 mM do gleby z 25 i 50 mM NaF wpłynęło na wzrost zawartości chlorofilu a w liściach pszenicy w II i III terminie pomiaru. Najwyższą zawartością chlorofilu a charakteryzowały się kombinacje 25 mM NaF + 1 mM Asc: 85,2 (II) oraz 92,6 % kontroli (III) oraz kombinacje 50 mM NaF + 2 mM Asc: 84,2 (II) oraz 89,6 % kontroli (III).

Rośliny z kombinacji kontrolnej badane w trzech terminach pomiaru charakteryzowały się następującą zawartością chlorofilu b w liściach (tab. 13): 33,86 (I); 31,96 (II) oraz $27,18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (III). W porównaniu z kontrolą zawartość tego związku w liściach pszenicy wzrosła po zastosowaniu 1 mM Asc do gleby we wszystkich terminach pomiaru, wzrost ten wyniósł odpowiednio: 100,9 (I), 103,5 (II) oraz 141,8% kontroli (III) natomiast w kombinacji 2 mM Asc odnotowano wzrost zawartości chlorofilu b podczas dwóch terminów pomiaru: 106,5 (II) oraz 138,5% kontroli (III).

W pszenicy rosnącej w kombinacjach zawierających tylko sole NaF odnotowano spadek zawartości chlorofilu b w liściach w każdym terminie pomiaru. Najniższe zawartości chlorofilu b wykazano podczas I terminu pomiaru, w kombinacji 25 mM NaF ilość chlorofilu b wyniosła 37,4% kontroli natomiast w kombinacji 50 mM NaF 34,4%

kontroli. Podczas późniejszych terminów pomiaru dla obu tych kombinacji zaobserwowano wzrost zawartości chlorofilu b w liściach osiągając, podczas III terminu pomiaru 60,1 (25 mM NaF) oraz 57,3% kontroli (50 mM NaF). Zastosowanie kwasu L-askorbinowego w obu stężeniach w kombinacjach z solami NaF w glebie wpłynęło na zwiększenie zawartości chlorofilu b w liściach pszenicy w każdym terminie pomiaru. Najwyższy wzrost zanotowano w III terminie w kombinacjach 25 mM NaF + 1 mM Asc: 72,8% kontroli oraz 50 mM NaF + 1 mM Asc: 63,1% kontroli.

Zawartość karotenoidów (tab. 16) w roślinach z kombinacji kontrola wyniosła: 32,45 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (I) – była to wartość najwyższa wśród wszystkich kombinacji badanych w tym terminie; 41,77 (II) oraz 37,3 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (III). Po zastosowaniu 1 mM Asc zaobserwowano wzrost zawartości karotenoidów w liściach w II terminie (101,6% kontroli) i III (103,2% kontroli) terminie pomiaru. Aplikacja 2 mM Asc wpłynęła na wzrost zawartości karotenoidów tylko podczas II terminu pomiaru wynosząc 109,5 % kontroli.

Zarówno 25 mM jak i 50 mM NaF wpłynęły na obniżenie zawartości karotenoidów w liściach pszenicy w każdym terminie pomiaru, największy spadek zawartości tych związków odnotowano podczas II terminu pomiaru: 38,7 % kontroli (25 mM NaF) i 36,6% kontroli (50 mM NaF). Nie wykazano wzrostu ilości karotenoidów w pszenicy po dodaniu 1 mM Asc do gleby zanieczyszczonej 25 mM NaF, natomiast zastosowanie 2 mM Asc w każdym terminie pomiaru wpłynęło na wzrost zawartości karotenoidów osiągając najwyższą wartość w I terminie pomiaru: 59,7% kontroli. Natomiast w kombinacjach z 50 mM NaF i Asc wykazano, że oba stężenia kwasu L-askorbinowego wpłynęły na wzrost zawartości karotenoidów w liściach pszenicy, najwyższą zawartość odnotowano podczas I terminu pomiaru w kombinacji 50 mM NaF+2 mM Asc (59,6% kontroli).

Tab. 15. Zawartość chlorofilu a i b w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru

Kombinacja	Chlorofil a [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)			Chlorofil b [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)		
	I 14 dzień	II 21 dzień	III 28 dzień	I 14 dzień	II 21 dzień	III 28 dzień
Kontrola	114,96 ± 0,09 ^a (100)	97,43±0,02 ^b (100)	92,19 ± 0,01 ^a (100)	33,86±0,04 ^a (100)	31,96±0,08 ^b (100)	27,18±0,01 ^b (100)
1 mM Asc	95,85 ± 0,01 ^{ab} (83,4)	102,89 ± 0,09 ^a (105,6)	90,74±0,07 ^a (98,4)	34,15 ± 0,02 ^a (100,9)	33,07 ± 0,01 ^a (103,5)	38,54 ± 0,06 ^a (141,8)
2 mM Asc	71,98 ± 0,04 ^{bc} (62,6)	104,13 ± 0,09 ^a (106,9)	89,24±0,11 ^a (96,8)	23,35 ± 0,03 ^b (69)	34,02 ± 0,07 ^a (106,4)	37,65 ± 0,02 ^a (138,5)
25mM NaF	69,89 ± 0,01 ^c (60,8)	61,28 ± 0,08 ^e (62,9)	66,54 ± 0,02 ^d (72,2)	12,67 ± 0,11 ^c (37,4)	16,12 ± 0,01 ^d (50,4)	16,33 ± 0,08 ^c (60,1)
50 mM NaF	81,00 ± 0,03 ^{abc} (70,5)	66,21 ± 0,07 ^d (68)	65,29 ± 0,01 ^d (70,8)	11,66 ± 0,10 ^d (34,4)	11,42 ± 0,03 ^e (35,7)	15,57 ± 0,09 ^d (57,3)
25 mM NaF + 1 mM Asc	67,26 ± 0,09 ^c (58,5)	82,98± 0,07 ^c (85,2)	85,33 ± 0,01 ^b (92,6)	13,65 ± 0,05 ^c (40,3)	17,96 ± 0,03 ^c (56,2)	19,78 ± 0,04 ^c (72,8)
25 mM NaF + 2 mM Asc	70,98 ± 0,05 ^{bc} (61,7)	79,15 ± 0,06 ^c (81,2)	84,97±0,03 ^b (92,2)	12,81 ± 0,02 ^c (37,8)	18,45 ± 0,01 ^c (57,7)	18,96 ± 0,08 ^c (69,8)
50 mM NaF + 1 mM Asc	79,62 ± 0,07 ^{abc} (69,3)	78,25 ± 0,09 ^c (80,3)	74,50 ± 0,07 ^c (80,8)	13,77 ± 0,04 ^c (40,7)	12,72 ± 0,03 ^e (39,8)	17,16 ± 0,11 ^c (63,1)
50 mM NaF + 2 mM Asc	71,48 ± 0,08 ^{bc} (62,2)	81,99 ± 0,09 ^c (84,2)	82,58 ± 0,07 ^b (89,6)	12,78 ± 0,05 ^c (37,7)	13,07 ± 0,06 ^e (40,9)	16,16 ± 0,08 ^c (59,5)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

Tab. 16. Zawartość karotenoidów w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru

Kombinacja	Karotenoidy [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)		
	I 14 dzień	II 21 dzień	III 28 dzień
Kontrola	32,45 ± 0,01 ^a (100)	41,77 ± 0,09 ^a (100)	37,30 ± 0,04 ^a (100)
1 mM Asc	29,11 ± 0,08 ^c (89,7)	42,45 ± 0,07 ^a (101,6)	38,51 ± 0,06 ^a (103,2)
2 mM Asc	30,78 ± 0,09 ^b (94,9)	45,74 ± 0,08 ^a (109,5)	36,55 ± 0,11 ^a (98)
25mM NaF	16,82 ± 0,06 ^e (51,8)	16,16 ± 0,07 ^c (38,7)	20,20 ± 0,06 ^b (54,2)
50 mM NaF	13,34 ± 0,02 ^f (41,1)	15,29 ± 0,05 ^c (36,6)	17,11 ± 0,07 ^d (45,9)
25 mM NaF + 1 mM Asc	16,31 ± 0,04 ^e (50,3)	15,73 ± 0,07 ^c (37,7)	20,10 ± 0,09 ^b (53,9)
25 mM NaF + 2 mM Asc	19,38 ± 0,09 ^d (59,7)	19,27 ± 0,06 ^b (46,1)	20,82 ± 0,03 ^b (55,8)
50 mM NaF + 1 mM Asc	15,26 ± 0,08 ^e (47)	18,28 ± 0,14 ^b (43,8)	18,76 ± 0,06 ^c (50,3)
50 mM NaF + 2 mM Asc	19,34 ± 0,06 ^d (59,6)	16,72 ± 0,08 ^c (40)	18,12 ± 0,10 ^c (48,6)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.3.3. Zawartość kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc

Zawartość kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy w zależności od dodanej substancji do gleby oraz terminu pomiaru przedstawiono w tabeli 17.

Dla kontroli zawartość witaminy C w liściach w każdym z trzech terminów pomiaru kształtowała się na podobnym poziomie i wyniosła odpowiednio: 80,11 (I), 81,34 (II) oraz 79,65 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. rośliny (III). Egzogenne zastosowanie witaminy C do gleby w stężeniach 1 i 2 mM nie wpłynęło znacząco na wzrost endogenne stężenia kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy i zawartości te były zbliżone do wartości kontroli. Najwyższą zawartość kwasu L-askorbinowego stwierdzono dla kombinacji 2 mM Asc podczas III terminu pomiaru 103,9 % kontroli.

25 oraz 50 mM NaF wpłynął na wzrost zawartości witaminy C w liściach pszenicy w każdym terminie pomiaru w porównaniu z kontrolą. W kombinacji 25 mM zawartość witaminy C wzrastała wraz z terminem pomiaru i wyniosła 105 (I), 107,2 (II) i 112,5% (III) kontroli. Najwyższą zawartością kwas L-askorbinowego w każdym terminie pomiaru charakteryzowały się rośliny z kombinacji 50 mM NaF. W III terminie pomiaru wartość ta wzrosła do 115% kontroli.

Zastosowanie egzogenego kwasu L-askorbinowego do gleby zanieczyszczonej NaF wpłynęło na obniżenie zawartości endogenego kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy. Zarówno 1 jak i 2 mM Asc obniżyły ilości witaminy C w liściach na podobnym poziomie, w kombinacjach z 25 i 50 mM NaF w każdym terminie pomiaru, jednakże ilości te były wyższe niż w roślinach kontrolnych.

Tab. 17. Zawartość kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru

Kombinacja	Kwas L-askorbinowy [$\mu\text{g Asc}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. rośliny] (% kontroli)		
	I 14 dzień	II 21 dzień	III 28 dzień
Kontrola	80,11 \pm 2,13 ^{de} (100)	81,34 \pm 2,43 ^{bcd} (100)	79,65 \pm 2,50 ^{de} (100)
1 mM Asc	78,31 \pm 3,21 ^e (97,8)	82,31 \pm 3,47 ^{cde} (101,2)	81,12 \pm 2,31 ^{bcd} (101,8)
2 mM Asc	81,23 \pm 2,65 ^{bcd} (101,4)	81,36 \pm 3,56 ^{bcd} (100)	82,75 \pm 1,78 ^{cde} (103,9)
25mM NaF	84,12 \pm 2,78 ^{bcd} (105)	87,23 \pm 2,78 ^{abc} (107,2)	89,63 \pm 2,89 ^{abc} (112,5)
50 mM NaF	88,31 \pm 3,46 ^{abc} (110,2)	88,65 \pm 2,89 ^{abc} (109)	91,23 \pm 2,47 ^a (114,5)
25 mM NaF + 1 mM Asc	83,7 \pm 2,78 ^{bcd} (104,5)	85,21 \pm 2,08 ^{abcd} (104,8)	86,41 \pm 2,78 ^{abcd} (108,5)
25 mM NaF + 2 mM Asc	82,36 \pm 2,64 ^{bcd} (102,8)	85,67 \pm 1,99 ^{abcd} (105,3)	88,17 \pm 3,14 ^{abc} (110,7)
50 mM NaF + 1 mM Asc	87,23 \pm 1,98 ^{abc} (108,9)	87,51 \pm 3,16 ^{abc} (107,6)	91,13 \pm 2,49 ^a (114,4)
50 mM NaF + 2 mM Asc	87,45 \pm 3,01 ^{abc} (109,2)	87,21 \pm 4,12 ^{abc} (107,2)	89,98 \pm 3,86 ^{abc} (113)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.3.4. Aktywność katalazy i peroksydazy w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc

Dane dotyczące wpływu wybranych substancji do gleby na aktywność katalazy w pszenicy jarej przedstawiono w tabeli 18.

Aktywność katalazy w liściach roślin kontrolnych wyniosła 136,73 (I), 136,08 (II) oraz 168,32 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m}\cdot\text{min}^{-1}$ (III). Zastosowanie 1 mM Asc wpłynęło na obniżenie aktywności tego enzymu w dwóch terminach pomiaru – I i III. Dla kombinacji 2 mM Asc przez pierwsze dwa terminy pomiaru zaobserwowano wzrost aktywności katalazy 107,4 % (I) i 114,% kontroli (II).

Aktywność tego enzymu w roślinach z kombinacji zawierających tylko sole NaF była najwyższa spośród badanych kombinacji. 25 mM NaF podwyższył aktywność katalazy w każdym terminie pomiaru 146,5% (I) 152,8% (II) i 129,3% kontroli (III). Dodatek do gleby 50 mM NaF również wpłynął na wzrost aktywności katalazy w każdym terminie pomiaru 205,9% (I), 213,2% (II) 178,1% kontroli (III).

Aktywność tego enzymu w roślinach rosnących w glebie zanieczyszczonej 25 i 50 mM NaF po dodaniu obu stężeń kwasu L- askorbinowego uległa obniżeniu w każdym terminie pomiaru. W obu kombinacjach z NaF największe obniżenie aktywności katalazy zaobserwowano po dodaniu 2 mM kwasu L-askorbinowego do gleby.

Aktywność peroksydazy (tab.19), w roślinach kontrolnych podczas III terminów pomiaru kształtowała się na poziomie 18,85 (I), 14,36 (II) oraz 17,03 $\text{g}^{-1}\cdot\text{s.m}\cdot\text{min}^{-1}$ (III). Kombinacja 1 mM Asc charakteryzowała się niższą aktywnością peroksydazy w I i III pomiarze w porównaniu do roślin kontrolnych: 75,4% oraz 81,3% kontroli. Dla kombinacji 2 mM Asc spadek aktywności tego enzymu w porównaniu z kontrolą nastąpił tylko w I terminie pomiaru i wyniósł 88,5% kontroli. W pozostałych terminach pomiaru charakteryzowały się wzrostem aktywności peroksydazy w porównaniu z kontrolą.

Badając aktywność peroksydazy w pszenicy rosnącej w glebie, w której do podłoża dodano tylko sole NaF zauważono pojawiającą się we wszystkich trzech pomiarach tendencję stymulującą aktywność tego enzymu. Rośliny z kombinacji 50 mM NaF wykazały wyższą aktywność POX w porównaniu do roślin z kombinacji 25 mM NaF, we wszystkich trzech terminach pomiaru. Aktywność ta wyniosła odpowiednio: 218,7 (I), 343,4 (II) oraz 356,3% kontroli (III), natomiast dla kombinacji 25 mM NaF 175,7 (I), 235,5 (II) oraz 204,1% kontroli (III).

Tab. 18. Zawartość CAT w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru

Kombinacja	Katalaza [$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$] (% kontroli)		
	I 14 dzień	II 21 dzień	III 28 dzień
Kontrola	136,73 \pm 0,09 ^{ab} (100)	136,08 \pm 0,01 ^e (100)	168,32 \pm 0,07 ^c (100)
1 mM Asc	124,83 \pm 0,09 ^b (91,3)	141,56 \pm 0,07 ^c (104)	132,06 \pm 0,04 ^{sf} (78,5)
2 mM Asc	146,85 \pm 0,10 ^{ab} (107,4)	155,23 \pm 0,05 ^b (114,1)	134,58 \pm 0,05 ^f (80)
25mM NaF	200,32 \pm 0,09 ^a (146,5)	209,07 \pm 0,07 ^a (152,8)	217,73 \pm 0,01 ^b (129,3)
50 mM NaF	281,54 \pm 0,05 ^a (205,9)	290,14 \pm 0,02 ^a (213,2)	299,73 \pm 0,09 ^a (178,1)
25 mM NaF + 1 mM Asc	195,37 \pm 0,09 ^b (142,9)	290,88 \pm 0,03 ^c (213,7)	193,58 \pm 0,07 ^g (115,1)
25 mM NaF + 2 mM Asc	190,87 \pm 0,06 ^{ab} (139,6)	189,44 \pm 0,01 ^d (139,2)	185,27 \pm 0,05 ^h (110,1)
50 mM NaF + 1 mM Asc	256,04 \pm 0,08 ^{ab} (187,3)	259,11 \pm 0,07 ^c (190,4)	249,33 \pm 0,08 ^d (148,1)
50 mM NaF + 2 mM Asc	243,91 \pm 0,03 ^{ab} (178,4)	248,07 \pm 0,02 ^c (179,7)	245,89 \pm 0,09 ^e (146,1)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

Po zastosowaniu 1 mM Asc do gleby zanieczyszczonej 25 mM NaF zaobserwowano spadek aktywności POX we wszystkich terminach pomiaru: 147,1% (I), 194,9 (II) oraz 161,3% kontroli (III) (tab.19). Zastosowanie 2 mM Asc do gleby z 25 mM NaF również charakteryzowało się obniżeniem aktywności POX, osiągając we wszystkich terminach pomiaru niższe aktywności niż w kombinacji 25 mM NaF + 1 mM Asc: 116,3% (I), 176,5% (II) oraz 136,2% kontroli (III). Dodatek 1 i 2 mM Asc do gleby z 50 mM NaF również wpłynął na spadek aktywności tego enzymu w każdym terminie pomiaru. W I i III terminie pomiaru niższą aktywność peroksydazy odnotowano w kombinacji 50 mM NaF + 1 mM Asc: 176,3% (I) oraz 213,8% kontroli (III). W kombinacji 50 mM NaF + 2 mM Asc aktywność POX wyniosła 243,4 % kontroli.

Tab. 19. Aktywność POX w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 25 mM i 50 mM NaF oraz 1 mM i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru

Kombinacja	Peroksydaza [$\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$] (% kontroli)		
	I 14 dzień	II 21 dzień	III 28 dzień
Kontrola	18,85 ± 0,08 ^d (100)	14,36 ± 0,03 ^f (100)	17,03 ± 0,04 ^f (100)
1 mM Asc	14,45 ± 0,09 ^f (75,4)	15,96 ± 0,03 ^f (112,2)	13,18 ± 0,05 ^g (81,3)
2 mM Asc	16,42 ± 0,07 ^e (88,5)	16,87 ± 0,02 ^f (114,4)	19,80 ± 0,06 ^e (119,1)
25mM NaF	33,18 ± 0,08 ^g (175,7)	33,58 ± 0,09 ^e (235,5)	34,40 ± 0,07 ^b (204,1)
50 mM NaF	41,26 ± 0,10 ^a (218,7)	48,74 ± 0,12 ^a (343,4)	59,26 ± 0,03 ^a (356,3)
25 mM NaF + 1 mM Asc	27,88 ± 0,05 ^b (147,1)	28,59 ± 0,09 ^c (194,9)	26,88 ± 0,08 ^c (161,3)
25 mM NaF + 2 mM Asc	21,93 ± 0,05 ^c (116,3)	24,87 ± 0,11 ^d (176,5)	23,13 ± 0,07 ^d (136,2)
50 mM NaF + 1 mM Asc	33,74 ± 0,06 ^g (176,3)	39,28 ± 0,04 ^b (277,8)	35,97 ± 0,09 ^h (213,8)
50 mM NaF + 2 mM Asc	35,36 ± 0,11 ^g (185,2)	34,89 ± 0,06 ^e (243,4)	36,83 ± 0,04 ^h (219,5)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.3.5. Aktywność fosfatazy zasadowej i kwaśnej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru

Wpływ wybranych substancji na aktywność fosfatazy zasadowej w glebie przedstawiono w tabeli 20.

W pięciu terminach pomiarów gleba kontrolna charakteryzowała się najwyższą aktywnością fosfatazy zasadowej. Aktywność kształtowała się na poziomie powyżej 150 [$\mu\text{g p-NP}\cdot(\text{g}^{-1} \text{ s.m. gleby}\cdot\text{h})^{-1}$]. Zastosowanie 1 mM Asc wpłynęło na obniżenie aktywności tego enzymu w każdym terminie pomiaru osiągając: 84,6 (I), 88,5 (II), 83,7 (III), 90,8 (IV) oraz 88,8% kontroli (V). Dawka 2 mM Asc również obniżyła aktywność tego enzymu przy czym spadek ten był jeszcze większy niż w przypadku 1 mM Asc. Jedynie w V terminie pomiaru wartość ta była wyższa niż przy kombinacji z 1 mM Asc i wyniosła: 91,7% kontroli.

Gleba zawierająca tylko dodatek NaF charakteryzowała się najniższą aktywnością fosfatazy zasadowej w każdym terminie pomiaru. Najniższą aktywność enzymu odnotowano w glebie z dodatkiem 50 mM NaF: 60 % kontroli (IV termin pomiaru). Dodatek kwasu L-askorbinowego do kombinacji z 25 mM i 50 mM NaF wpłynął na stymulację aktywności fosfatazy zasadowej w glebie. Najwyższy wzrost aktywności tego enzymu charakteryzował kombinację 25 mM NaF + 2 mM Asc podczas II terminu pomiaru: 73,7% kontroli oraz kombinację 50 mM NaF + 1 mM Asc podczas I terminu pomiaru: 89,6% kontroli.

Wpływ wybranych substancji na aktywność fosfatazy kwaśnej w glebie, przedstawiono w tabeli 21. Najwyższą aktywnością we wszystkich terminach pomiaru charakteryzowała się kombinacja kontrolna. Kwas L-askorbinowy wpłynął na obniżenie aktywności fosfatazy kwaśnej w porównaniu z kontrolą. Największy spadek aktywności dla kombinacji 1 mM i 2 mM Asc zanotowano podczas I terminu pomiaru, kolejno: 87,4 i 88,6% kontroli. Natomiast podczas ostatniego terminu pomiaru aktywność dla tych kombinacji wzrosła kolejno do 97 i 97,7% kontroli.

Wprowadzenie do gleby samych soli NaF wpłynęło na zahamowanie aktywności fosfatazy kwaśnej w glebie obniżając jej aktywność we wszystkich terminach pomiaru poniżej 86,1% kontroli. Najniższą aktywność odnotowano dla kombinacji 50 mM NaF podczas I terminu pomiaru: 63,65% kontroli. Gleba zanieczyszczona NaF ale z dodatkiem Asc charakteryzowała się wyższą aktywnością fosfatazy kwaśnej niż gleba z samym NaF. Najwyższy wzrost aktywności zanotowano dla kombinacji 25 mM NaF +

2 mM Asc 89,3% kontroli (V termin pomiaru) oraz dla 50 mM NaF + 2 mM Asc 85,1% kontroli (V).

Tab. 20. Aktywność fosfatazy zasadowej i kwaśnej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru

Kombinacja	Fosfataza zasadowa [$\mu\text{g p-NP}\cdot(\text{g}^{-1} \text{ s.m. gleby}\cdot\text{h})^{-1}$] (% kontroli)				
	I 1 dzień	II 7 dzień	III 14 dzień	IV 21 dzień	V 28 dzień
Kontrola	158,7 ± 0,1 ^a (100)	164,3 ± 0,3 ^a (100)	156,2 ± 0,7 ^a (100)	154,4 ± 0,8 ^a (100)	157,5 ± 0,4 ^a (100)
1 mM Asc	134,2 ± 0,8 ^b (84,6)	145,0 ± 0,1 ^b (88,2)	131,1 ± 0,4 ^b (83,9)	139,0 ± 0,9 ^b (90)	139,8 ± 0,6 ^b (88,8)
2 mM Asc	108,9 ± 0,5 ^{cd} (68,6)	125,1 ± 1,1 ^c (76)	115,1 ± 0,4 ^c (73,7)	128,8 ± 0,1 ^c (83,4)	144,3 ± 0,1 ^b (91,7)
25mM NaF	96,2 ± 0,4 ^d (60,6)	115,2 ± 1,8 ^f (70)	106,2 ± 0,1 ^d (68)	116,2 ± 0,7 ^d (75,2)	122,5 ± 0,3 ^c (77,8)
50 mM NaF	104,1 ± 0,8 ^{cd} (65,6)	103,7 ± 0,8 ^e (63,1)	96,0 ± 0,3 ^e (61,4)	92,6 ± 0,8 ^f (60)	103,3 ± 0,8 ^e (65,6)
25 mM NaF + 1 mM Asc	115,2 ± 0,2 ^c (72,6)	115,0 ± 0,4 ^g (70)	96,3 ± 0,3 ^e (61,6)	96,5 ± 0,3 ^g (62,5)	115,3 ± 0,3 ^{cd} (73,2)
25 mM NaF + 2 mM Asc	109,3 ± 0,8 ^{cd} (68,9)	121,2 ± 0,3 ^d (73,7)	98,2 ± 0,5 ^e (62,9)	108,1 ± 0,5 ^e (70,1)	106,7 ± 0,4 ^{de} (67,8)
50 mM NaF + 1 mM Asc	142,2 ± 0,5 ^b (89,6)	110,7 ± 0,6 ^f (67,4)	96,0 ± 1,1 ^e (61,4)	96,7 ± 0,8 ^g (62,6)	97,9 ± 0,7 ^e (62,2)
50 mM NaF + 2 mM Asc	140,0 ± 0,1 ^b (88,2)	113,4 ± 0,7 ^{fg} (69)	97,8 ± 0,8 ^e (62,6)	97,7 ± 0,3 ^g (63,2)	101,3 ± 0,8 ^e (64,3)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

Tab. 21. Aktywność fosfatazy kwaśnej w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru

Kombinacja	Fosfataza kwaśna [$\mu\text{g p-NP}\cdot(\text{g}^{-1} \text{s.m. gleby}\cdot\text{h})^{-1}$] (% kontroli)				
	I 1 dzień	II 7 dzień	III 14 dzień	IV 21 dzień	V 28 dzień
Kontrola	103,3 ±0,4 ^a (100)	94,8±0,5 ^a (100)	105,0±0,1 ^a (100)	115,0±0,2 ^a (100)	95,0±0,8 ^a (100)
1 mM Asc	90,3±0,5 ^c (87,4)	82,9±0,2 ^c (87,4)	93,5±0,3 ^e (89)	107,0±0,1 ^c (93)	92,1±0,4 ^c (97)
2 mM Asc	91,5±0,1 ^b (88,6)	84,6±0,4 ^c (89,2)	95,3±0,1 ^c (90,7)	108,1±0,3 ^c (94)	92,2±0,6 ^c (97,1)
25mM NaF	89,0±0,5 ^d (86,1)	78,0±0,5 ^d (82,2)	83,7±0,3 ^c (79,7)	88,7±0,6 ^{def} (77,1)	81,7±0,3 ^e (86)
50 mM NaF	65,6±0,7 ^h (63,5)	73,9±0,7 ^e (77,9)	74,2±0,2 ^f (70,1)	83,1±0,4 ^b (72,2)	78,7±0,6 ^d (82,8)
25 mM NaF + 1 mM Asc	70,8±0,3 ⁱ (68,6)	73,1±0,4 ^e (77,1)	86,3±0,1 ^b (82,2)	90,4±0,5 ^d (78,6)	82,1±0,2 ^e (86,4)
25 mM NaF + 2 mM Asc	71,8±0,4 ⁱ (69,5)	76,8±0,3 ^d (80,9)	68,8±0,6 ^d (65,5)	89,2±0,1 ^{de} (77,5)	84,8±0,1 ^b (89,3)
50 mM NaF + 1 mM Asc	75,5±0,8 ^g (73,1)	61,3±0,1 ^b (64,7)	76,0±0,5 ^f (72,4)	87,2±0,4 ^{ef} (75,8)	80,5±0,3 ^{de} (84,7)
50 mM NaF + 2 mM Asc	80,9±0,7 ^f (78,3)	71,5±0,5 ^f (75,4)	75,5±0,6 ^f (71,9)	86,5±0,5 ^f (75,2)	80,8±0,7 ^{de} (85,1)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.3.6. Aktywność dehydrogenaz w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc

Wpływ wybranych substancji na aktywność dehydrogenaz w glebie przedstawiono w tabeli 22. Najwyższą aktywnością dehydrogenaz w każdym terminie pomiaru charakteryzowała się gleba kontrolna. Dodatek 1 i 2 mM Asc wpłynął na obniżenie aktywności tych enzymów, jednakże podczas wszystkich terminów pomiaru aktywność dehydrogenaz nie spadła poniżej 90% kontroli.

Kombinacje zawierające tylko sole NaF charakteryzowały się spadkiem aktywności dehydrogenaz wraz z terminem pomiaru. Najniższa odnotowana aktywność w III terminie dla kombinacji 25 mM NaF: 80% kontroli. Natomiast dla kombinacji 50 mM NaF w V terminie: 60,1% kontroli.

Dodatek zarówno 1 mM jak i 2 mM kwasu L-askorbinowego do kombinacji z NaF wpłynął na wzrost aktywności dehydrogenaz w porównaniu z aktywnością tego enzymu w kombinacjach tylko z NaF. Wzrost ten nie był gwałtowny i utrzymywał się na poziomie powyżej 80% kontroli w kombinacjach z 25 mM NaF i Asc w każdym terminie pomiaru. Dla kombinacji 50 mM NaF i Asc przez pierwsze dwa terminy pomiaru aktywność dehydrogenaz utrzymywała się na poziomie powyżej 80% następnie od III terminu pomiaru spadła poniżej 80% kontroli.

Tab. 22. Aktywność dehydrogenaz w glebie z dodatkiem 25 i 50 mM NaF oraz 1 i 2 mM Asc w zależności od terminu pomiaru

Kombinacja	Dehydrogenaza [$\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. gleby $\cdot 2\text{h}^{-1}$] (% kontroli)				
	I 1 dzień	II 7 dzień	III 14 dzień	IV 21 dzień	V 28 dzień
Kontrola	31,5 ± 0,5 ^a (100)	35,1 ± 0,6 ^a (100)	36,8 ± 0,5 ^a (100)	30,1 ± 0,2 ^f (100)	32,2 ± 0,6 ^b (100)
1 mM Asc	30,2 ± 0,3 ^c (96)	33,7 ± 0,4 ^a (95,8)	33,7 ± 0,4 ^c (91,6)	29,4 ± 0,5 ^f (97,8)	30,5 ± 0,7 ^{bc} (94,8)
2 mM Asc	29,7 ± 0,4 ^c (94,2)	32,7 ± 0,3 ^a (93)	35,2 ± 0,2 ^b (95,8)	29,7 ± 0,6 ^f (98,7)	29,2 ± 0,8 ^c (90,7)
25 mM NaF	28,6 ± 0,2 ^d (90,7)	28,4 ± 0,1 ^a (80,9)	29,4 ± 0,3 ^d (80)	24,6 ± 0,5 ^e (81,8)	26,5 ± 0,4 ^{ef} (82,3)
50 mM NaF	27,0 ± 0,7 ^f (85,8)	27,4 ± 0,8 ^a (78,2)	24,7 ± 0,8 ^g (67,1)	18,5 ± 0,1 ^a (61,5)	19,4 ± 0,3 ^a (60,1)
25 mM NaF + 1 mM Asc	25,9 ± 0,3 ^b (82,1)	30,5 ± 0,5 ^a (86,7)	32,6 ± 0,6 ^h (88,8)	25,8 ± 0,2 ^b (85,7)	27,0 ± 0,1 ^{ef} (84)
25 mM NaF + 2 mM Asc	26,5 ± 0,2 ^f (84)	30,5 ± 0,3 ^a (86,9)	32,7 ± 0,5 ^h (88,9)	26,7 ± 0,1 ^c (88,7)	26,4 ± 0,3 ^{ef} (82,1)
50 mM NaF + 1 mM Asc	27,7 ± 0,4 ^e (88)	30,3 ± 0,1 ^a (83,3)	27,9 ± 0,9 ^e (75,9)	23,8 ± 0,3 ^e (79,2)	24,8 ± 0,2 ^d (77)
50 mM NaF + 2 mM Asc	28,1 ± 0,1 ^e (89)	30,1 ± 0,7 ^a (85,8)	26,9 ± 0,4 ^f (73,1)	22,1 ± 0,2 ^e (73,6)	24,4 ± 0,4 ^d (75,7)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.3.7. Podsumowanie wyników III etapu badań

Zastosowane stężenia kwasu L-askorbinowego złagodziły stres wywołany 25 i 50 mM NaF w każdym badanym terminie pomiaru u pszenicy jarej odmiany Bryza. Natomiast w glebie zastosowane stężenia kwasu L-askorbinowego wpłynęły na zmniejszenie aktywności badanych enzymów i w niektórych przypadkach pogłębienie stresu wywołanego 25 i 50 mM NaF.

3.4. Etap IV

Ocena efektów łagodzenia stresu wywołanego 50 mM NaF przez zastosowanie 0,5 mM roztworu kwasu Asc wykorzystanego do: moczenia nasion, podlewania i oprysku pszenicy.

3.4.1. Zawartość wolnej proliny w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Wpływ 50 mM NaF na zawartość wolnej proliny w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza w zależności od fazy rozwoju rośliny oraz formy aplikacji 0,5 mM Asc w kolejnych dwóch latach doświadczenia przedstawiono w tabeli 23.

W 2016 roku zawartość proliny w próbach kontrolnych podczas czterech badanych faz rozwojowych wyniosła odpowiednio: 22,73; 40,60; 43,69 oraz 42,79 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. Przy czym podczas pierwszych trzech faz rozwojowych pszenicy najniższą zawartością tego związku cechowały się rośliny z kombinacji 0,5 mM Asc – podlewanie. Zawartość proliny w fazie trzeciego liścia wyniosła 21,93 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ co stanowiło 96,5% kontroli, w fazie krzewienia odpowiednio 80,4% kontroli (32,65 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m) natomiast w fazie kłoszenia: 75,8% kontroli (33,14 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m.).

Spośród wszystkich badanych kombinacji najwyższe zawartości wolnej proliny w liściach pszenicy zaobserwowano u roślin rosnących w glebie z dodatkiem 50 mM NaF. Dla kombinacji tej wzrost zawartości tego aminokwasu zaobserwowano przy wszystkich fazach rozwojowych pszenicy (tab. 23). Zastosowanie 0,5 mM Asc w trzech formach aplikacji wpłynęło na obniżenie ilości wolnej proliny we wszystkich kombinacjach zawierających 50 mM NaF w glebie. Największe obniżenie stężenia wolnej proliny w kombinacjach z 50 mM NaF zaobserwowano w fazie strzelania w źdźbło po zastosowaniu 0,5 mM Asc w formie podlewania (53,55 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. 122,5% kontroli).

Próby kontrolne w roku 2017 charakteryzowały się podobną zawartością wolnej proliny w liściach jak w roku 2016 (tab. 23). Najniższą zawartością proliny w liściach podczas czterech badanych faz rozwojowych charakteryzowała się kombinacja w której zastosowano 0,5 mM Asc w formie podlewania 22,56 (97,3% kontroli); 23,76 (54,9%); 33,69 (76,6%) oraz 43,98 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m (99,5%).

Najwyższe zawartości proliny odnotowano w kombinacjach z 50 mM NaF. Przy czym wartości te były wyższe niż w 2016 roku osiągając już w fazie trzeciego liścia 288%

kontroli. Dodatek 0,5 mM Asc w każdej z trzech zastosowanych form wpłynął na obniżenie zawartości wolnej proliny w roślinach rosnących na glebie zanieczyszczonej 50 mM NaF w każdym terminie pomiaru. Najbardziej efektywnym był w formie podlewania.

Tab. 23. Zawartość wolnej proliny w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Kombinacja	Prolina [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)							
	2016				2017			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	22,73 \pm 0,03 ^c (100)	40,60 \pm 0,03 ^d (100)	43,69 \pm 0,10 ^g (100)	42,79 \pm 0,08 ^c (100)	23,18 \pm 0,04 ^{fg} (100)	43,28 \pm 0,08 ^b (100)	44,01 \pm 0,11 ^f (100)	44,18 \pm 0,03 ^d (100)
0,5 mM Asc - moczenie	33,49 \pm 0,01 ^f (147,3)	38,06 \pm 0,09 ^e (93,7)	45,64 \pm 0,09 ^e (104,7)	43,86 \pm 0,07 ^e (102,5)	23,89 \pm 0,10 ^f (103,1)	33,43 \pm 0,03 ^d (77,2)	43,78 \pm 0,09 ^f (99,5)	44,00 \pm 0,17 ^d (99,6)
0,5 mM Asc - oprysk	33,32 \pm 0,03 ^f (146,6)	43,25 \pm 0,02 ^c (106,52)	43,55 \pm 0,04 ^g (99,7)	44,18 \pm 0,01 ^e (103,2)	32,98 \pm 0,11 ^e (142,3)	33,50 \pm 0,11 ^d (77,4)	43,98 \pm 0,08 ^f (99,9)	44,35 \pm 0,03 ^d (100,4)
0,5 mM Asc - podlewanie	21,93 \pm 0,03 ^d (96,5)	32,65 \pm 0,01 ^f (80,4)	33,14 \pm 0,09 ^f (75,8)	44,15 \pm 0,09 ^e (103,2)	22,56 \pm 0,07 ^g (97,3)	23,76 \pm 0,12 ^c (54,9)	33,69 \pm 0,08 ^e (76,6)	43,98 \pm 0,07 ^d (99,5)
50 mM NaF	55,49 \pm 0,06 ^a (244,1)	64,54 \pm 0,10 ^a (159)	69,18 \pm 0,11 ^b (158,3)	86,37 \pm 0,01 ^a (201,8)	66,78 \pm 0,11 ^a (288,1)	69,45 \pm 0,01 ^a (160,5)	77,67 \pm 0,04 ^a (176,5)	88,92 \pm 0,02 ^a (201,3)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	43,51 \pm 0,01 ^e (191,4)	52,90 \pm 0,03 ^g (130,3)	57,11 \pm 0,01 ^c (130,7)	65,96 \pm 0,11 ^d (154,1)	44,23 \pm 0,10 ^c (190,8)	54,31 \pm 0,10 ^e (125,5)	54,89 \pm 0,02 ^c (124,7)	71,07 \pm 0,07 ^c (160,9)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	53,48 \pm 0,08 ^b (235,3)	63,34 \pm 0,01 ^b (156)	63,43 \pm 0,10 ^a (145,2)	76,33 \pm 0,01 ^b (178,4)	57,57 \pm 0,08 ^b (248,4)	54,05 \pm 0,08 ^e (124,9)	64,12 \pm 0,11 ^b (145,7)	75,67 \pm 0,06 ^b (171,3)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	43,27 \pm 0,01 ^e (190,4)	53,46 \pm 0,17 ^g (131,6)	53,55 \pm 0,03 ^d (122,6)	66,24 \pm 0,11 ^d (154,8)	40,00 \pm 0,01 ^d (172,6)	53,50 \pm 0,07 ^e (123,6)	53,89 \pm 0,07 ^d (122,5)	70,75 \pm 0,06 ^c (160,1)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.2. Synteza średniej zawartości wolnej proliny w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej pszenicy z dwóch lat badań 2016-2017

Rośliny kontrolne charakteryzowały się zawartością wolnej proliny na poziomie od 22,96 (faza trzeciego liścia) do 43,49 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (faza kłoszenia) – Tab. 24. Rośliny z kombinacji Asc-podlewanie charakteryzowały się najniższą zawartością proliny w pierwszych trzech fazach rozwojowych. Wyniosły one odpowiednio: 22,25 (97% kontroli), 28,21 (67,2%) oraz 33,42 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (76,2%).

Najwyższą zawartość proliny wykazały rośliny z kombinacji 50 mM NaF, we wszystkich fazach rozwojowych pszenicy. Dodatek 0,5 mM Asc wpłynął na obniżenie ilości tego aminokwasu w liściach badanych roślin. Największe obniżenie stężenia wolnej proliny w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF zaobserwowano od fazy trzeciego liścia po zastosowaniu 0,5 mM Asc w formie podlewania.

Tab. 24. Synteza średnich zawartości proliny w liściach pszenicy w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Kombinacja	Prolina [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ś.m}$] (% kontroli)			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	22,96 ± 0,04 ^g (100)	41,94 ± 0,06 ^d (100)	43,85 ± 0,11 ^f (100)	43,49 ± 0,06 ^d (100)
0,5 mM Asc - moczenie	28,69 ± 0,06 ^f (125)	35,75 ± 0,06 ^f (85,22)	44,71 ± 0,09 ^e (102)	43,93 ± 0,12 ^d (101)
0,5 mM Asc - oprysk	33,15 ± 0,07 ^e (144,4)	38,38 ± 0,07 ^e (91,5)	43,77 ± 0,06 ^f (99,8)	44,27 ± 0,02 ^d (101,8)
0,5 mM Asc - podlewanie	22,25 ± 0,02 ^h (97)	28,21 ± 0,07 ^g (67,3)	33,42 ± 0,09 ^g (76,2)	44,07 ± 0,08 ^d (101,3)
50 mM NaF	61,14 ± 0,09 ^a (266,3)	67,00 ± 0,10 ^a (160)	73,43 ± 0,08 ^a (167,4)	87,65 ± 0,03 ^a (201,5)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	43,87 ± 0,06 ^c (191,1)	53,61 ± 0,07 ^c (127,8)	56,00 ± 0,02 ^c (127,7)	68,52 ± 0,09 ^c (157,6)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	55,53 ± 0,08 ^b (241,9)	58,70 ± 0,05 ^b (140)	63,78 ± 0,10 ^b (145,4)	76,00 ± 0,04 ^b (174,7)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	41,64 ± 0,01 ^d (181,4)	53,48 ± 0,12 ^c (127,5)	53,72 ± 0,05 ^d (122,5)	68,50 ± 0,09 ^c (157,5)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.3. Zawartość MDA w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Wyniki dwuletnich analiz (2016 i 2017 rok), w których zbadano wpływ 50 mM NaF na zawartość MDA w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza w zależności od fazy rozwoju rośliny oraz formy aplikacji 0,5 mM Asc przedstawiono w tab. 25.

W 2016 roku w fazie trzeciego liścia wartości MDA we wszystkich kombinacjach kształtowały się na podobnym poziomie i wynosiły od 29,81 (kontrola) do 34,25 $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ś.m}$. (50 mM NaF). W późniejszych terminach pomiarowych wartości MDA dla roślin kontrolnych wyniosły: 31,57 (faza krzewienia); 36,88 (faza strzelania

w źdźbło); 68,60 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (faza kłoszenia). W fazie krzewienia, strzelania w źdźbło oraz kłoszenia kombinacje u których zastosowano dwie formy aplikacji 0,5 mM Asc: oprysk oraz podlewanie, cechowały się niższą wartością MDA w porównaniu do kontroli. Wartości te wyniosły odpowiednio dla oprysku: 23,39 (74,1% kontroli) w fazie krzewienia; 32,53 (88,2%) w fazie strzelania w źdźbło; 55,11 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (80,3%) w fazie kłoszenia. Natomiast dla kombinacji 0,5 mM Asc-podlewanie: 22,69 (71,9% kontroli) w fazie krzewienia; 26,88 (72,9%) w fazie strzelania w źdźbło; 48,23 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (70,3%) w fazie kłoszenia.

Najwyższe zawartości MDA stwierdzono u roślin rosnących z dodatkiem 50 mM NaF. W tej kombinacji począwszy, od fazy krzewienia, stwierdzono wzrost zawartości MDA w liściach pszenicy. Zawartość wyniosła odpowiednio: 58,44 (185,1% kontroli); 64,25 (174,2%); 81,24 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (118,42% kontroli). Po zastosowaniu 0,5 mM Asc we wszystkich trzech formach aplikacji, począwszy od fazy krzewienia, stwierdzono niższe średnie wartości MDA. Wykazano, że forma aplikacji 0,5 mM Asc-oprysk najbardziej efektywnie obniżyła zawartość MDA w liściach pszenicy.

W przeciwieństwie do 2016 roku w 2017 roku, od fazy trzeciego liścia zaobserwowano, wyraźne różnice w zawartości MDA w liściach pszenicy w poszczególnych kombinacjach. Ilość MDA w kontroli wyniosła 33,61 (faza trzeciego liścia); 27,65 (faza krzewienia); 34,82 (faza strzelania w źdźbło) oraz 58,23 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (faza kłoszenia). U kombinacji 0,5 mM Asc-podlewanie wykazano najniższą zawartość MDA w liściach pszenicy w każdej z obserwowanych faz rozwojowych spośród wszystkich badanych kombinacji (tab. 25).

W 2017 roku podobnie jak w 2016, w kombinacji 50 mM NaF nastąpił gwałtowny wzrost zawartości MDA w liściach pszenicy począwszy od fazy krzewienia. W fazie kłoszenia stwierdzono wyższą wartość niż w 2016 roku. Zastosowanie 0,5 mM Asc w formie podlewania najbardziej efektywnie obniżyło zawartość MDA.

Tab. 25. Zawartość MDA w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Kombinacja	MDA [nmol·g ⁻¹ ś.m] (% kontroli)							
	2016				2017			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	29,81 ± 0,13 ^b (100)	31,57 ± 0,09 ^d (100)	36,88 ± 0,05 ^d (100)	68,60 ± 0,08 ^e (100)	33,61 ± 0,09 ^f (100)	27,65 ± 0,06 ^c (100)	34,82 ± 0,07 ^f (100)	58,23 ± 0,12 ^e (100)
0,5 mM Asc - moczenie	29,30 ± 0,02 ^b (98,3)	35,11 ± 0,08 ^c (111,2)	38,44 ± 0,01 ^c (104,2)	68,28 ± 0,11 ^e (99,5)	25,64 ± 0,10 ^d (76,3)	30,11 ± 0,19 ^f (108,9)	32,46 ± 0,12 ^g (93,2)	62,12 ± 0,06 ^g (106,7)
0,5 mM Asc - oprysk	32,20 ± 0,17 ^a (108)	23,39 ± 0,10 ^f (74,1)	32,53 ± 0,04 ^e (88,2)	55,11 ± 0,10 ^a (80,3)	35,76 ± 0,10 ^e (106,4)	29,17 ± 0,01 ^f (105,5)	36,78 ± 0,09 ^e (105,6)	61,12 ± 0,10 ^g (105)
0,5 mM Asc - podlewanie	32,63 ± 0,10 ^a (109,4)	22,69 ± 0,08 ^f (71,9)	26,88 ± 0,01 ^f (72,9)	48,23 ± 0,04 ^b (70,3)	28,54 ± 0,05 ^b (84,9)	19,51 ± 0,07 ^d (70,6)	31,76 ± 0,03 ^h (91,2)	52,11 ± 0,12 ^f (89,5)
50 mM NaF	34,25 ± 0,09 ^d (141,3)	58,44 ± 0,11 ^a (185,1)	64,25 ± 0,13 ^a (174,2)	81,24 ± 0,03 ^c (118,42)	38,43 ± 0,12 ^a (114,3)	63,12 ± 0,02 ^a (228,3)	71,17 ± 0,17 ^a (204,4)	88,97 ± 0,10 ^a (152,8)
50 mM NaF+ 0,5 mM Asc - moczenie	33,55 ± 0,10 ^{cd} (112,5)	40,54 ± 0,22 ^b (128,4)	48,49 ± 0,18 ^g (131,5)	82,26 ± 0,12 ^c (119,9)	36,13 ± 0,08 ^e (107,5)	42,12 ± 0,12 ^b (152,3)	51,54 ± 0,09 ^b (148)	78,34 ± 0,06 ^b (134,5)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	34,19 ± 0,04 ^d (114,6)	42,15 ± 0,10 ^e (133,5)	46,13 ± 0,03 ^b (125,08)	75,25 ± 0,05 ^d (109,7)	34,34 ± 0,02 ^f (102,2)	38,98 ± 0,04 ^e (141)	49,87 ± 0,03 ^c (143,2)	72,23 ± 0,02 ^c (124)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	33,33 ± 0,08 ^{cd} (111,8)	42,42 ± 0,10 ^e (134,3)	48,98 ± 0,14 ^g (132,8)	75,48 ± 0,09 ^d (110)	27,67 ± 0,03 ^c (82,3)	39,23 ± 0,09 ^e (141,9)	45,76 ± 0,07 ^d (131,4)	70,34 ± 0,10 ^d (120,8)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy p<0,05

3.4.4. Synteza średniej zawartości MDA w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Zawartość MDA w kontroli (tab. 26) wyniosła odpowiednio: 31,71 (faza trzeciego liścia); 29,61 (faza krzewienia); 35,85 (faza strzelania w źdźbło) oraz 63,42 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m (faza kłoszenia).

Najniższą zawartością MDA w liściach pszenicy spośród wszystkich kombinacji, w badanych fazach rozwojowych, charakteryzowała się kombinacja 0,5 mM Asc-podlewanie: 30,59 (96,5% kontroli); 21,10 (71,3%); 29,32 (81,8%) oraz 50,17 (79,1%).

Najwyższą zawartością MDA charakteryzowały się rośliny badane w kombinacji z 50 mM NaF we wszystkich fazach rozwojowych. Dodatek 0,5 mM Asc wpłynął na obniżenie MDA w każdej fazie rozwojowej pszenicy. Forma aplikacji 0,5 mM Asc-podlewanie w fazie strzelania w źdźbło oraz kłoszenia najbardziej efektywnie obniżyła zawartość MDA w liściach pszenicy.

Tab. 26. Synteza średnich wyników zawartości MDA w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Kombinacja	MDA [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m] (% kontroli)			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	31,71 \pm 0,11 ^{de} (100)	29,61 \pm 0,07 ^e (100)	35,85 \pm 0,06 ^{de} (100)	63,42 \pm 0,10 ^b (100)
0,5 mM Asc - moczenie	27,47 \pm 0,06 ^c (86,6)	32,61 \pm 0,14 ^{de} (110,1)	35,45 \pm 0,07 ^{de} (98,9)	65,20 \pm 0,09 ^b (102,8)
0,5 mM Asc - oprysk	33,98 \pm 0,14 ^{cd} (107,2)	26,28 \pm 0,06 ^c (88,8)	34,65 \pm 0,07 ^{cd} (96,7)	58,15 \pm 0,10 ^b (91,6)
0,5 mM Asc - podlewanie	30,59 \pm 0,08 ^{de} (96,5)	21,10 \pm 0,08 ^f (71,3)	29,32 \pm 0,02 ^e (81,8)	50,17 \pm 0,08 ^{cd} (79,1)
50 mM NaF	36,34 \pm 0,10 ^{de} (114,6)	60,78 \pm 0,07 ^b (205,3)	67,71 \pm 0,15 ^b (188,9)	85,10 \pm 0,07 ^a (134,2)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	34,84 \pm 0,09 ^{de} (109,9)	41,33 \pm 0,17 ^d (139,6)	50,02 \pm 0,14 ^c (139,5)	80,30 \pm 0,09 ^a (126,6)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	34,27 \pm 0,03 ^{cd} (108,1)	40,57 \pm 0,07 ^c (137)	48,00 \pm 0,03 ^c (133,9)	73,74 \pm 0,04 ^{bc} (116,3)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	30,50 \pm 0,06 ^{de} (96,2)	40,82 \pm 0,10 ^{cd} (137,9)	47,37 \pm 0,11 ^{cd} (132,1)	72,91 \pm 0,1 ^c (115)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.5. Zawartość chlorofilu a w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Wyniki dotyczące oceny wpływu 50 mM NaF na zawartość chlorofilu a w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza w zależności od fazy rozwoju rośliny oraz formy aplikacji kwasu askorbinowego, w kolejnych dwóch latach doświadczenia przedstawiono w tabeli 27.

W 20176 roku we wszystkich fazach rozwojowych pszenicy najwyższą zawartości chlorofilu a stwierdzono w próbach kontrolnych. Wartości te wyniosły odpowiednio: 233,43; 310,60; 345,04; 336,42 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Zastosowanie kwasu L-askorbinowego w każdej z trzech form nie wpłynęło na wzrost zawartości chlorofilu a w liściach pszenicy w porównaniu z kontrolą. W fazie trzeciego liścia wartości te kształtowały się na poziomie 84,4% kontroli (moczenie nasion), 85,4% (oprysk) oraz 85,7% (podlewanie). W kolejnych terminach pomiaru zawartość chlorofilu a wzrosła powyżej 90% kontroli dla wszystkich trzech form aplikacji. Najwyższe zawartości chlorofilu a dla kombinacji tylko z 0,5 mM Asc zaobserwowano w fazie kłoszenia dla kombinacji 0,5 mM Asc - oprysk (99,4% kontroli) oraz 0,5 mM Asc - podlewanie (98,9%).

Najniższe stężenie chlorofilu a stwierdzono u roślin z kombinacji rosnącej z 50 mM NaF przez wszystkie fazy rozwojowe pszenicy. Przy czym począwszy od fazy krzewienia zaobserwowano wzrost zawartości chlorofilu a w liściach, do poziomu 212,79 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (68,5% kontroli). Następnie od fazy strzelania w źdźbło ponownie nastąpił jego spadek w porównaniu z kontrolą (do 218,55 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - 63,3% kontroli) osiągając w fazie kłoszenia 216,78 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (64,4% kontroli). Po zastosowaniu 0,5 mM Asc w formie moczenia nasion zaobserwowano znaczący wzrost stężenia chlorofilu a w fazie trzeciego liścia (167,45 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - 71,7 % kontroli). Dwie pozostałe formy aplikacji 0,5 mM Asc wpłynęły mniej efektywnie na wzrost chlorofilu a w tej fazie rozwojowej. Dla oprysku stwierdzono 128,12 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (54,9% kontroli); dla podlewania 124,72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (53,4% kontroli). Od fazy strzelania w źdźbło wszystkie trzy formy aplikacji 0,5 mM Asc wpłynęły istotnie na wzrost zawartości chlorofilu a w liściach pszenicy. Najwyższe wartości charakteryzowały kombinację 50 mM NaF + 0,5 mM Asc podlewanie.

W 2017 roku u kontroli w czterech fazach rozwojowych stwierdzono następujące zawartości chlorofilu a: 252,34; 289,67; 327,56; 337,91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. W fazie trzeciego liścia w roślinach, w których zastosowano 0,5 mM Asc podobnie jak w 2016 roku była niższa

od roślin z kombinacji kontrolnej. W fazie krzewienia zaobserwowano wzrost ilości tej substancji we wszystkich kombinacjach tylko z Asc. Najwyższą zawartością chlorofilu a charakteryzowały się rośliny z kombinacji 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie ($321,68 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - 111,1% kontroli). W fazie strzelania w źdźbło oraz kłoszenia kombinacje tylko z Asc charakteryzowały się najwyższą zawartością chlorofilu a osiągając wartości powyżej 100% kontroli.

Podobnie jak w 2016 roku najniższą zawartością chlorofilu a w liściach pszenicy charakteryzowały się rośliny z kombinacji 50 mM NaF. Najniższą jego zawartość stwierdzono podczas fazy trzeciego liścia ($115,12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - 45,7% kontroli). Podczas kolejnych pomiarów zaobserwowano wzrost zawartości chlorofilu a osiągając najwyższą wartość w fazie kłoszenia ($257,88 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - 76,3% kontroli). Po zastosowaniu wszystkich trzech form aplikacji 0,5 mM Asc z 50 mM NaF zaobserwowano wzrost zawartości chlorofilu a w liściach począwszy od fazy trzeciego liścia. Najwyższą zawartością chlorofilu a w tej fazie charakteryzowała się kombinacja 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie ($206,61 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 81,9% kontroli). W fazie krzewienia kombinacja 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk zawartość chlorofilu a wyniosła 268,21 (92,6% kontroli). Natomiast w fazie strzelania w źdźbło dwie kombinacje: 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk ($310,71 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 94% kontroli) oraz 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie ($324,63 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - 93%). W fazie kłoszenia wszystkie formy aplikacji 0,5 mM Asc wpłynęły na wzrost zawartości chlorofilu a liściach pszenicy rosnącej w glebie z 50 mM NaF. Wzrost ten wyniósł od 88,8% kontroli (50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie i 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk) do 92% (50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie).

Tab. 27. Zawartość chlorofilu a w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Kombinacja	Chlorofil a [$\mu\text{g chl a} \cdot \text{g}^{-1} \text{ś.m.}$]							
	2016				2017			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza Kłoszenia	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	233,43 \pm 0,03 ^a (100)	310,60 \pm 0,04 ^a (100)	345,04 \pm 0,03 ^a (100)	336,42 \pm 0,06 ^a (100)	252,34 \pm 0,21 ^a (10)	289,67 \pm 0,03 ^b (100)	327,56 \pm 0,14 ^b (100)	337,91 \pm 0,09 ^b (100)
0,5 mM Asc - moczenie	197,02 \pm 0,07 ^c (84,4)	297,12 \pm 0,03 ^c (95,7)	318,76 \pm 0,03 ^c (92,4)	321,51 \pm 0,07 ^b (95,6)	210,71 \pm 0,12 ^g (83,5)	267,89 \pm 0,12 ^g (92,5)	345,26 \pm 0,17 ^g (105,4)	360,78 \pm 0,04 ^e (106,7)
0,5 mM Asc - oprysk	199,44 \pm 0,11 ^b (85,4)	299,10 \pm 0,04 ^b (96,3)	313,78 \pm 0,12 ^d (90,9)	334,31 \pm 0,19 ^e (99,4)	201,31 \pm 0,20 ^c (79,8)	278,91 \pm 0,17 ^c (96,3)	356,76 \pm 0,21 ^a (108,9)	341,89 \pm 0,08 ^a (101)
0,5 mM Asc - podlewanie	200,06 \pm 0,13 ^b (85,7)	290,11 \pm 0,08 ^d (93,4)	320,55 \pm 0,08 ^b (92,9)	332,77 \pm 0,18 ^e (98,9)	210,75 \pm 0,11 ^g (83,5)	321,68 \pm 0,03 ^a (111)	345,71 \pm 0,11 ^g (105,5)	360,81 \pm 0,04 ^e (106,8)
50 mM NaF	112,01 \pm 0,04 ^g (48)	212,79 \pm 0,02 ^f (68,5)	218,55 \pm 0,01 ^h (63,3)	216,78 \pm 0,10 ^d (64,4)	115,21 \pm 0,03 ^f (45,6)	160,32 \pm 0,11 ^f (55,3)	201,87 \pm 0,11 ^f (61,6)	257,89 \pm 0,02 ^e (76,3)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	167,45 \pm 0,02 ^d (71,7)	231,99 \pm 0,01 ^e (74,7)	300,23 \pm 0,02 ^f (87)	300,55 \pm 0,12 ^f (89,3)	181,87 \pm 0,11 ^d (72,1)	246,89 \pm 0,12 ^e (85,2)	269,91 \pm 0,10 ^e (82,4)	310,98 \pm 0,01 ^c (92)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	128,12 \pm 0,21 ^e (54,9)	260,25 \pm 0,13 ^g (83,8)	278,95 \pm 0,12 ^g (80,8)	299,72 \pm 0,09 ^f (89,1)	160,81 \pm 0,11 ^e (63,7)	268,21 \pm 0,14 ^g (92,3)	310,71 \pm 0,04 ^c (94)	300,91 \pm 0,13 ^f (88,8)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	124,72 \pm 0,03 ^f (53,4)	260,12 \pm 0,06 ^g (83,7)	302,11 \pm 0,12 ^e (87,5)	304,12 \pm 0,12 ^c (90,1)	206,61 \pm 0,02 ^b (81,8)	251,71 \pm 0,13 ^d (86,9)	324,63 \pm 0,08 ^b (93)	299,91 \pm 0,01 ^f (88,8)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.6. Synteza średnich zawartości chlorofilu a w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Najwyższą zawartością chlorofilu a odpowiednio w fazie trzeciego liścia, strzelania w źdźbło oraz kłoszenia charakteryzowała się kombinacja kontrolna (242,89; 336,87; 349,77 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

W fazie krzewienia najwyższą zawartość chlorofilu a stwierdzono w liściach pszenicy z kombinacji 0,5 mM Asc - podlewanie (305,90 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 101,9% kontroli).

Najniższą zawartością chlorofilu a we wszystkich terminach charakteryzowała się kombinacja 50 mM NaF. 0,5 mM Asc zastosowany we wszystkich trzech formach razem z 50 mM NaF wpłynął na zwiększenie zawartości chlorofilu a w liściach pszenicy. Przy czym 0,5 mM Asc w formie moczenia nasion dwukrotnie zwiększył zawartość chlorofilu a odpowiednio: w fazie trzeciego liścia oraz kłoszenia (tab. 28).

Tab. 28. Synteza średnich wyników zawartości chlorofilu a w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Kombinacja	Chlorofil a [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m.]			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	242,88 \pm 0,12 ^a (100)	300,13 \pm 0,04 ^b (100)	336,31 \pm 0,09 ^a (100)	337,16 \pm 0,10 ^a (100)
0,5 mM Asc - moczenie	176,86 \pm 0,10 ^d (78,8)	282,50 \pm 0,08 ^d (94)	332,01 \pm 0,10 ^a (98,7)	336,14 \pm 0,06 ^a (99,7)
0,5 mM Asc - oprysk	146,37 \pm 0,16 ^f (60,3)	284,00 \pm 0,11 ^c (95,6)	335,27 \pm 0,17 ^a (99,6)	308,11 \pm 0,14 ^b (91,4)
0,5 mM Asc - podlewanie	177,90 \pm 0,12 ^c (73,2)	305,89 \pm 0,06 ^a (101,9)	317,13 \pm 0,12 ^b (94,3)	336,79 \pm 0,11 ^a (99,9)
50 mM NaF	118,11 \pm 0,04 ^h (48,6)	196,55 \pm 0,07 ^h (65,5)	245,21 \pm 0,07 ^f (72,9)	272,33 \pm 0,06 ^f (80,8)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	184,66 \pm 0,07 ^b (76)	239,44 \pm 0,07 ^g (79,8)	285,07 \pm 0,06 ^e (84,8)	305,76 \pm 0,07 ^c (90,7)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	144,46 \pm 0,16 ^g (59,5)	269,23 \pm 0,14 ^e (89,7)	304,83 \pm 0,08 ^d (90,6)	299,86 \pm 0,11 ^e (88,9)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	165,66 \pm 0,20 ^e (68,2)	255,91 \pm 0,15 ^f (85,3)	313,37 \pm 0,10 ^c (93,2)	302,02 \pm 0,07 ^d (89,6)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.7. Zawartość chlorofilu b w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Zastosowanie 0,5 mM Asc w każdej z trzech form aplikacji w fazie trzeciego liścia wpłynęło na wzrost zawartości chlorofilu b w liściach pszenicy (tab. 29) osiągając 106,8 % kontroli (moczenie); 110,7% (oprysk) oraz 103,7% (podlewanie). W fazie krzewienia najwyższą zawartością chlorofilu b charakteryzowała się kombinacja 0,5 mM Asc -podlewanie (47,18 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 123,8% kontroli). Była to najwyższa stwierdzona zawartość tego związku ze wszystkich terminów pomiarów. W fazie strzelania w źdźbło oraz kłoszenia zawartość chlorofilu b wyniosła od 94,7% kontroli (0,5 mM Asc - moczenie faza strzelania w źdźbło) do 105,5 % (0,5 mM Asc - oprysk, faza kłoszenia). Najniższą zawartością chlorofilu b w każdej fazie rozwojowej charakteryzowały się rośliny z kombinacji 50 mM NaF odpowiednio: 14,41 (34,8% kontroli); 13,85 (36,3%); 13,59 (34%); 18,33 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (47%). Wszystkie formy aplikacji kwasu L-askorbinowego wpłynęły na wzrost zawartości chlorofilu b w liściach pszenicy. Najwyższy wzrost jego zawartości zaobserwowano: w fazie trzeciego liścia - 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie (69,7% kontroli), fazie strzelania w źdźbło - 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk w (68,9% kontroli) oraz - podlewanie (74,2% kontroli).

W 2017 zawartość chlorofilu b w liściach pszenicy w kombinacji kontrolnej wyniosła odpowiednio: 38,97; 41,76; 41,89; oraz 40,31 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. W kombinacjach zawierających tylko 0,5 mM Asc jedynie w kombinacji 0,5 mM Asc -moczenie w fazie krzewienia i strzelania w źdźbło wykazano wartości niższe niż w kombinacji kontrolnej (95,3% i 97,8% kontroli) oraz w fazie kłoszenia dla kombinacji 0,5 Asc - podlewanie (99,8% kontroli). W fazie trzeciego liścia kombinacja 0,5 Asc - oprysk charakteryzowała się najwyższą zawartością chlorofilu b w liściach (120,6% kontroli) w porównaniu z innymi kombinacjami. W pozostałych fazach rozwojowych zawartość chlorofilu b była na poziomie 109% kontroli. Podobnie jak w 2016 roku najniższą zawartością chlorofilu b we wszystkich fazach rozwojowych charakteryzowały się rośliny rosnące w glebie z 50 mM NaF: 10,43 (26,8%); 15,98 (38,3%); 13,21 (31,5%); 16,89 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (41,9%). 0,5 mM Asc we wszystkich trzech formach wpłynęło na zwiększenie zawartości chlorofilu b w liściach roślin rosnących w glebie z dodatkiem soli NaF. Największy wzrost zawartości chlorofilu b w liściach pszenicy rosnącej w glebie z NaF zaobserwowano w kombinacji 50 mM NaF + Asc - oprysk odpowiednio: w fazie krzewienia 29,71 (71,1%), w fazie strzelania w źdźbło 26,12 (62,4%) oraz w fazie kłoszenia 23,78 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (59% kontroli).

Tab. 29. Zawartość chlorofilu b w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Kombinacja	Chlorofil b [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)							
	2016				2017			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	41,42 ± 0,08 ^d (100)	38,12 ± 0,09 ^c (100)	39,93 ± 0,01 ^b (100)	39,04 ± 0,14 ^b (100)	38,97 ± 0,07 ^d (100)	41,76 ± 0,11 ^b (100)	41,89 ± 0,08 ^c (100)	40,31 ± 0,11 ^b (100)
0,5 mM Asc - moczenie	44,26 ± 0,11 ^b (106,8)	35,84 ± 0,15 ^d (94)	37,80 ± 0,07 ^g (94,7)	35,35 ± 0,16 ^b (90,6)	41,76 ± 0,11 ^c (107,2)	39,81 ± 0,08 ^b (95,3)	40,97 ± 0,02 ^b (97,8)	40,78 ± 0,08 ^b (101,2)
0,5 mM Asc - oprysk	45,84 ± 0,11 ^a (110,7)	39,64 ± 0,07 ^b (103,9)	37,60 ± 0,20 ^g (94,2)	41,19 ± 0,01 ^a (105,5)	46,98 ± 0,12 ^a (120,6)	45,82 ± 0,09 ^a (109,7)	45,68 ± 0,04 ^a (109)	44,21 ± 0,16 ^a (109,7)
0,5 mM Asc - podlewanie	42,96 ± 0,20 ^c (103,7)	47,18 ± 0,11 ^a (123,8)	41,53 ± 0,02 ^a (104)	39,13 ± 0,11 ^b (100,2)	44,87 ± 0,02 ^b (115,1)	46,23 ± 0,24 ^a (110,7)	41,89 ± 0,04 ^c (100)	40,21 ± 0,04 ^b (99,8)
50 mM NaF	14,41 ± 0,04 ^h (34,8)	13,85 ± 0,12 ^h (36,3)	13,59 ± 0,12 ^f (34)	18,33 ± 0,11 ^e (47)	10,43 ± 0,12 ^h (26,8)	15,98 ± 0,11 ^f (38,3)	13,21 ± 0,15 ^g (31,5)	16,89 ± 0,23 ^c (41,9)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	28,86 ± 0,12 ^e (69,7)	22,39 ± 0,21 ^g (58,7)	22,06 ± 0,09 ^e (55,2)	24,87 ± 0,15 ^d (63,7)	17,59 ± 0,04 ^g (45,1)	21,21 ± 0,04 ^e (50,8)	20,32 ± 0,04 ^f (48,5)	20,12 ± 0,14 ^d (49,9)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	17,66 ± 0,08 ^f (42,6)	24,90 ± 0,12 ^e (65,3)	27,50 ± 0,05 ^c (68,9)	24,66 ± 0,08 ^d (63,2)	21,32 ± 0,10 ^f (54,7)	29,71 ± 0,02 ^c (71,1)	26,12 ± 0,12 ^d (62,3)	23,78 ± 0,09 ^c (59)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	16,17 ± 0,08 ^g (39)	23,92 ± 0,09 ^f (62,7)	24,73 ± 0,17 ^d (61,9)	28,95 ± 0,04 ^c (74,2)	25,79 ± 0,08 ^e (66,2)	27,89 ± 0,04 ^d (66,8)	23,67 ± 0,01 ^e (56,5)	21,29 ± 0,16 ^d (52,8)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.8. Synteza średnich wyników zawartości chlorofilu b w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Zastosowanie 0,5 mM Asc w różnych formach aplikacji wpłynęło na wzrost zawartości chlorofilu b w liściach pszenicy (tab. 30). Kombinacje 0,5 mM Asc - oprysk oraz 0,5 mM Asc- podlewanie charakteryzowały się najwyższą zawartością chlorofilu b spośród wszystkich badanych kombinacji podczas czterech badanych faz rozwojowych pszenicy.

Natomiast najniższą zawartością chlorofilu b pośród wszystkich kombinacji charakteryzowały się rośliny rosnące w glebie z 50 mM NaF. Zastosowanie 0,5 mM Asc wpłynęło na wzrost zawartości chlorofilu b w roślinach rosnących w glebie z dodatkiem soli NaF. Najwyższy wzrost stężenia chlorofilu b wykazano w fazie krzewienia oraz strzelania w źdźbło w kombinacji 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk.

Tab. 30. Synteza średnich wyników zawartości chlorofilu b w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Kombinacja	Chlorofil b [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	40,19 ± 0,08 ^c (100)	39,94 ± 0,10 ^c (100)	40,91 ± 0,05 ^a (100)	39,68 ± 0,13 ^b (100)
0,5 mM Asc - moczenie	43,01 ± 0,11 ^b (107)	37,82 ± 0,12 ^d (94,7)	39,38 ± 0,05 ^b (96,3)	38,06 ± 0,12 ^c (95,9)
0,5 mM Asc - oprysk	46,41 ± 0,12 ^a (115,5)	42,73 ± 0,08 ^b (107)	41,64 ± 0,12 ^a (101,8)	42,70 ± 0,09 ^a (107,6)
0,5 mM Asc - podlewanie	43,91 ± 0,11 ^b (109,2)	46,70 ± 0,17 ^a (116,9)	41,71 ± 0,03 ^a (101,9)	39,67 ± 0,08 ^b (99,9)
50 mM NaF	12,42 ± 0,08 ^g (30,9)	14,91 ± 0,16 ^h (37,3)	13,4 ± 0,14 ^e (32,6)	17,61 ± 0,17 ^f (44,4)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	23,22 ± 0,08 ^d (57,8)	21,80 ± 0,13 ^g (54,6)	21,19 ± 0,07 ^d (51,8)	22,49 ± 0,15 ^e (56,7)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	19,49 ± 0,09 ^f (48,5)	27,30 ± 0,07 ^e (68,4)	26,81 ± 0,09 ^b (65,5)	24,22 ± 0,09 ^d (61)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	20,98 ± 0,08 ^e (52,2)	25,90 ± 0,07 ^f (64,9)	24,20 ± 0,09 ^c (59,2)	25,12 ± 0,10 ^d (63,3)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.9. Zawartość karotenoidów w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

W 2016 próby kontrolne charakteryzowała zawartość karotenoidów odpowiednio na poziomie: 24,56; 38,39; 40,73; 37,33 oraz 26,78 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (tab. 31).

Zastosowanie 0,5 mM Asc w każdej z trzech form aplikacji w fazie trzeciego liścia wpłynęło na wzrost zawartości karotenoidów w liściach. Najwyższą zawartością karotenoidów charakteryzowała się kombinacja 0,5 mM Asc - podlewanie (31,45 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - 128% kontroli). Kombinacje z 0,5 mM Asc pod względem średniej zawartości karotenoidów charakteryzowały się wyższymi niż wartości u kontroli.

Najniższą zawartością karotenoidów stwierdzono u roślin rosnących z dodatkiem 50 mM NaF.

Dodatek 0,5 mM Asc w każdej formie aplikacji wpłynął na wzrost zawartości tych związków w liściach pszenicy. Najbardziej efektywnie zastosowanie 0,5 mM Asc w formie oprysku i podlewania.

Wartości karotenoidów 2017 roku podobnie jak w 2016 roku różniły się w zależności od fazy rozwojowej pszenicy. Dla kombinacji kontrolnej zawartość karotenoidów wyniosła odpowiednio: 26,78; 37,91; 41,25 oraz 43 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Kombinacja 0,5 mM Asc – oprysk charakteryzowała się we wszystkich fazach rozwojowych wyższą zawartością karotenoidów w porównaniu z kontrolą odpowiednio: 31,98 (119,4%); 38,72 (102,1%); 45,95 (111,3%); 44,32 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (101%). Natomiast 0,5 mM Asc - podlewanie w fazie trzeciego liścia charakteryzowała się najwyższą zawartością karotenoidów w liściach pszenicy spośród wszystkich badanych kombinacji (33,28 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 124,3% kontroli). Najniższe zawartości karotenoidów stwierdzono w roślinach z kombinacji 50 mM. Najbardziej istotnie na wzrost zawartości tych związków wpłynęły dwie formy Asc: 50 mM + 0,5 mM Asc - oprysk oraz 50 mM + 0,5 mM Asc - podlewanie.

Tab. 31. Zawartość karotenoidów w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM kwasu askorbinowego oraz terminu pomiaru fazy rozwojowej

Kombinacja	Karotenoidy [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)							
	2016				2017			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza Kłoszenia	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	24,56 ± 0,05 ^c (100)	38,39 ± 0,16 ^b (100)	40,73 ± 0,15 ^a (100)	37,33 ± 0,04 ^b (100)	26,78 ± 0,09 ^b (100)	37,91 ± 0,19 ^c (100)	41,25 ± 0,01 ^d (100)	43,87 ± 0,11 ^b (100)
0,5 mM Asc - moczenie	26,71 ± 0,01 ^b (108,8)	42,27 ± 0,12 ^a (110,1)	38,86 ± 0,08 ^c (95,4)	38,67 ± 0,08 ^b (103,6)	31,45 ± 0,01 ^a (117,4)	47,87 ± 0,12 ^a (126,3)	44,56 ± 0,06 ^b (108)	43,12 ± 0,12 ^b (98,3)
0,5 mM Asc - oprysk	26,03 ± 0,11 ^b (106)	40,76 ± 0,02 ^b (106,2)	39,02 ± 0,04 ^b (95,8)	40,44 ± 0,09 ^a (108,3)	31,98 ± 0,08 ^a (119,4)	38,72 ± 0,04 ^c (102,1)	45,95 ± 0,19 ^a (111,3)	44,32 ± 0,08 ^a (101)
0,5 mM Asc - podlewanie	31,45 ± 0,11 ^a (128)	42,02 ± 0,01 ^a (109,5)	39,53 ± 0,21 ^b (97)	40,90 ± 0,05 ^a (109,6)	33,28 ± 0,01 ^a (124,3)	41,27 ± 0,08 ^b (108,9)	42,35 ± 0,01 ^c (102,7)	39,78 ± 0,19 ^b (90,7)
50 mM NaF	13,90 ± 0,11 ^f (56,6)	10,25 ± 0,21 ^f (26,7)	18,12 ± 0,04 ^f (44,5)	17,93 ± 0,09 ^f (48)	10,67 ± 0,06 ^f (39,8)	17,17 ± 0,11 ^f (45,3)	15,89 ± 0,04 ^h (38,5)	12,21 ± 0,01 ^e (27,8)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	22,53 ± 0,12 ^c (91,7)	21,05 ± 0,23 ^e (54,8)	20,00 ± 0,05 ^e (49,1)	21,56 ± 0,16 ^e (57,7)	19,87 ± 0,10 ^e (74,2)	26,78 ± 0,09 ^e (70,6)	17,21 ± 0,12 ^g (41,7)	20,12 ± 0,09 ^d (45,9)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	17,75 ± 0,11 ^d (72,3)	29,40 ± 0,13 ^c (76,6)	28,00 ± 0,05 ^d (68,7)	30,70 ± 0,02 ^c (82,2)	23,14 ± 0,12 ^c (86,4)	28,15 ± 0,21 ^d (74,3)	21,12 ± 0,02 ^f (51,2)	30,17 ± 0,03 ^c (68,8)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	16,78 ± 0,02 ^e (68,3)	26,64 ± 0,10 ^d (69,4)	27,81 ± 0,06 ^d (68,3)	29,21 ± 0,03 ^d (78,2)	22,23 ± 0,12 ^d (83)	30,31 ± 0,01 ^d (79,9)	32,36 ± 0,02 ^e (78,4)	31,21 ± 0,16 ^c (71,1)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.10. Synteza średnich wyników zawartości karotenoidów w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Wartości dla roślin kontrolnych kształtowały się na poziomie: 25,67; 38,15; 40,99 oraz 40,61 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (tab. 32). We wszystkie terminach pomiarów kombinacja 0,5 mM Asc - moczenie charakteryzowała się najwyższą zawartością karotenoidów w liściach wyniosła odpowiednio: 29,08 (113,3% kontroli; 45,07 (118,1%); 41,71; (101,7%) oraz 40,89 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (100,7%).

Najniższe zawartości karotenoidów stwierdzono w kombinacji 50 mM NaF przez wszystkie cztery fazy rozwojowe pszenicy. Zastosowanie 0,5 mM Asc w formie oprysku oraz podlewania wpłynęło najbardziej efektywnie na wzrost zawartości karotenoidów w liściach pszenicy. Znaczący wzrost ich stężenia zaobserwowano już od fazy krzewienia pszenicy.

Tab. 32. Synteza średnich wyników z dwóch lat badań 2016-2017 zawartości karotenoidów w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Kombinacja	Karotenoidy [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	25,67 ± 0,07 ^c (100)	38,15 ± 0,18 ^d (100)	40,99 ± 0,08 ^a (100)	40,61 ± 0,08 ^{bc} (100)
0,5 mM Asc - moczenie	29,08 ± 0,01 ^b (113,3)	45,07 ± 0,12 ^a (118,1)	41,71 ± 0,07 ^a (101,7)	40,89 ± 0,10 ^{bc} (100,7)
0,5 mM Asc - oprysk	29,00 ± 0,10 ^b (113)	39,74 ± 0,03 ^c (104,2)	42,48 ± 0,12 ^a (103,6)	42,38 ± 0,09 ^a (104,4)
0,5 mM Asc - podlewanie	32,36 ± 0,06 ^a (126,1)	41,64 ± 0,05 ^b (109,2)	40,94 ± 0,11 ^a (99,9)	40,34 ± 0,12 ^{bc} (99,4)
50 mM NaF	12,28 ± 0,10 ^f (47,9)	13,71 ± 0,16 ^g (35,9)	17,01 ± 0,04 ^e (41,5)	15,07 ± 0,05 ^f (31,1)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	21,20 ± 0,11 ^d (82,6)	23,91 ± 0,16 ^f (62,7)	18,60 ± 0,09 ^d (45,3)	20,84 ± 0,13 ^e (51,3)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	20,44 ± 0,12 ^{de} (79,6)	28,77 ± 0,17 ^e (75,4)	24,56 ± 0,04 ^c (60)	30,43 ± 0,3 ^d (75)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	19,50 ± 0,07 ^e (76)	28,47 ± 0,06 ^e (74,6)	30,08 ± 0,04 ^b (73,4)	30,21 ± 0,11 ^d (74,4)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.11. Aktywność peroksydazy w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Wyniki dwuletnich analiz (2016 i 2017 rok) nad wpływem badanych czynników na aktywność peroksydazy w liściach pszenicy jarej w zależności od fazy rozwoju rośliny oraz formy 0,5 mM Asc przedstawiono w tabeli 33.

W 2016 roku kombinacje zawierające tylko 0,5 mM Asc w fazie trzeciego liścia oraz krzewienia charakteryzowały się najwyższą aktywnością peroksydazy. Podczas fazy strzelania w źdźbło rośliny z kombinacji 0,5 mM Asc - moczenie cechowały się spadkiem aktywności peroksydazy do 77,3% kontroli. Natomiast dwie pozostałe kombinacje (0,5 mM Asc podlewanie oraz oprysk) utrzymały aktywność powyżej wartości kontrolnej odpowiednio na poziomie: 221,4% (0,5 mM Asc - oprysk) oraz 105,3 % (0,5 mM Asc - podlewanie).

W fazie kłoszenia aktywność peroksydazy we wszystkich kombinacjach Asc była niższa od wartości kontrolnej.

Najwyższą aktywność peroksydazy stwierdzono u roślin z kombinacji 50 mM NaF. Wyniosła ona odpowiednio: 60,83 (384,2%); 55,74 (366,9%); 67,46 (415,6%) oraz 60,95 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$ (312,8%). Zastosowanie 0,5 mM Asc we wszystkich formach aplikacji wpłynęło na obniżenie aktywności peroksydazy w liściach pszenicy. Największą efektywność Asc stwierdzono po zastosowaniu go formie podlewania. Aktywność ta wyniosła: 43,77 (276,5% kontroli); 55,08 (362,6%); 55,69 (343,1%) oraz 51,17 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$ (262,7%).

W 2017 aktywność peroksydazy u kontroli, kształtowała się na podobnym poziomie jak w 2016 roku i wyniosła odpowiednio: 14,53; 14,78; 17,86 oraz 17,98 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$. Kombinacje 0,5 mM Asc: moczenie i podlewanie, charakteryzowały się niższą aktywnością peroksydazy niż rośliny z kontroli we wszystkich badanych fazach rozwojowych. Natomiast kombinacja 0,5 mM Asc- oprysk charakteryzowała się wyższą aktywnością tego enzymu w każdej z czterech badanych faz rozwojowych, od prób kontrolnych, odpowiednio: 22,35 (153,8% kontroli); 22,68 (153,4%); 24,76 (138,6%) oraz 25,58 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$ (142,2%).

Podobnie jak w 2016, w 2017 roku najwyższą aktywnością peroksydaz charakteryzowały się rośliny rosnące w glebie z 50 mM NaF, przy czym aktywność tego enzymu w fazach: trzeciego liścia, krzewienia oraz kłoszenia była wyższa niż w 2016 roku. Aktywność tego enzymu kształtowała się odpowiednio: 65,45 (450,4%

kontroli); 64,87(438,9%); 72,32 (404,9%) oraz 75,98 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$ (422,6%). Po zastosowaniu kwasu L-askorbinowego zaobserwowano spadek aktywności peroksydazy w roślinach rosnących w glebie z solą NaF. Przy czym przez w dwóch pierwszych fazach rozwojowych istotny wpływ wykazała forma 0,5 mM Asc - moczenie 48,34 (332,7 % kontroli) oraz 44,58 (301,6%). W fazach strzelania w źdźbło oraz kłoszenie forma 0,5 mM Asc - podlewanie 46,79 (261,9%) oraz 59,31 (329,9%) $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tab. 33. Aktywność peroksydazy w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Kombinacja	Peroksydaza [$\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$] (% kontroli)							
	2016				2017			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	15,83 ± 0,18 ^h (100)	15,19 ± 0,10 ^d (100)	16,23 ± 0,01 ^g (100)	19,48 ± 0,01 ^d (100)	14,53 ± 0,04 ^e (100)	14,78 ± 0,08 ^f (100)	17,86 ± 0,06 ^f (100)	17,98 ± 0,11 ^e (100)
0,5 mM Asc - moczenie	23,41 ± 0,11 ^f (142,8)	16,16 ± 0,02 ^d (106,4)	12,55 ± 0,05 ^h (77,3)	16,30 ± 0,04 ^e (83,7)	12,67 ± 0,03 ^f (87,2)	13,45 ± 0,10 ^g (91)	13,76 ± 0,01 ^g (77)	15,43 ± 0,04 ^f (85,8)
0,5 mM Asc - oprysk	24,32 ± 0,09 ^e (153,6)	25,59 ± 0,12 ^b (168,4)	35,94 ± 0,01 ^e (221,4)	16,50 ± 0,10 ^e (84,7)	22,35 ± 0,13 ^d (153,8)	22,68 ± 0,03 ^e (153,5)	24,76 ± 0,07 ^e (138,6)	25,58 ± 0,04 ^d (142,3)
0,5 mM Asc - podlewanie	19,92 ± 0,03 ^g (125,8)	19,77 ± 0,04 ^c (130,2)	17,09 ± 0,03 ^f (105,3)	15,33 ± 0,05 ^f (78,7)	12,67 ± 0,07 ^f (87,2)	12,79 ± 0,10 ^h (86,5)	12,68 ± 0,03 ^h (71)	13,45 ± 0,01 ^f (74,8)
50 mM NaF	60,83 ± 0,09 ^a (384,3)	55,84 ± 0,04 ^a (367,6)	67,46 ± 0,08 ^a (415,7)	60,95 ± 0,04 ^a (312,9)	65,45 ± 0,10 ^a (450,5)	64,87 ± 0,03 ^a (438,9)	72,32 ± 0,06 ^a (404,9)	75,98 ± 0,12 ^a (422,6)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	52,04 ± 0,03 ^c (328,7)	55,74 ± 0,02 ^a (366,9)	66,35 ± 0,03 ^b (408,8)	58,67 ± 0,03 ^b (301,2)	48,34 ± 0,09 ^c (332,7)	44,58 ± 0,05 ^d (301,6)	56,87 ± 0,03 ^c (318,4)	69,21 ± 0,15 ^b (384,9)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	58,42 ± 0,11 ^b (369)	55,49 ± 0,04 ^a (365,3)	57,05 ± 0,01 ^c (351,5)	59,23 ± 0,14 ^a (304)	53,46 ± 0,12 ^b (367,9)	54,87 ± 0,10 ^b (371,2)	66,89 ± 0,04 ^b (374,5)	68,63 ± 0,11 ^b (381,7)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	43,77 ± 0,01 ^d (276,5)	55,08 ± 0,02 ^a (362,6)	55,69 ± 0,06 ^d (343,1)	51,17 ± 0,02 ^c (262,7)	53,65 ± 0,05 ^b (369,2)	47,54 ± 0,04 ^c (321,7)	46,79 ± 0,04 ^d (262)	59,31 ± 0,10 ^c (329,8)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.12. Synteza średnich aktywności peroksydazy w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

U kontroli stwierdzono aktywność peroksydazy na poziomie: 15,18; 14,98; 17,04 oraz 18,73 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}\cdot\text{ś.m.}\cdot\text{min}^{-1}$ (tab. 34). Zastosowanie 0,5 mM Asc w formie oprysku wpłynęło na wzrost aktywności tego enzymu w każdej fazie rozwojowej pszenicy w porównaniu z kontrolą (23,33 153,17%; 24,13 161,1%; 30,35 178% oraz 21,04 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}\cdot\text{ś.m.}\cdot\text{min}^{-1}$ (112,3%). Pozostałe formy aplikacji 0,5 mM Asc - moczenie oraz 0,5 mM Asc-podlewanie charakteryzowały się aktywnością peroksydazy na poziomie zbliżonym do wartości kontrolnych.

Najwyższą aktywnością peroksydaz charakteryzowały się rośliny z kombinacji 50 mM NaF we wszystkich terminach pomiaru. Dodatek 0,5 mM Asc we wszystkich formach wpłynął na obniżenie aktywności tego enzymu w roślinach rosnących z dodatkiem 50 mM NaF. Największe obniżenie aktywności peroksydazy stwierdzono w kombinacji 50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie we wszystkich obserwowanych fazach rozwojowych pszenicy: 48,71 (320,9%); 51,31 (342,4%) 51,24 (300,6%) oraz 55,24 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}\cdot\text{ś.m.}\cdot\text{min}^{-1}$ (294,9%).

Tab. 34. Synteza średnich wyników aktywności peroksydazy w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Kombinacja	Peroksydaza [$\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$] (%kontroli)			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	15,18 ± 0,11 ^g (100)	14,98 ± 0,09 ^f (100)	17,04 ± 0,03 ^e (100)	18,73 ± 0,06 ^e (100)
0,5 mM Asc - moczenie	18,04 ± 0,07 ^f (118,8)	14,80 ± 0,06 ^f (98,8)	13,15 ± 0,06 ^g (77,2)	15,86 ± 0,04 ^f (84,7)
0,5 mM Asc - oprysk	23,33 ± 0,11 ^e (153,7)	24,13 ± 0,07 ^d (161,1)	30,35 ± 0,04 ^d (178)	21,04 ± 0,07 ^d (112,3)
0,5 mM Asc - podlewanie	16,29 ± 0,05 ^g (107,3)	16,28 ± 0,07 ^e (108,6)	14,88 ± 0,03 ^f (87,3)	14,39 ± 0,03 ^g (76,8)
50 mM NaF	63,14 ± 0,10 ^a (415,9)	60,30 ± 0,03 ^a (402,4)	69,89 ± 0,07 ^a (410)	68,46 ± 0,08 ^a (365,5)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	50,19 ± 0,06 ^c (330,6)	50,21 ± 0,03 ^c (335,1)	61,61 ± 0,03 ^b (361,5)	63,94 ± 0,09 ^b (341,3)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	55,94 ± 0,12 ^b (368,5)	55,18 ± 0,07 ^b (368,2)	61,97 ± 0,03 ^b (363,6)	63,93 ± 0,13 ^b (341,3)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	48,71 ± 0,03 ^d (320,9)	51,31 ± 0,03 ^c (342,4)	51,24 ± 0,05 ^c (300,6)	55,24 ± 0,06 ^c (294,9)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.13. Aktywność katalazy w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Wyniki dwuletnich analiz (2016 i 2017 rok) dotyczących wpływu badanych czynników na aktywność katalazy w liściach pszenicy jarej w zależności od fazy rozwoju rośliny oraz formy aplikacji 0,5 mM Asc przedstawiono w tabeli 35.

W 2016 roku aktywność katalazy w liściach, we wszystkich obserwowanych fazach rozwojowych, wynosiła odpowiednio: 92,53; 78,27; 105,92 oraz 114,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$.

Zastosowanie 0,5 mM Asc w każdej z trzech form w fazach trzeciego liścia, strzelania w źdźbło oraz kłoszenia wpłynęło stymulująco na aktywności katalazy w liściach pszenicy. W fazie kłoszenia dla kombinacji 0,5 mM Asc - moczenie oraz 0,5

mM Asc - podlewanie zaobserwowano spadek aktywności katalazy kolejno do 96,3 i 93,2% kontroli.

Najwyższą aktywnością katalazy we wszystkich fazach rozwojowych charakteryzowały się rośliny rosnące w kombinacji 50 mM NaF. Wartości te wyniosły odpowiednio: 271,79; 228,42; 218,39 oraz 249,82 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$. Zastosowanie 0,5 mM Asc we wszystkich formach aplikacji wpłynęło na obniżenie aktywności katalazy w liściach pszenicy.

W 2017 aktywność katalazy u kontroli była najniższa we wszystkich badanych fazach rozwojowych pszenicy i wyniosła kolejno: 87,4; 86,89; 87,95 oraz 100,14 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$. W 2017 roku wszystkie formy aplikacji 0,5 mM Asc wpłynęły stymulująco na aktywność katalazy. Podobnie jak w 2016 roku najwyższą aktywnością tego enzymu charakteryzowały się rośliny rosnące w glebie z 50 mM NaF. Przy czym aktywność tego enzymu w 2017 we wszystkich terminach pomiaru była niższa niż w 2016 roku. Aktywność tego enzymu, w danym roku, kształtowała się odpowiednio na poziomie: 244,8; 202,6; 215,89 oraz 240,63 μmol . Po zastosowaniu 0,5 mM Asc zaobserwowano spadek aktywności katalazy w roślinach rosnących w glebie z solą NaF.

Tab. 35. Aktywność katalazy w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Kombinacja	Katalaza [$\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.m}\cdot\text{min}^{-1}$] (% kontroli)							
	2016				2017			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	92,53 ± 0,03 ^h (100)	78,27 ± 0,09 ^h (100)	105,92 ± 0,11 ^h (100)	114,60 ± 0,09 ^f (100)	87,40 ± 0,09 ^g (100)	86,89 ± 0,16 ^f (100)	87,95 ± 0,08 ^h (100)	100,14 ± 0,18 ^h (100)
0,5 mM As - moczenie	157,42 ± 0,02 ^e (170)	100,56 ± 0,16 ^g (128,5)	113,78 ± 0,01 ^f (107,4)	110,39 ± 0,19 ^g (96,3)	98,53 ± 0,18 ^f (112,7)	100,46 ± 0,11 ^g (115,6)	117,39 ± 0,10 ^f (133,5)	139,92 ± 0,17 ^e (139,7)
0,5 mM Asc - oprysk	110,37 ± 0,23 ^f (119,3)	119,26 ± 0,19 ^e (152,4)	110,03 ± 0,16 ^g (103,9)	140,15 ± 0,08 ^e (122,3)	119,86 ± 0,19 ^d (137,1)	103,97 ± 0,11 ^e (119,6)	119,28 ± 0,09 ^e (135,6)	129,33 ± 0,19 ^f (129,1)
0,5 mM Asc - podlewanie	103,46 ± 0,13 ^g (111,8)	106,13 ± 0,05 ^f (135,6)	115,81 ± 0,11 ^e (109,4)	106,85 ± 0,20 ^h (93,2)	104,68 ± 0,10 ^e (119,8)	101,64 ± 0,26 ^g (117)	105,67 ± 0,23 ^g (120,1)	102,78 ± 0,11 ^g (102,6)
50 mM NaF	271,79 ± 0,01 ^a (293)	228,42 ± 0,10 ^a (291,8)	218,39 ± 0,07 ^a (206,2)	249,82 ± 0,14 ^a (217,9)	244,80 ± 0,11 ^a (280,1)	202,60 ± 0,17 ^a (233,2)	215,89 ± 0,09 ^a (245,5)	240,63 ± 0,11 ^a (240,3)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	249,99 ± 0,17 ^b (270)	150,33 ± 0,12 ^d (192,1)	176,44 ± 0,12 ^d (166,6)	194,34 ± 0,17 ^d (169,6)	189,44 ± 0,20 ^b (216,7)	174,40 ± 0,11 ^d (200,7)	186,50 ± 0,18 ^d (212,1)	194,75 ± 0,21 ^c (194,5)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	191,54 ± 0,22 ^c (207)	198,56 ± 0,11 ^b (253,7)	177,81 ± 0,12 ^c (167,9)	199,82 ± 0,03 ^b (174,4)	162,52 ± 0,07 ^c (185,9)	198,14 ± 0,21 ^b (228)	199,18 ± 0,09 ^c (226,5)	203,77 ± 0,06 ^b (203,5)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	177,37 ± 0,08 ^d (191,7)	193,37 ± 0,09 ^c (247,1)	190,60 ± 0,19 ^b (179,9)	197,22 ± 0,10 ^c (172,1)	189,50 ± 0,12 ^b (216,8)	193,71 ± 0,14 ^c (223)	200,42 ± 0,09 ^b (227,9)	187,33 ± 0,15 ^d (187,1)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.14. Synteza średnich aktywności katalazy w liściach pszenicy jarej odmiany bryza rosnącej rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Rośliny kontrolne charakteryzowały się najniższą średnią aktywnością katalazy spośród badanych kombinacji (tab. 36). Zastosowanie 0,5 mM Asc w każdej z trzech form aplikacji wpłynęło na zwiększenie aktywności tego enzymu w porównaniu z kontrolą.

Wykazano również, że najwyższą aktywnością katalazy spośród wszystkich kombinacji charakteryzowały się rośliny rosnące w kombinacji 50 mM NaF. Zastosowanie 0,5 mM Asc we wszystkich formach wpłynęło na obniżenie aktywności katalazy w roślinach rosnących w glebie z 50 mM NaF, przy czym forma aplikacji 0,5 mM Asc - moczenie znacząco obniżyła aktywność tego enzymu w fazie krzewienia i strzelania w źdźbło.

Tab. 36. Synteza średnich wyników aktywności katalazy w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Kombinacja	Katalaza [$\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.m.}\cdot\text{min}^{-1}$] (% kontroli)			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	89,96 ± 0,06 ^h (100)	82,58 ± 0,13 ^h (100)	96,93 ± 0,10 ^h (100)	107,37 ± 0,14 ^g (100)
0,5 mM Asc - moczenie	127,97 ± 0,10 ^e (142,2)	100,51 ± 0,14 ^g (121,7)	115,58 ± 0,6 ^e (119,2)	125,15 ± 0,18 ^f (116,6)
0,5 mM Asc - oprysk	115,11 ± 0,21 ^f (128)	111,61 ± 0,15 ^e (135,1)	114,65 ± 0,13 ^f (118,3)	134,74 ± 0,14 ^e (125,5)
0,5 mM Asc - podlewanie	104,07 ± 0,12 ^g (115,7)	103,88 ± 0,16 ^f (125,8)	110,74 ± 0,17 ^g (114,2)	104,81 ± 0,16 ^h (97,6)
50 mM NaF	258,29 ± 0,06 ^a (287,1)	215,51 ± 0,14 ^a (261)	217,14 ± 0,08 ^a (224)	245,22 ± 0,13 ^a (228,4)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	219,71 ± 0,19 ^b (244,2)	162,36 ± 0,12 ^d (196,6)	181,47 ± 0,15 ^d (187,2)	194,54 ± 0,19 ^c (181,2)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	177,03 ± 0,15 ^d (196,8)	198,35 ± 0,16 ^b (240,2)	188,49 ± 0,11 ^c (194,5)	201,79 ± 0,05 ^b (187,9)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	183,43 ± 0,10 ^c (203,9)	193,54 ± 0,12 ^c (234,4)	195,51 ± 0,14 ^b (201,7)	192,27 ± 0,13 ^d (179)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.15. Zawartość kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Wyniki dwuletnich analiz dotyczących wpływu badanych czynników na zawartość kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy jarej w zależności od fazy rozwoju rośliny oraz formy aplikacji 0,5 mM Asc przedstawiono w tab. 37.

W 2016 roku zawartość kwasu L-askorbinowego u kontroli wyniosła odpowiednio: 89,23; 100,31; 150,15 oraz 170,53 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m.. Zawartość kwasu L-askorbinowego była inna w zależności od formy zastosowania Asc. Dla formy moczenie nasion wyniosła odpowiednio: 88,71 (99,4%); 102,11 (101,8%); 153,11 (102%) oraz 175,16 μg . (102,7%). Dla formy oprysk: 90,18 (101,1%); 103,12 (102,8%); 149,12 (99,3%); 172,31 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (101%). Dla wariantu podlewanie stwierdzono zawartości kwasu L-askorbinowego w każdej badanej fazie rozwojowej w porównaniu z kontrolą odpowiednio: 91,24 (102,2%); 111,34 (111%); 158,89 (105,8%) oraz 179,29 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (105,1%). Najwyższą zawartością kwasu L-askorbinowego spośród wszystkich kombinacji w każdym terminie pomiaru charakteryzowały się rośliny z kombinacji 50 mM NaF (122,13 - 136,9%; 150,67 -150,2%); 179,23 - 119,4% oraz 200,11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. - 117,4%). Egzogenna aplikacja kwasu L- askorbinowego w każdej z form wpłynęła na obniżenie zawartości endogennej witaminy C w roślinach rosnących w glebie z 50 mM NaF. Najbardziej efektywną formą aplikacji 0,5 mM Asc powodującą obniżenie ilości kwasu L- askorbinowego w tkance roślinnej okazał się oprysk gdzie stężenie wit C wyniosło odpowiednio: 107,11 (120,1% kontroli); 115,21 (114,8%); 165,31 (110,1%); 188,12 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (110,3%).

W 2017 roku podobnie jak w 2016 roku zawartość tej witaminy w liściach wzrastała w każdej kolejnej fazie rozwojowej pszenicy. Dla kombinacji kontrolnej zawartość Asc wyniosła odpowiednio: 87,23; 94,51; 163,45 oraz 175,67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m.. Rośliny rosnące w kombinacjach tylko z 0,5 mM Asc w pierwszych dwóch fazach rozwojowych charakteryzowały się wyższą zawartością Asc w liściach w porównaniu z kontrolą. W kolejnych badanych fazach rozwojowych wartości te były niższe od kontroli, jedynie rośliny z kombinacji 0,5 mM Asc - oprysk w fazie strzelania w źdźbło wykazały wyższe stężenie wit C od roślin w kontroli (164,64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. - 100,7%). Podobnie jak w 2016 roku również w roku kolejnym najwyższą zawartość tej witaminy wykazały rośliny z kombinacji 50 mM NaF: 127,21 (145,8%); 145,23 (153,7%) oraz 181,34 (110,9%); 206,63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m. (117,6%). W 2017 tak samo jak w 2016 roku,

egzogenna aplikacja Asc, w każdej z form, wpłynęła na obniżenie zawartości endogennej witaminy C w roślinach rosnących w glebie z 50 mM NaF. Najbardziej efektywnie, na obniżenie przez pierwsze dwa terminy pomiaru, wpłynęła forma aplikacji moczenie, natomiast w fazie krzewienia oraz strzelania w źdźbło – oprysk (tab. 37).

3.4.16. Synteza średnich zawartości kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy jarej odmiany bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Średnie zawartości kwasu L-askorbinowego wykazały (tab. 38), że dodatek egzogennej Asc wpłynął na wzrost ilości tej substancji w każdej kombinacji, w porównaniu z kontrolą. Jedynie kombinacja 0,5 mM Asc-oprysk w fazie pomiaru strzelanie w źdźbło oraz kłoszenie charakteryzowała się niższym stężeniem kwasu L-askorbinowego od kontroli: 98,7% (III termin) oraz 99,9% kontroli (IV termin). Najwyższe ilości kwasu L-askorbinowego spośród tych kombinacji zawierały rośliny z kombinacji 0,5 mM Asc-podlewanie przez wszystkie terminy pomiaru.

Najwyższe ilości tej substancji zawierały rośliny rosnące w glebie z dodatkiem 50 mM NaF. Wykazano, że zastosowanie egzogennej kwasu L-askorbinowego zmniejszyło jego endogenną pulę w roślinach rosnących w kombinacjach z 50 mM NaF. Zastosowanie 0,5 mM Asc - oprysk najefektywniej obniżyło zawartość kwasu L-askorbinowego, co zaobserwowano w każdej badanej fazie rozwojowej w liściach pszenicy.

Tab. 37. Zawartość kwasu L- askorbinowego w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej

Kombinacja	Kwas L - askorbinowy [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)							
	2016				2017			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza Kłoszenia	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	89,23 ± 3,01 ^g (100)	100,31 ± 1,11 ^f (100)	150,15 ± 1,15 ^g (100)	170,53 ± 3,09 ^h (100)	87,23 ± 4,00 ^f (100)	94,51 ± 1,11 ^h (100)	163,45 ± 1,88 ^f (100)	175,67 ± 1,87 ^c (100)
0,5 mM Asc - moczenie	88,71 ± 2,94 ^g (99,4)	102,11 ± 2,98 ^g (101,8)	153,11 ± 2,33 ^f (101,9)	175,16 ± 2,13 ^f (102,7)	89,21 ± 2,13 ^e (102,3)	96,29 ± 1,27 ^g (101,9)	164,64 ± 2,01 ^e (100,7)	173,65 ± 2,31 ^g (98,9)
0,5 mM Asc - oprysk	90,18 ± 2,01 ^{ef} (101,1)	103,12 ± 3,14 ^g (102,8)	149,12 ± 2,12 ^g (99,31)	172,31 ± 1,45 ^g (101)	87,25 ± 2,31 ^f (100,1)	101,23 ± 1,23 ^f (107,1)	160,29 ± 2,46 ^h (98)	173,46 ± 4,01 ^g (98,7)
0,5 mM Asc - podlewanie	91,24 ± 1,24 ^e (102,3)	111,34 ± 2,03 ^e (111)	158,89 ± 4,03 ^e (105,8)	179,29 ± 2,03 ^e (105,1)	94,32 ± 1,25 ^d (108,1)	108,36 ± 1,26 ^e (114,6)	161,21 ± 2,37 ^g (98,6)	175,24 ± 1,87 ^f (99,8)
50 mM NaF	122,13 ± 4,00 ^a (136,9)	150,67 ± 3,05 ^a (150,2)	179,23 ± 2,89 ^a (119,4)	200,11 ± 2,14 ^a (117,3)	127,21 ± 2,54 ^a (145,8)	145,23 ± 2,13 ^a (153,7)	181,34 ± 2,11 ^a (110,9)	206,63 ± 1,22 ^a (117,6)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	112,32 ± 2,11 ^c (125,8)	120,98 ± 2,36 ^c (120,6)	170,11 ± 2,25 ^b (113,3)	190,12 ± 2,16 ^c (111,5)	109,67 ± 1,77 ^c (125,7)	123,45 ± 2,03 ^d (130,6)	175,67 ± 1,45 ^b (107,5)	197,89 ± 1,11 ^b (112,6)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	107,11 ± 3,45 ^d (120)	115,21 ± 1,78 ^d (114,8)	165,31 ± 1,22 ^d (110,1)	188,12 ± 2,00 ^d (110,3)	110,47 ± 2,03 ^b (126,6)	126,78 ± 2,89 ^c (134,1)	170,81 ± 1,87 ^d (104,5)	190,87 ± 2,33 ^d (108,7)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	118,71 ± 2,33 ^b (133)	139,65 ± 1,74 ^b (139,2)	167,21 ± 1,27 ^c (111,4)	192,34 ± 3,16 ^b (112,8)	111,23 ± 2,38 ^b (127,5)	140,31 ± 2,11 ^b (148,5)	172,34 ± 2,31 ^c (105,4)	195,67 ± 1,37 ^c (111,4)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

Tab. 38. Synteza średnich wyników zawartości kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy jarej odmiany Bryza rosnącej w glebie z dodatkiem 50 mM NaF w zależności od formy aplikacji 0,5 mM Asc oraz fazy rozwojowej z dwóch lat badań 2016-2017

Kombinacja	Kwas L-askorbinowy [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ś.m.] (% kontroli)			
	Faza trzeciego liścia	Faza krzewienia	Faza strzelania w źdźbło	Faza kłoszenia
Kontrola	88,23 ± 3,05 ^f (100)	97,41 ± 1,11 ^h (100)	156,81 ± 1,51 ^g (100)	173,10 ± 2,48 ^{ef} (100)
0,5 mM Asc - moczenie	88,96 ± 2,50 ^f (100,8)	99,2 ± 2,13 ^g (101,8)	158,87 ± 2,17 ^f (101,3)	174,40 ± 2,22 ^e (100,8)
0,5 mM Asc - oprysk	88,71 ± 2,16 ^f (100,5)	102,175 ± 2,19 ^f (104,9)	154,70 ± 2,29 ^h (98,7)	172,88 ± 2,73 ^g (99,9)
0,5 mM Asc - podlewanie	92,78 ± 1,25 ^e (105,1)	109,85 ± 1,65 ^e (112,7)	160,05 ± 3,20 ^e (102,1)	177,26 ± 1,95 ^d (102,4)
50 mM NaF	124,67 ± 3,27 ^a (141,3)	147,95 ± 2,59 ^a (151,9)	180,28 ± 2,59 ^a (115)	203,37 ± 2,50 ^a (117,5)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - moczenie	110,99 ± 1,94 ^c (125,8)	122,215 ± 2,19 ^c (125,5)	172,89 ± 1,85 ^b (110,3)	194,00 ± 1,63 ^b (112,1)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - oprysk	108,79 ± 2,74 ^d (123,3)	120,99 ± 2,34 ^d (124,2)	161,56 ± 1,55 ^d (107,2)	189,49 ± 2,17 ^c (109,5)
50 mM NaF + 0,5 mM Asc - podlewanie	114,97 ± 2,36 ^b (130,3)	139,98 ± 1,93 ^b (143,7)	169,77 ± 1,79 ^c (108,3)	194,00 ± 2,27 ^b (112,1)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie przy $p < 0,05$

3.4.17. Podsumowanie wyników IV etapu badań

Zastosowane formy 0,5 mM kwasu L-askorbinowego w formie podlewania najskuteczniej złagodziło stres wywołany 50 mM NaF w każdej badanej fazie rozwojowej pszenicy jarej odmiany Bryza.

4. Dyskusja

Znaczenie kiełkowania nasion w rozwoju roślin jest powszechnie znane, a jego badanie zostało wykorzystane jako model do oceny toksyczności związków fluoru przez wielu autorów (Wang in. 1991; Wilde i Yu 1998; Gulzar i Khan 2001; Rubio-Casal i in. 2003; Elloumi i in. 2005; Gupta i in. 2009). Z fizjologicznego punktu widzenia kiełkowanie następuje w momencie przywrócenia aktywności metabolicznych nasienia, prowadzących do rozpoczęcia wzrostu i rozwoju siewki, pod warunkiem optymalnych warunków wewnętrznych i środowiskowych dla rozwoju tkanek. Zmiany tych warunków spowodowane różnymi substancjami toksycznymi wpływają na dalszy rozwój tkanki roślinnej (Nassif i Perez 1997).

W przeprowadzonych doświadczeniach *in vitro* wykazano toksyczny wpływ użytych roztworów 10 i 20 mM NaF na proces kiełkowania nasion wybranych gatunków roślin. Kiełkowane na szalkach nasiona z dodatkiem NaF charakteryzowały się obniżonym indeksem kiełkowania w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Największym obniżeniem indeksu kiełkowania przy stężeniu 10 mM NaF charakteryzowały się nasiona: ogórka (*Cucumis sativus* L.) (13%), słonecznika (*Helianthus annuus* L.) (21,8%), rzodkiewki (*Raphanus sativus* L.) (34%) lucerny (*Medicago sativa* L.) (34,8%). Nasiona pszenicy (*Triticum aestivum* L.) wykazały natomiast wartość indeksu kiełkowania na poziomie od 50 (10 mM NaF) do 29,8 % (20 mM NaF).

Obniżenie indeksu kiełkowania nasion zależy nie tylko od stężenia fluorków w podłożu ale również od gatunku roślin, co można było zaobserwować w niniejszej pracy. Podobne obserwacje już wcześniej przedstawili Fin i in. (2016). Odpowiedź trzech gatunków wybranych do doświadczenia roślin różniła się wrażliwością na stres wywołany NaF w zakresie stężeń od 4 do 8 mg·dm⁻³. W badaniu tym najbardziej wrażliwą rośliną na NaF była kukurydza (*Zea mays*). W jej przypadku zdolność kiełkowania nasion obniżyła się już przy stężeniu 4 mg·dm⁻³. Natomiast dla soi (*Glycine Willd*) toksyczny wpływ tego pierwiastka odnotowano dopiero przy stężeniu 8 mg·dm⁻³. W przypadku sorgo (*Sorghum bicolor* L.), nie wykazano istotnej odpowiedzi na powyższe stężenia fluoru. Autorzy stwierdzili zatem, że sorgo jest rośliną charakteryzującą się stosunkowo wysoką odpornością na stres wywołany związkami fluoru i zalecili wysiew tej rośliny w glebach z wysoką zawartością fluoru.

Próbie wytłumaczenia przyczyny obniżenia indeksu kiełkowania roślin poddanych działaniu NaF podjęto już w latach 60-tych XX wieku. Alim i in. (2017) zasugerowali, że podczas procesu kiełkowania zbóż fluor hamuje enzym fitazę, która defosforyluje

fitynę będącą głównym rezerwuarem fosforu w bielmie nasion, opóźnia przez to proces wzrostu korzeni i siewki.

Obok indeksu kiełkowania nasion za szybką metodą oceny fitotoksyczności substancji chemicznych, takich jak np. fluor uważa się pomiar długości korzeni (Zhao i in. 2003). Badanie tego wskaźnika służy również do identyfikacji roślin tolerujących różne stresy abiotyczne (Rout i in. 1997; Kim i in. 2020; Lethin 2020). Porównując długość korzeni roślin rosnących w podłożu z dodatkiem 10 mM NaF stwierdzono istotną redukcję ich długości u następujących gatunków: rzodkiewki (*Raphanus sativus* L.) 65,9%, słonecznika (*Helianthus annus* L.) 78,2%, ogórka (*Cucumis sativus* L.) (87,1%), lucerny (*Medicago sativa* L.) (65,2%) oraz pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) 47,6%. Również pszenica (*Triticum aestivum* L.) charakteryzowała się znaczącym obniżeniem długości korzeni od 62,8% (10 mM NaF) do 85,36% (20 mM NaF).

Toksyczny wpływ fluoru na procesy rozwojowe roślin takich jak pszenica (*Triticum aestivum* L.), ryż (*Oryza sativa* L.), jęczmień (*Hordeum vulgare* L.), żyto (*Secale cereale* L.), groch (*Pisum sativum* L.), ogórek (*Cucumis sativus* L.), rzodkiewka (*Raphanus sativus* L.), pomidor (*Solanum lycopersicum* L.) i słonecznik (*Helianthus annus* L.) został opisany wcześniej przez wielu badaczy (Pant i in. 2008; Gupta i in. 2009; Bhargava i Bhardwaj 2010; Gautam i Bhardwaj 2010; Datta i in. 2012; Pelc i in. 2017; Mondal 2017; Tak i Asthir 2017; Smolik i Pelc 2017; Alim i in. 2017; Śnioszek i in. 2019). Negatywny wpływ fluoru na rozwój korzeni roślin odnotowują się również przy niskich stężeniach tego związku w podłożu, w badaniu przeprowadzonym przez Sachana i Lal (2018) wykazano hamujący wpływ już 1 mM NaF na wzrost ciecierzycy (*Cicer arietinum* L.)

Pierwiastek ten cechuje się wysoką fitotoksycznością i najczęściej prowadzi do skrócenia długości korzeni u roślin nawet o 70% jeżeli porównamy je do roślin kontrolnych (Tak i Asthir 2017). Tak duża redukcja długości korzeni może mieć związek ze spadkiem turgoru w komórkach, co skutkuje zahamowaniem wzrostu korzeni w początkowych fazach kiełkowania nasion. Niektórzy autorzy zwracają uwagę, że fluor indukuje zmiany w metabolizmie nasion już po procesie imbibicji, co przekłada się na zahamowanie wzrostu korzeni, niekorzystne zmiany cech morfologicznych i fizjologicznych a w efekcie późniejszy wzrost roślin (Neri i in. 1997; Ghosh i Xu 2014).

Zrealizowane w niniejszej pracy doświadczenia (I i II etap badań) wykazały, że obecność fluorku sodu (10 i 20 mM) skutkowało zmniejszeniem długości siewki oraz w większości redukcją świeżej masy badanych gatunków roślin. Największą redukcję

długości siewki zaobserwowano u pszenicy (*Triticum aestivum* L.) w porównaniu do kontroli, przy stężeniu 10 mM NaF obniżenie to wyniosło 41,78% natomiast dla stężenia 20 mM 5%. Stopień redukcji świeżej masy zależny był od gatunku roślin oraz stężenia soli NaF. Największym obniżeniem wartości tego parametru wynoszącym 57,1% charakteryzowała się lucerna siewna (*Medicago sativa* L.) rosnąca z dodatkiem 10 mM NaF. Natomiast u pszenicy w badanych doświadczeniach (I i II etap) spadek świeżej masy wyniósł 54% (10 mM NaF) oraz 21% kontroli (20 mM). Yu (1996) podaje, że fluor poprzez tworzenie kompleksu z jonami wapnia (CaF_2) i cynku (ZnF_2) w miejscu aktywnym amylazy oraz innych enzymów, w tym lipaz dezaktywuje lub hamuje działanie tych enzymów. Skutkuje to upośledzeniem rozkładu materiałów rezerwowych, w tym tłuszczów, białek i w dużej mierze węglowodanów w tkance roślinnej. Prowadzi to do zahamowania wzrostu i spadku świeżej masy roślin. Weinstein (1977), Bhargava i Bhardwaj (2010) również potwierdzili, że rosnące stężenie NaF w pożywce wykazało fitotoksyczne działanie na parametry fizjologiczne i biochemiczne wzrostu roślin poprzez hamujący wpływ na metabolizm węglowodanów podczas procesu kiełkowania. Jednakże Yu (1996) w doświadczeniu z fasolą mung (*Vigna radiata* L.) zaobserwował, że nie wszystkie rośliny rosnące z dodatkiem NaF w pożywce charakteryzowały się redukcją świeżej masy. W badaniach własnych jęczmień (*Hordeum vulgare* L.) rosnący z dodatkiem NaF charakteryzował się wyższą wartością świeżej masy od roślin z kontroli.

Biochemicznym parametrem, który wyraźnie wskazywał na udział F w powstawaniu stresu oksydacyjnego w komórce, była zawartość wolnej proliny. Aminokwas ten odgrywa ważną rolę w ochronie komórek przed uszkodzeniem spowodowanym różnymi substancjami toksycznymi takimi jak np., związki fluoru (Kaur i Asthir 2015, Dulaska i in. 2019). Badając wpływ NaF w stężeniach 10 mM w liściach różnych gatunków roślin oraz 10, 20, 25 i 50 mM w liściach pszenicy zaobserwowano wzrost zawartości tego aminokwasu. U pszenicy (*Triticum aestivum* L.) rosnącej *in vitro* przy stężeniu 20 mM NaF odnotowano wzrost zawartości tego aminokwasu do poziomu 1694% kontroli. Według wielu autorów (Elloumi i in. 2005; Bhargava i Bhardwaj 2011; Gadi i in. 2012; Datta i in. 2012), dodatek nawet małych stężeń NaF w przedziale już od 0,01 mM do 8,0 mM wpływa na zwiększenie zawartości tego związku w liściach. Zwiększona akumulacja proliny w odpowiedzi na stres NaF została opisana w dwóch gatunkach paproci wodnej (*Azolla microphylla* i *Azolla filiculoides*) jak również

u ciecierzycy pospolitej (*Cicer arietinum* L.) oraz u roślin z gatunków kolobantów (*Colobanthus petalulus* i *Colobanthus quitensis*) (Eyini i in. 1999; Datta i in. 2012).

Pomiar peroksydacji lipidów a dokładnie zawartość dialdehydu malonowego (MDA) bywa często wykorzystywana do oceny wpływu czynników stresowych na zmiany oksydacyjne w komórkach roślinnych. MDA powstaje w wyniku utleniania błon biologicznych i może posłużyć jako wskaźnik stresu wywołanego związkami fluoru w komórkach roślinnych (Morell i in. 1997). Wyniki wszystkich doświadczeń wskazują, że zawartość MDA w siewkach pszenicy wzrosła wraz ze wzrostem stężenia fluorku sodu oraz fazą rozwojową rośliny (etap III, IV). Jednym z najczęściej badanych gatunków roślin, w których badano wpływ fluoru na zawartość MDA jest herbata (*Camelia sinensis* L.). W badaniach Li i in. (2011) oraz Niu i in. (2020), zanotowano istotne podwyższenie zawartości MDA w liściach herbaty poddanej stresowi fluorkowemu w stężeniach od 0,11 do 5 mM, w uprawie hydroponicznej. Yadu i in. (2016) stwierdzili, że peroksydacja lipidów w tkankach roślinnych poddanych stresowi fluorkowemu spowodowana jest głównie zwiększoną produkcją RFT. Zawartość MDA w tkankach roślin wzrasta wprost proporcjonalnie do ilości RFT w komórkach co prowadzi również do destabilizacji błony komórkowej (Li i in. 2011).

Jednym z wczesnych objawów uszkodzenia roślin przez fluor jest obniżenie zawartości chlorofilu a, b oraz karotenoidów. Co wydaje się być związana z niszczeniem chloroplastów (Saini i in. 2013). W niniejszej pracy zawartość chlorofilu a i b oraz karotenoidów we wszystkich etapach badań, w których zastosowano sole NaF w roślinach, zmniejszyła się o około 50%. Spadek ten może być spowodowany rozkładem chlorofilu a i b podczas stresu lub z powodu zahamowania biosyntezy tych związków. Podobne wyniki uzyskano u rośliny z gatunku *Cyamopsis tetragonoloba* L.) RGC-197 (Sabal i in. 2006), w liściach drzewa migdałowego (*Amygdalis communis* L.) (Elloumi i in. 2005) i u pszenicy (*Triticum aestivum* L.) Raj. 4083 (Bhargava i Bhardwaj 2010). W badaniach Sharmy i Kaura (2018) nad rzęsą wodną (*Spirodela polyrhiza*) odnotowano spadek zawartości chlorofilu a i b wynoszący nawet do 90% przy stężeniach od 5-50 mg·dm⁻³ NaF. Spadek zawartości tych barwników autorzy tłumaczyli zmniejszeniem aktywności reduktazy protochlorofilowej. Według Elloumi i in. (2005) redukcja całkowitej zawartości chlorofilu może być spowodowana tworzeniem kompleksów fluoru z jonami magnezu (MgF₂) stanowiącymi ważny komponent chlorofilu. W wyniku tego dalsza synteza chlorofilu a i b oraz innych barwników, w tym karotenoidów, nie jest możliwa (Gadi i in. 2012; Pal i in. 2012).

Chloroplasty są również głównym miejscem akumulacji fluoru. Wysokie stężenie tego pierwiastka zmniejsza dostępność jonów Fe^{2+} niezbędnych do syntezy chlorofilu oraz prowadzi do zwiększenia aktywności enzymów degradujących chlorofil, takich jak chlorofilaza (Elloumi i in. 2005; Ram i in. 2012). Gupta i in. (2009) podają, że zawartość barwników w liściach pod wpływem fluoru może obniżyć się nawet o 80%.

Ważnym enzymem, z punktu widzenia odporności roślin na stres oksydacyjny, jest katalaza. W niniejszej pracy aktywność CAT wzrastała wraz ze wzrostem stężenia NaF, a najwyższą aktywność tego enzymu charakteryzowały się rośliny rosnące w glebie z 50 mM. Podobne zmiany aktywności katalazy odnotowali Śnioszek i in. (2019) w liściach odmiany pszenicy ozimej Skagen. Po doglebowym zastosowaniu NaF i KF, aktywność CAT wzrosła wraz ze wzrostem stężenia fluoru w glebie. Wzrost aktywności tego enzymu pod wpływem NaF zaobserwowali również Skupień-Wysocka i Cholewiński (1998) w siewkach grochu (*Pisum sativum* L.) oraz Telesiński i in. (2009) u fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.). U pszenicy (*Triticum aestivum* L.) pod wpływem stresu wywołanego fluorem obserwuje się zarówno wzrost, jak i spadek aktywności CAT. Odmienne wyniki od przedstawionych w niniejszej pracy uzyskali Kumar i in. (2009). Autorzy ci, badali toksyczność trzech dawek NaF (100, 200 i 300 $mg \cdot dm^{-3}$) u morwy białej. Zaobserwowali spadek aktywności CAT wraz ze wzrostem stężeniem fluorku sodu. Inną przyczyną obniżenia aktywności CAT w stresie wywołanym związkami fluoru jest wiązanie się anionu fluorkowego z katalazą (wiązanym wodorowym) przez co zablokowane jest żelazo, które w normalnych warunkach umożliwia temu reagowanie z nadtlakiem wodoru (Neri i in. 1997).

Aby prawidłowo ocenić wpływu stresów środowiskowych na roślinę, często wraz z aktywnością katalazy, bada się aktywność peroksydazy. Peroksydaza, podobnie jak CAT jest enzymem hemowym i reaguje z H_2O_2 , przy czym w badaniach wpływu F na rośliny częściej obserwuje się wzrost aktywności POX niż CAT.

W niniejszej pracy aktywność peroksydazy liściach pszenicy wzrastała wraz ze wzrostem stężenia NaF – podobnie jak w przypadku katalazy. Stymulujący wpływ F^- na aktywność POX wykazano w wielu badaniach, w których aktywność enzymu. Wzrastała wprost proporcjonalnie do zawartości F w podłożu (Machoy i in. 1994; Telesiński i in. 2009; Li i in. 2011). Aktywność tego enzymu badano nie tylko w liściach ale również w różnych częściach pszenicy (*Triticum aestivum* L.) m.in. w zarodkach oraz w korzeniach. We wspomnianym wyżej materiale roślinnym aktywność POX charakteryzowała się wzrostem aktywności wraz ze zwiększającym się stężeniem NaF

w pożywce, przy czym aktywność ta różniła się między odmianami (Pelc i in. 2020). W badaniu Tak i Asthir (2017) większą aktywnością tego enzymu charakteryzowały się odmiany pszenicy tolerującej stres wywołany F^- . Wzrost aktywności peroksydazy u morwy białej (*Morus alba* L.), zaobserwowali Kumar i in. (2009). Wzrost był wprostproporcjonalny do dawki F^- (100 $mg \cdot dm^{-3}$, 200 $mg \cdot dm^{-3}$ i 300 $mg \cdot dm^{-3}$). Autorzy powyższego badania stwierdzili, że stres oksydacyjny w tkankach roślinnych to wynik udziału F^- w powstawaniu reaktywnych form tlenu (stąd wzrost aktywności peroksydaz). Z kolei w roślinie z gatunku soliród (*Salicornia brachiata*) rosnącej w kulturach hydroponicznych, aktywność POX w porównaniu z kontrolą malała wraz ze wzrostem stężenia NaF (50, 100 i 150 mM). Obserwację tę, autorzy pracy tłumaczyli prawdopodobnym zahamowaniem aktywności tego enzymu przez F^- (Streb i Feierabend 1996; Reddy i Kaur 2008).

Kwas L-askorbinowy stosuje się najczęściej w celu złagodzenia stresów suszy i zasolenia (Khan i Ashraf 2008; Dolatabadian i Jouneghani 2009). Większość danych literaturowych poświęca uwagę na stosowaniu Asc w uprawach hydroponicznych. W badaniach własnych zastosowanie kwasu L-askorbinowego 0,5; 1; 2 mM *in vitro* wpłynęło na obniżenie toksyczności wywołanej dodaniem 10 i 20 mM fluorku sodu. Wyniki badań zgodne są z wynikami innych autorów (Khan i Ashraf 2008; Dolatabadian i Jouneghani 2009), którzy zaobserwowali podobną zależność. W badaniach Shalata i Neumann (2001) zastosowanie 0,5 mM Asc wpłynęło na zwiększenie liczby siewek pomidora rosnących w warunkach stresu wywołanego dodatkiem 300 mM NaCl. Wyniki badań własnych również wykazały korzystny wpływ kwasu L-askorbinowego na zwiększenie wartości indeksu kiełkowania w pszenicy (*Triticum aestivum* L.) *in vitro*. Według Saeidi-Sar i in. (2013) oraz Bybordi (2012) stymulujący wpływ Asc na wzrost roślin wynika z faktu, że kwas L-askorbinowy bierze udział w regulacji wydłużania korzeni, wakuolizacji i ekspansji komórek.

Habib i in. (2008) stwierdzili, że egzogenny dodatek kwasu L-askorbinowego wpływa również znacząco na poprawę parametrów fizjologicznych i biochemicznych pszenicy poddanej stresowi solnemu. Badania własne potwierdziły, że kwas L-askorbinowy może obniżać zawartość wolnej proliny oraz MDA w liściach roślin rosnących z dodatkiem NaF, zarówno w doświadczeniu *in vitro* jak i w doświadczeniach wazonowych oraz w Hali Wegetacyjnej. Podobne wyniki badań zaobserwowano dla siewek pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) rosnących w warunkach stresu wywołanego obecnością ołowiu, w których dodatek 1 mM Asc zmniejszył zawartość proliny o 19%

(Krupa-Mańkiewicz i in. 2018). Inni autorzy (Amin i in. 2009; Terzi i in. 2015) przy stresie suszy odnotowywali zarówno spadek zawartości wolnej proliny w roślinach poddanych stresowi jak i wzrost zawartości tego związku w roślinach rosnących tylko z dodatkiem kwasu L-askorbinowego. Wyniki wielu doświadczeń wskazują na zwiększenie obrony antyoksydacyjnej roślin po dodaniu kwasu L-askorbinowego (Citterio i in. 1994; Cabo i in. 1996).

Egzogenne stosowanie kwasu L-askorbinowego wspomaga wytworzenie barwników asymilacyjnych, a tym samym łagodzi negatywne skutki stresu suszy (Malik i Ashraf 2012). Substancja ta aktywnie usuwa z komórek reaktywne formy tlenu, hamując tym samym degradację chlorofilu wynikającą z działania czynników stresowych (Ashraf 2009).

Saeidi-Sar i in. (2013) zaobserwowali, że fasola (*Phaseolus vulgaris* L.), traktowana Asc i GA₃ zawierała większe ilości chl a, chl b i karotenoidów. W doświadczeniu Khan i in. (2011) zauważono, że moczenie nasion pszenicy i ryżu w 100 mg·dm⁻³ kwasie L-askorbinowym wpłynęło na zwiększenie zawartości chlorofilu a i b oraz na poprawę wzrostu roślin. Natomiast Latif i in. (2016) badając stres wodny w doświadczeniu z kalafiorem (*Brassica oleracea* var. botrytis L.) nie stwierdzili zmian w zawartości chlorofilu a i b po zastosowaniu 75 mg·dm⁻³ i 150 mg·dm⁻³ Asc w formie moczenia nasion. Badania Malika i Ashrafa (2012) wykazało, że egzogenne stosowanie kwasu L-askorbinowego doglebowo (podlewanie roślin) wspomaga wytworzenie barwników asymilacyjnych, a tym samym łagodzi negatywne skutki stresu suszy. Wyniki badań własnych również wykazały wzrost zawartości barwników asymilacyjnych u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) w kombinacjach zawierających tylko kwas L-askorbinowy oraz w kombinacjach zawierających fluor i kwas L-askorbinowy w porównaniu z roślinami z kontroli.

W niniejszej pracy wszystkie trzy formy aplikacji kwasu L-askorbinowego obniżyły toksyczność wywołaną związkami fluoru u pszenicy. Farooq i in. (2012) po 10 godzinnym moczeniu nasion pszenicy w 0,2 mM Asc, wysianej następnie w warunkach stresu suszy, odnotowali obniżenie zawartości MDA, natomiast zawartość wolnej proliny w badanej tkance roślinnej wzrosła. Wzrost stężenia proliny spowodowany była tym, że aminokwas ten jest skutecznym osmoprotektantem i działa ochronne w warunkach niedoboru wody. W badaniach własnych wykazano, że zawartość wolnej proliny oraz MDA w roślinach moczonych w kwasie L-askorbinowym była niższa niż u roślin rosnących w glebie z fluorem. Podobnie oprysk pszenicy oraz podlewanie

0,5 mM Asc wpłynął na obniżenie ilości MDA oraz proliny. Taką samą zależność wykazali Zhang i in. (2019) w kukurydzy rosnącej w glebie zanieczyszczonej kadmem. W doświadczeniu tym zawartość MDA i proliny obniżyła się wraz ze wzrostem stężenia kwasu L-askorbinowego, w dawkach od 0,1 do 0,5 mM.

Dodatek kwasu L-askorbinowego (będącego głównym przeciwutleniaczem w roślinach) może wpływać na zmiany aktywności pozostałych przeciwutleniaczy (Dolatabadian i in. 2010; Agami 2014; Krupa-Mańkiewicz i in. 2015). W badaniach Aliego i in. (2018) zastosowanie 0,5 mM kwasu L-askorbinowego przed wysiewem wpłynęło na obniżenie aktywności katalazy oraz peroksydazy w fasoli mung (*Vigna radiata*) rosnącej w warunkach stresu suszy. Dolistne stosowanie kwasu L-askorbinowego według Amin i in. (2009) jest bardziej efektywne od stosowania dolistnego kwasu salicylowego. W badaniach Hafez i Gharib (2016) oprysk pszenicy 200 mg·dm⁻³ kwasem L-askorbinowym skutecznie obniżył stres wywołany suszą.

W niniejszej pracy aktywność zarówno katalazy jak i peroksydazy w roślinach rosnących w glebie z NaF została obniżona po zastosowaniu kwasu L-askorbinowego w każdej formie aplikacji oraz we wszystkich fazach rozwojowych pszenicy. W badaniach Khan i in. (2006) oprysk pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) kwasem L-askorbinowym nie wpłynął na aktywność POX i CAT w stresie solnym. Natomiast w badaniach Ahmad i in. (2014) dodatek Asc wpłynął na wzrost aktywności katalazy i peroksydazy u kukurydzy (*Zea mays*) poddanej stresowi cieplnemu. Również badania Bybordiego (2012) na bawełnie (*Gossypium hirsutum*) wykazały, że podlewanie 30 mM Asc obniża toksyczność stresu solnego. Natomiast dodatek 50 i 150 mg·dm⁻³ kwasu L-askorbinowego u pszenicy (*Triticum aestivum* L.) rosnącej w stresie solnym w warunkach hydroponicznych wpłynął na zmniejszenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych (katalazy i peroksydazy) (Rehman i in. 2008).

Wyniki badań własnych wykazały wzrost zawartości kwasu L-askorbinowego w liściach pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem NaF. Inni badacze, Bhargava i Bhardwaj (2010) stwierdzili początkowo spadek, a następnie wzrost zawartości kwasu askorbinowego w siewkach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). Był on wprost proporcjonalny do zawartości fluorków w podłożu. Podobne wyniki badań uzyskali Gupta i in. (2009), badając zawartość askorbinianu w liściach ryżu (*Oryza sativa* L.). W niniejszej pracy egzogenne zastosowanie tej witaminy, niezależnie od formy (doglebowo – etap III oraz moczenie nasion, podlewanie, oprysk – etap IV), wpłynęło na obniżenie zawartości kwasu-L askorbinowego w liściach roślin z kombinacji z NaF.

Natomiast w kombinacjach zawierających tylko kwas L-askorbinowy, wszystkie trzy formy aplikacji (moczenie, oprysk i podlewanie), wpłynęły na zwiększenie zawartości tej witaminy w pszenicy. W badaniach przeprowadzonych przez Zabalza i in. (2008) zaobserwowano, że na wzrost zawartości Asc w liściach roślin bardziej efektywnie może wpłynąć egzogenne zastosowanie prekursora kwasu L-askorbinowego – L-1,4 galokatonolaktonu - niż bezpośrednia aplikacja kwasu L-askorbinowego.

Rośliny poprzez system korzeniowy pobierają z gleby niezbędne do ich rozwoju specyficzne substancje chemiczne, dlatego też niezwykle ważnym jest badanie współzależności roślin wyższych i mikroorganizmów glebowych. (Dixon i Lamb 1990; Bielińska i in. 2004). Zmiany aktywności enzymów glebowych w strefie korzeniowej odzwierciedlają zaburzenia środowiska oddziałujące zarówno na glebę, jak i na rośliny (Styła 2018). Wyniki badań niniejszej pracy wykazały wpływ NaF w glebie na obniżenie aktywności enzymatycznej zarówno dehydrogenaz jaki i fosfataz. Aktywność dehydrogenaz była najniższa w glebie z dodatkiem 50 mM NaF (60,1% kontroli). W doświadczeniu przeprowadzonym przez Nowak i in. (2005) aktywność dehydrogenaz również została zahamowana przez związki fluoru lub zmniejszyła się wraz ze wzrostem stosowanych dawek NaF, a także wraz z czasem jego oddziaływania. W badaniach tych zaobserwowano, że niskie stężenia fluoru czasem stymulowały aktywność dehydrogenaz glebowych, ale ogółem obserwowano zahamowanie ich aktywności.

Otrzymane wyniki badań własnych, wskazały również negatywne oddziaływanie fluorków na aktywność fosfataz glebowych (poniżej 70%). Podobnie jak w przypadku dehydrogenaz, zarówno aktywność fosfataz zasadowych jak i kwaśnych, obniżała się wraz z czasem trwania eksperymentu i po 21 dniach w glebie z dodatkiem 50 mM NaF była najniższa. Nowak i in. (2005), podczas 50-dniowego doświadczenia, wykazali spadek aktywności fosfataz glebowych pod wpływem fluoru. Również Smolik i in. (2009) odnotowali spadek aktywności fosfataz glebowych wraz ze wzrostem stężenia fluoru w glebie. W doświadczeniu Chae i in. (2018) badano wpływ wybranych stężeń NaF na aktywność enzymatyczną fosfatazy kwaśnej, została ona obniżona do 63,06% po 20 dniach w porównaniu z próbą kontrolną. Telesiński i in. (2008), na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzili, że aktywność enzymatyczna, a zwłaszcza aktywność fosfatazy kwaśnej, może być dobrym indykatorem zanieczyszczenia gleb leśnych fluorem.

Jak wspomniano we wstępie kwas L-askorbinowy można zastosować w celu obniżenia toksyczności związków fluoru. Związek ten odgrywa ważną rolę w fizjologii

stresu roślinnego, a także w rozwoju roślin i detoksykacji reaktywnych form tlenu (Conklin 2001). W dotychczasowej literaturze przedmiotu brak jest doniesień na temat wpływu kwasu L-askorbinowego na aktywność enzymów glebowych.

Badane w pracy kombinacje z dodatkiem kwasu L-askorbinowego do gleby wraz z NaF oraz bez tego związku, cechowały się obniżoną aktywnością dehydrogenaz i fosfataz glebowych w porównaniu z glebą z kontroli. Datta i in. (2017) uznali że, obniżenie aktywności enzymatycznej gleby spowodowane jest bakteriostatycznym działaniem kwasu L-askorbinowego. Należy jednak podkreślić, że w niniejszej pracy po zastosowaniu doglebowym (egzogennym) zarówno 1 jak i 2 mM kwasu L-askorbinowego, pomimo obniżenia aktywności badanych enzymów glebowych, zauważono obniżenie toksyczności 25 i 50 mM NaF wobec pszenicy. Wykazano istotne obniżenie parametrów stresu oksydacyjnego (wolnej proliny, MDA, katalazy, peroksydazy) w każdym z trzech terminów pomiaru.

W literaturze przedmiotu dostępne są dane dotyczące wprowadzania do gleby innych substancji biologicznie czynnych. Gunes i in. (2005) w przeprowadzonym doświadczeniu podlewali kukurydzę poddaną stresowi solnemu, suszy – 0,5 mM kwasem salicylowym. Autorzy ci wykazali, że kwas salicylowy skutecznie łagodzi stres wyżej wymienionymi substancjami i ogranicza ich pobór przez korzenie roślinne. Stwierdzili oni, że kwas salicylowy może być stosowany jako regulator wzrostu w warunkach stresowych. Safikhan i in. (2018) wykazali korzystne działanie chitozanu dodanego do gleby w warunkach zasolenia gleby. Popa i in. (2008) wskazują na korzystny wpływ substancji dodanych do gleby takich jak np. polifenole oraz ligniny. W wyniku przemian biochemicznych zachodzących przy udziale mikroorganizmów glebowych mogą one prowadzić do wytworzenia związków korzystnych dla rozwoju roślin.

Podsumowując, wyniki niniejszych badań pozwoliły zaobserwować istotny wpływ fluorku sodu, na zmiany w metabolizmie roślin przede wszystkim wskazując na zachwianie równowagi oksydacyjnej. Dodatek kwasu L-askorbinowego wykazuje łagodzące działanie względem toksyczności wywołanej związkami fluoru w wybranych roślinach. Praca potwierdza obserwacje innych badaczy. Według Krupa-Małkiewicz i in. (2015) kwas L-askorbinowy może być skutecznie stosowaną substancją do ochrony roślin. Wyniki niniejszej pracy również wskazują na łagodzące działanie kwasu L-askorbinowego względem toksyczności wywołanej związkami fluoru w wybranych roślinach.

5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. 10 mM NaF ma negatywny wpływ na cechy morfologiczne oraz parametry biochemiczne 10-dniowych siewek badanych gatunków roślin w warunkach *in vitro*. Wśród badanych roślin trzy gatunki (jęczmień, rzodkiew, łubin) charakteryzują się zwiększoną tolerancją na NaF, natomiast pszenica, rzodkiewka, pomidor, lucerna i słonecznik są bardziej wrażliwe.
2. Egzogenne zastosowanie 0,5; 1 oraz 2 mM kwasu L-askorbinowego zmniejsza toksyczność wywołaną 10 i 20 mM NaF u pszenicy w warunkach *in vitro*.
3. Dogłębowo wprowadzony 1 i 2 mM kwas L-askorbinowy obniża toksyczność wywołaną 25 i 50 mM NaF u pszenicy w doświadczeniu wazonowym.
4. Obserwowane zmniejszenie toksyczności NaF po zastosowaniu kwasu L-askorbinowego u pszenicy rosnącej w warunkach *in vitro* jest podobne jak w doświadczeniu wazonowym.
5. Zastosowanie 1 i 2 mM kwasu L-askorbinowego wpływa na obniżenie aktywności badanych enzymów glebowych, a także w większość przypadków pogłębia stres wywołany 25 i 50 mM NaF w glebie.
6. Trzy formy aplikacji 0,5 mM kwasu L-askorbinowego redukuje toksyczność wywołaną przez 50 mM NaF u pszenicy, a najefektywniejszą formę aplikacji jest podlewanie.

6. Bibliografia

1. Agami R. A. 2014. Applications of ascorbic acid or proline increase resistance to salt stress in barley seedlings. *Biol. Plantarum*. 58 (2): 341–347.
2. Ahmad I., Maqsood A., Basra S., Wahid A. 2014. Exogenous application of ascorbic acid salicylic acid and hydrogen peroxide improves the productivity of hybrid maize at low temperature stress. *IJAB*. 16(4):182–190.
3. Ali Q., Javed M. T., Noman A., Haider M. Z., Waseem M., Iqbal, N., Perveen R. 2018. Assessment of drought tolerance in mung bean cultivars/lines as depicted by the activities of germination enzymes, seedling's antioxidative potential and nutrient acquisition. *Arch. Agron. Soil Sci*. 64 (1):84–102.
4. Alim H., Ahmad M.A., Munir I., Khan I., Mustafa G., Ullah I., Ahmad M.N., Khan H., Yasinzai M., Zia A. 2017. The effect of different concentrations of the fluoride ion on the growth and nutritional value of two elite genotypes of *Triticum aestivum*. *Fluoride*. 50: 143–150.
5. Allen R. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant. Physiol*. 107: 1049–1054.
6. Amin B., Mahleghah G., Mahmood H. M. R., Hossein M. 2009. Evaluation of interaction effect of drought stress with ascorbate and salicylic acid on some of physiological and biochemical parameters in okra (*Hibiscus esculentus* L.). *Res. J. Biol. Sci*. 4 (4): 380–387.
7. Amorima C.L., Maiaac A.S., Mesquitaad R.B.R., Rangela A.O.S.S., van Loosdrecht M.C.M, Tiritanbc M.E., Castroa P.M.L. 2014. Performance of aerobic granular sludge in a sequencing batch bioreactor exposed to ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin. *Water Res*. 50(1): 101–113.
8. Arnon D.J., Allen M.B., Whatley F. 1956. Photosynthesis by isolated chloroplast. *Bioch. Bioph. Acta*. 20: 449–461.
9. Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plantarum*. 85: 235–241.
10. Ashraf M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol. Adv*. 27: 84–93.
11. Barbero P., Beltrami M., Baudo R., Rossi D. 2001. Assessment of Lake Orta sediments phytotoxicity after limiting treatment. *J. Limnol*. 60: 269–276.

12. Barbier O., Arreola-Mendoza L., Del Razo L.M. 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 188: 319–33.
13. Barrios E. 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecol. Econ.* 64(2): 269–285.
14. Bartosz G. 2013. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Warszawa, PWN. 99–104.
15. Bates L.S. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* 39: 205–207.
16. Berbasova T., Nallur S., Sells T., Smith K. D., Gordon P. B., Tausta S. L., Strobel S. A. 2017. Fluoride export (FEX) proteins from fungi, plants and animals are 'single barreled' channels containing one functional and one vestigial ion pore. *PloS One.* 12(5): e0177096.
17. Bhargava D., Bhardawaj N. 2010. Effect of sodium fluoride on seed germination and seedling growth of *Triticum aestivum* var. Raj. 4083. *J. Phytol.* 4: 41–43.
18. Bhargava D., Bhardawaj N. 2011. Phytotoxicity of Fluoride on a Wheat Variety (*Triticum aestivum* var. Raj. 4083) and its Bioaccumulation at the Reproductive Phase. *Asian J. Exp. Sci.* 25(1): 37–40.
19. Bhat N., Jain S., Asawa K., Tak M., Shinde K., Singh, A., Gandhi N. Gupta V.V. 2015. Assessment of fluoride concentration of soil and vegetables in vicinity of zinc smelter, Debari, Udaipur, Rajasthan. *J. Clin. Diag Rs.* 9(10): ZC63–ZC66.
20. Bielińska E. J. 2005. Oznaczanie aktywności fosfataz. *Acta Agrophysica, Rozprawy i Monografie.* 3: 63–74.
21. Bielinska E. J., Domżał H., Wegorek T. 2004. Aktywność enzymatyczna industrioziemow wytworzonych z piasków na zalesionym zwałowisku kopalni siarki w zależności od gatunków drzew. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 501: 23–32.
22. Bielińska E. J., Mocek-Płóciński A. 2010. Impact of ecochemical soil conditions on selected heavy metals content in garden allotment vegetables. *Pol. J. Environ. Stud.* 19(5): 895–900.
23. Brocklehurst P. A., Dearman J., Drew R.L.K. 1984. Effects of osmotic priming on seed germination and seedling growth in leek. *Scientia Horticulturae* 24(3–4): 201–210.
24. Brzezińska M., Stępniewski W., Stępniewska Z., Przywara G. 2001. Effect of oxygen deficiency on soil dehydrogenase activity in a pot experiment with *Triticale* cv. Jago vegetation. *Int. Agrophys.* 15: 145–149.

25. Bybordi A. 2012. Effect of ascorbic acid and silicium on photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and fatty acid contents in canola exposure to salt stress. *JIA*. 11(10): 1610–1620.
26. Cabo R.C., Gonza-lez-Reyes J.A., Cordoba F., Navas P. 1996. Rooting hastened in onions by ascorbate and ascorbate free radical. *J. Plant Growth Regul.* 15:53–56.
27. Cai H., Dong Y., Peng C., Li Y., Xu W., Li D., Wana, X. 2017. Fluoride-induced responses in the chlorophyll content and the antioxidant system in tea leaves (*Camellia sinensis*). *Fluoride*. 50(1) :59–78.
28. Capron I., Corbineau F., Dacher F., Job C., Côme D., Job D. 2000. Sugarbeet seed priming: effects of priming conditions on germination, solubilization of 11-S globulin and accumulation of LEA proteins. *Seed Science Research*. 10(3): 243–254.
29. Chae Y., Cui R., Kim S. W., An G., Jeong S. W., An Y. J. 2018. Exoenzyme activity in contaminated soils before and after soil washing: β -glucosidase activity as a biological indicator of soil health. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 135: 368–374.
30. Chakrabarti S., Patra K. P. 2013a. Effect of sodium fluoride on seed germination, seedling growth and biochemistry of paddy (*Oryza Sativa* L.). *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 4(4): 540–544.
31. Chakrabarti S., Patra K. P. 2013b. Effect of fluoride on superoxide dismutase activity in four common crop plants. *Fluoride*. 46(2): 59–62.
32. Chance B., Maehly, A. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzym.* 2: 764–775.
33. Citterio S., Sgorbati S., Scippa S., Sparvoli E. 1994. Ascorbic acid effect on the onset of cell proliferation in pea root. *Physiol. Plant.* 92: 601–607.
34. Conklin P. L. 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant Cell Environ.* 24 (4): 383–394.
35. Cronin S. J., Manoharan V., Hedley M. J., Loganathan P. 2000. Fluoride: A review of its fate, bioavailability, and risks of fluorosis in grazed-pasture systems in New Zealand. *New Zeal. J. Agr. Res.* 43(3): 295–321.
36. Dar M.I., Naikoo M.I., Rehman F., Naushin F., Khan F. A. 2016. Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development [in Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies]. Springer. New Delhi, 155–166.

37. Datta R., Baraniya D., Wang Y. F., Kelkar A., Meena R.S., Yadav G. S., Formanek P. 2017. Amino acid: its dual role as nutrient and scavenger of free radicals in soil. *Sustainability*. 9 (8): 1402.
38. Datta J. K., Maitra, A., Mondal, N. K., Banerjee, A. 2012. Studies on the impact of fluoride toxicity on germination and seedling growth of gram seed (*Cicer arietinum* L. cv. Anuradha). *J. Stress Physiol. Biochem.* 8 (1) :194–202.
39. Davison A., Weinstein L.W. 1998. The effects of fluorides on plants. *Earth Isl. J.* 13: 257–64.
40. Dewdar M. D. H., Rady M. M. 2013. Induction of cotton plants to overcome the adverse effects of reclaimed saline soil by calcium paste and ascorbic acid applications. *AJAR*. 1 (2): 017–027.
41. Dixon R. A., Lamb C. J. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual review of plant biology*. 41 (1): 339–367.
42. Dolatabadian A., Jouneghani R. S. 2009. Impact of exogenous ascorbic acid on antioxidant activity and some physiological traits of common bean subjected to salinity stress. *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj Napoca*. 37 (2): 165–172.
43. Dolatabadian, A., Sanavy, S. A. M. M., Asilan, K. S. 2010. Effect of ascorbic acid foliar application on yield, yield component and several morphological traits of grain corn under water deficit stress conditions. *Not. Sci. Biol.* 2 (3): 45–50.
44. Dulcka J., Wasilewski J., Androsiuk P., Kellmann-Sopyła W., Głowacka K., Górecki R., Giełwanowska I. 2019. The effect of sodium fluoride on seeds germination and morphophysiological changes in the seedlings of the Antarctic species *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. and the Subantarctic species *Colobanthus apetalus* (Labill.) Druce. *Pol. Polar Res.* 40 (3): 225–272.
45. Dutkiewicz T. 1995. Formy ekspozycji człowieka na działanie czynników środowiska [w: *Środowisko i zdrowie*. Warszawa: Centrum Organizacji i Ekonomiki Ochrony Zdrowia]. Red. J.B. Karski, J. Pawlak. Warszawa, 107–113.
46. Elloumi N., Abdallah F.B, Mezghani I., Rhouma A. Boukhrisb M. 2005. Effect of fluoride on almond seedlings in culture solution. *Fluoride*. 38 (3):193–198
47. Evdokimova G. A. 2001. Fluorine in the soil of the White Sea Basin and bioindication of pollution. *Chemosphere*. 42: 35–43.
48. Eyini M., Sujanandini K., Pothiraj C., Jayakumar M., Kil B. S. 1999. Differential response of *Azolla microphylla* kaulf. And *Azolla filiculoides* Lam. to sodium fluoride. *J. Plant Biol.* 42 (4): 299–301.

49. Farooq M., Basra S. M. A., Wahid A., Khaliq A., Kobayashi N. 2009. Rice seed invigoration: a review [in: Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants]. Springer. Dijon, Francja, 137–175.
50. Farooq M., Cheema Z. A., Wahid A. 2012. Seed priming with boron improves growth and yield of fine grain aromatic rice. *Plant Growth. Regul.* 68 (2):189–201.
51. Fina B. L., Lupo M., Dri N., Lombarte M., Rigalli A. 2016. Comparison of fluoride effects on germination and growth of *Zea mays*, *Glycine max* and *Sorghum vulgare*. *J. Sci. Food Agric.* 96 (11): 3679–3687.
52. Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusak Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (4): 436–442.
53. Fujiwara T., O’Hagan D. 2014. Successful fluorine-containing herbicide agrochemicals. *J. Fluor. Chem.* 167: 16–29.
54. Gadi B.R., Pooja V. Ram A. 2012. Influence of NaF on seed germination, membrane stability and some biochemical content in *Vigna seedlings*. *J. Chem. Bio. Phy. Sci.* 2 (3): 1371–1378.
55. Gałęcka E., Jacewicz R., Mrowicka M., Florkowski A., Gałęcki P. 2008. Enzymy antyoksydacyjne – budowa, właściwości, funkcje. *Polski Merkuriusz Lekarski.* 25: 266–268.
56. Gallie D. R. 2013. L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica.* 1–24
57. Gautam R., Bhardawaj N. 2010. Bioaccumulation of fluoride in different plants parts of *Hordeum vulgare* (Barley) var. RD-2683 from irrigation water. *Fluoride.* 43(1): 57–60.
58. Gelmboldt V.O., Anisimov V.Yu., Shyshkin I.O., Fonari M.S., Kravtsov V. Ch. 2018. Synthesis, crystal structures, properties and caries prevention efficiency of 2-,3-,4-carboxymethylpyridinium hexafluorosilicates. *J. Fluor. Chem.* 205: 15–21.
59. Ghosh, D.; Xu, J. 2014. Abiotic stress responses in plant roots: A proteomics perspective. *Front. Plant. Sci.* 5 (6): 1–13.
60. Gill S. S., Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants *Plant Physiol. Biochem.* 48 (12): 909–930.

61. Gil-Sotres F., Trasar-Cepeda C., Leirós M. C., Seoane S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.* 37 (5): 877–887.
62. Giornal F., Pazenok S., Rodefeld L., Lui N., Vors J.P. Leroux F.R. 2013. Synthesis of diversely fluorinated pyrazoles as novel active agrochemical ingredients. *J. Fluor. Chem.* 152: 2–11.
63. Gramowska H. Siepak J. 2002. Wpływ poziomu fluorków na reakcje liści i igieł drzew miasta Poznania i okolic. 4: 455–478
64. Guan A., Li C., Huang G., Li H., Hao S., Xu Y., Xie Y., Li Z. 2014. Synthesis and fungicidal activity of fluorine-containing chlorothalonil derivatives. *J. Fluor. Chem.* 160: 82–87.
65. Gulzar S., Khan M.A. 2001. Seed germination of a halophytic grass *Aeluropus logopoides*. *Ann. Bot.* 87: 319–324.
66. Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Cicek N., Guneri E., Eraslan F., Guzelordu T. 2005. Effects of exogenously applied salicylic acid on the induction of multiple stress tolerance and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) *Arch. Acker Pflanzenbau Bodenkd.* 51(6): 687–695.
67. Gupta S., Banerjee S. Mondal S. 2009. Phytotoxicity of fluoride in the germination of paddy (*Oryza Sativa*) and its effect on the physiology and biochemistry of germinated seedlings. *Fluoride.* 42(2): 142–146.
68. Guri A. 1983. Variation in glutathione and ascorbic acid content among selected cultivars of *Phaseolus vulgaris* prior to and after exposure to ozone. *Can. J. Plant Sci.* 63: 733–737.
69. Habib A., Khan A., Ashraf M. 2008. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environ. and Experin. Botany.* 63(1-3): 224–231.
70. Hafez E. M., Gharib H. S. 2016. Effect of exogenous application of ascorbic acid on physiological and biochemical characteristics of wheat under water stress. *IJPP.* 10 (4): 579–596.
71. Hager A., Mayer-Berthenrath T. 1966. Isolation and quantitative determination of carotenoids and chlorophylls of leaves, algae and isolated chloroplasts using thin-layer chromatographic methods. *Planta.* 69: 198–217.
72. Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141(2): 312–322.

73. Hong Y., Hu H. Y., Xie X., Li, F. M. 2008. Responses of enzymatic antioxidants and non-enzymatic antioxidants in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to the allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) isolated from reed (*Phragmites communis*). *J. Plant Physiol.* 165 (12): 1264–1273.
74. Joshi M. Bhardwaj N. 2007. Impact of high fluoride content on flora and fauna in Bilwa Kanwarpura Village of Jaipur District. *Indian J. Ecol.* 34 (1): 73–75.
75. Kabata-Pendias A., Pendias H. 1999. *Biogeochemia Pierwiastków Śladowych*. PWN, Warszawa 45–47.
76. Kacperska A. 2002. Reakcje roślin na abiotyczne czynniki stresowe [w: *Fizjologia roślin*. Red. J. Kopcewicz, S. Lewak. PWN, Warszawa, 613–678.
77. Kaczmarek U., Kosior P. 2002. Uwalnianie jonów fluorkowych z wybranych materiałów do wypełnień. *Met Fluoru.* 9: 63–68.
78. Kaur G., Asthir, B. J. B. P. 2015. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol. Plant.* 59 (4): 609–619.
79. Kaya M. D., Okçu G., Atak M., Cıkkılı Y., Kolsarıcı Ö. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Eur. J. Agron.* 24 (4): 291–295.
80. Khan A. R., Ashraf M. D. 2006. Interactive effect of foliarly applied ascorbic acid and salt stress on wheat (*Triticum aestivum* L.) at the seedling stage. *Pak. J. Bot.* 38(5): 1407–1414.
81. Khan A., Ashraf M. 2008. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *EEB.* 63 (1-3): 224–231.
82. Khan T. A., Mazid M., Mohammad F. 2011. Role of ascorbic acid against pathogenesis in plants. *J. Stress Physiol. Biochem.* 7(3): 222–234.
83. Kim C.G., Power S.A., Bell J.N.B. 2003. Effects of cadmium and soil type on mineral and carbon. *Wat. Air and Soil Poll.* 145(1-4): 253–266.
84. Kim Y.; Chung, Y.S., Lee E., Tripathi P., Heo, S., Kim K.H. 2020. Root Response to Drought Stress in Rice (*Oryza sativa* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 21: 1513.
85. Kinnunen H., Holopainen T., Räisänen M.L., Kärenlampi L. 2003. Fluoride in birch leaves, ground vegetation, litter and humus in the surroundings of a fertilizer plant and apatite mine in Siilinjärvi - Eastern Finland. *Boreal Environ. Res.* 8: 85–92.
86. Kłyszajko-Stefanowicz L. 2003. *Ćwiczenia z biochemii*. (Warszawa: PWN). 23–27.

87. Koper J., Piotrowska A. 1999. Aktywność enzymatyczna gleby jako parametr jej żyzności wywołany systemem uprawy. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 467 (1) : 127–134.
88. Kostecki J., Fruzińska R. 2012. Ochrona gleb w świetle prawa krajowego i europejskiego. Zeszyty Naukowe. Inżynieria Środowiska/Uniwersytet Zielonogórski. 146 (26): 5–14.
89. Kostopoulou Z., Therios I., Roumeliotis E., Kanellis A. K., Molassiotis A. 2015. Melatonin combined with ascorbic acid provides salt adaptation in *Citrus aurantium* L. seedlings. Plant Physiol. Biochem. 86: 155–165.
90. Krupa-Małkiewicz M., Kruczek A., Pelc J., Smolik B., Ochmian I. 2018. Alleviating effects of ascorbic acid on lead toxicity in goji (*Lycium barbarum* L.) in vitro. Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment., Pisc., Zootech. 340 (45/1): 55–64.
91. Krupa-Małkiewicz M., Smolik B., Ostojski D., Sędzik M., Pelc J. 2015. Effect of ascorbic acid on morphological and biochemical parameters in tomato seedling exposure to salt stress. Environmental Protection and Natural Resources/Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych. 26 (2): 21–25.
92. Kumar A. K., Varaprasad P. Vijaya Bhaskara Rao A. 2009. Effect of Fluoride on Catalase, Guaiacol Peroxidase and Ascorbate Oxidase Activities in Two Varieties of Mulberry Leaves (*Morus alba* L.). Res. J. Earth. Sci. 1 (2): 69–73.
93. Kumar P. Rani M. 2010. Impact of Fluoride on Flora in and around Hindalco Industries Ltd.,Renukoot (India). J. Appl. Environ. Biol. Sci. 1 (5): 81–83.
94. Kumar T.S., Dhakaand K.P. Singh A. 2013. Effect of fluoride toxicity on the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) Int. J. Forestry Crop Improv. 4:59–62
95. Latif M., Akram N. A., Ashraf M. 2016. Regulation of some biochemical attributes in drought-stressed cauliflower (*Brassica oleracea* L.) by seed pre-treatment with ascorbic acid. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 91 (2): 129–137.
96. Lethin J., Shakil S.S.M., Hassan S., Sirijovski, N., Töpel M., Olsson O., Aronsson H. 2020. Development and characterization of an EMS-mutagenized wheat population and identification of salt-tolerant wheat lines. BMC Plant. Biol. 20: 15–18.
97. Li C., Zheng Y., Zhou J., Xu J., Ni D. 2011. Changes of leaf antioxidant system, photosynthesis and ultrastructure in tea plant under the stress of fluorine. Biol. Plantarum. 55: 563–566.

98. Li S., Smith K. D., Davis J. H., Gordon P. B., Breaker R. R., Strobel, S. A. 2013. Eukaryotic resistance to fluoride toxicity mediated by a widespread family of fluoride export proteins. *PNAS*. 110 (47): 19018–19023.
99. Lichtenchaler H.K, Wellburn A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Bioch. Soc. Trans.* 11: 591–592.
100. Liu K., Yuan C., Chen Y., Li H., Liu J. 2014. Combined effects of ascorbic acid and chitosan on the quality maintenance and shelf life of plums. *Sci. Hortic.* 176: 45–53.
101. Lück H. 1963. *Catalase*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. 885–894.
102. Machoy Z. 1990. Skutki oddziaływania fluorków na wybrane parametry u roślin. *26*: 1–78 .
103. Machoy Z., Cholewiński A., Zakrzewska H. 1994. Biologiczne zagrożenia zwierząt i roślin związkami fluoru na terenie Pomorza Zachodniego. [w: *Wkład nauk rolniczych w rozwój gospodarczy Pomorza Zachodniego*]. Materiały z Sesji Naukowej. Szczecin. 23: 79–83.
104. Macknight R. C., Laing W. A., Bulley S. M., Broad R. C., Johnson A. A., Hellens R. P. 2017. Increasing ascorbate levels in crops to enhance human nutrition and plant abiotic stress tolerance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 44: 153–160.
105. Małecka A., Tomaszewska B. 2005. Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. *PBK*. 32: 311–325.
106. Malik S., Ashraf M. 2012. Exogenous application of ascorbic acid stimulates growth and photosynthesis of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought. *Soil Environment*. 31 (1): 72–77.
107. Mesquita G.L., Tanaka F.A.O., Cantarella H., Mattos D. 2011. Atmospheric absorption of fluoride by cultivated species. Leaf structural changes and plant growth. *Wat. Air and Soil Poll.* 219 (1-4): 143–156.
108. Mezghani I., Elloumi N., Abdallah F.B., Chaieb M., Boukhrisb M. 2005. Fluoride accumulation by vegetation in the vicinity of a phosphate fertilizer plant in Tunisia. *Fluoride*. 38 (1): 69–75.
109. Miller J.E., Miller G.W. 1974. Effects of fluoride on mitochondrial activity in higher plants. *Physiol. Plant.* 32 (2): 115–121.

110. Mocek-Płóćiniak, A. 2010. Wykorzystanie aktywności enzymatycznej do oceny wpływu antropogenicznych zmian wywołanych przez metale ciężkie w środowisku glebowym. *Nauka Przyr. Technol.* 4 (6):86.
111. Møller I. M., Jensen P. E., Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 459–481.
112. Mondal N.K. 2017. Effect of fluoride on photosynthesis, growth and accumulation of four widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in India. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 144: 36–44
113. Morell S., Follmann H., De Tullio M., Haberlein I. 1997. Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Letters.* 414: 567–570.
114. Nakano Y., Asada K. 1980. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen-peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol.* 21: 1295–1307.
115. Nannipieri P., Bollag J.M. 1991. Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters. *J. Environ. Qual.* 20 (3): 510–517.
116. Nassif S.M.L., Perez S.D.A. 1997. Germination of amendoim-do-campo (*Pterogyne nitens* Tul.) seeds submitted to different conditions of water and salt stress. *Revista Brasileira de Sementes (Brazil).* 19 (2): 143–150.
117. Nawaz M. F., Bourrie G., Trolard F. 2013. Soil compaction impact and modelling. A review. *ASD.* 33(2): 291– 309.
118. Neri F., Kok D., Miller M.A., Smulevich G. 1997. Fluoride Binding in Hemoproteins: The Importance of the Distal Cavity Structure. *Biochemistry.* 36: 8947–8953.
119. Niu H., Zhan K., Xu W., Peng C., Hou C., Li Y., Hou R., Wan X., Cai H. 2020. Selenium treatment modulates fluoride distribution and mitigates fluoride stress in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Environ. Pollut.* 267: 115603.
120. Nowak J., Smolik B., Zakrzewska H. 2005. Relations between fluorine content in soil and inhibition of soil enzymes activity. *EJPAU:* 8 (2): 10–15.
121. Nowicka B., Kruk J. 2013. Reaktywne formy tlenu w roślinach – więcej niż trucizna. *Kosmos.* 62 (4): 583–596.
122. O'Hagan D. 2010. Fluorine in health care: Organofluorine containing blockbuster drugs. *J. Fluor. Chem.* 131 (1): 1071–1081.
123. Olko A., Kujawska M. 2011. Podwójna rola H₂O₂ w odpowiedzi roślin na działanie warunków stresowych. *Kosmos.* 60 (1-2): 161–171.

124. Pal K.C., Mondal N.K., Bhaumik R., Banerjee A., Datta J.K. 2012. Incorporation of fluoride in vegetation and associated biochemical changes due to fluoride contamination in water and soil: a comparative field study. *Ann. Environ. Sci.* 6: 123–139.
125. Pant S., Pant P., Bhiravamurthy P.V. 2008. Effects of fluoride on early root and shoot growth of typical crop plants of India. *Fluoride*. 41 (1): 57.
126. Parkhey S., Naithani S.C. Keshavkant S. 2014. Protein metabolism during natural ageing in desiccating recalcitrant seeds of *Shorea robusta*. *Acta Physiol. Plant.* 36: 1649–1659.
127. Pelc J., Smolik B., Krupa-Mańkiewicz M. 2017. Effect of sodium fluoride on some morphological and physiological parameters of 10-day-old seedlings of various plant species. *Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment., Pisc., Zootech.* 338 (44): 151–158.
128. Pelc J., Śnioszek M., Wróbel J., Telesiński A. 2020. Effect of Fluoride on germination, early growth and antioxidant enzymes activity of three winter wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. *Appl. Sci.* 10 (19): 69–71.
129. Petersen P.E., Lennon M.A. 2004. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community. Dent. Oral Epidemiol.* 32: 319–21.
130. Polkowska Ż., Diduch M. Namieśnik J. 2010. Oznaczanie stężeń jonów fluorkowych w próbkach wody pitnej z terenu miasta Malborka. *Ecological Chemistry and Engineerings.* 17 (3): 393–417.
131. Popa V.I., Dumitru M., Volf I., Anghel N. 2008. Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Ind. Crops Prod.* 27 (2): 144–149.
132. Puzanowska-Tarasiewicz H. Starczewska B., Kuźmicka L. 2008. Reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol.* 41 (4): 1007–1015.
133. Radha G., Bhardwaj N. 2010. Bioaccumulation of fluoride in different plant parts of *Hordeum vulgare* (barley) var. Rd-2683 from irrigation water. *Fluoride*. 43 (1): 57–60.
134. Rajesh K.Y.S., Bansal M., Singh A., Panday V., Raaz M. 2012. Effects of Fluoride Accumulation on Growth of Vegetables and Crops in Dausa District, Rajasthan, India. *ABR.* 3 (4): 14–16.

135. Rajković M. B., Novaković I. D. 2007. Determination of fluoride content in drinking water and tea infusions using fluoride ion selective electrode. *J. Agr. Sci.* 52(2): 155–168
136. Rajpolt B., Tomaszewska B. 2011. 1, Zanieczyszczenie środowiska gruntowo-wodnego fluorem na przykładzie Huty Aluminium w Skawinie [w: *Studia Rozprawy Monografie*] 172. Instytutu Gospodarki Surowcami Mineralnymi i Energią PAN. Kraków, 1895–6823.
137. Rakowski K. J. 1997. Hydrogen fluoride effects on plasma membrane composition and ATP-ase activity in needles of white pine (*Pinus strobus*) seedlings pretreated with 12 h photoperiod. *Trees Struct. Funct.* 11: 248–253.
138. Ram A., Pooja V., Gadi B.R. 2012. Influence of NaF on seed germination, membrane stability and some Biochemicals content in *Vigna seedlings*. *J. Chem. Bio. Phy. Sci.* 2 (3): 1371–1378.
139. Raza M. M., Ullah S., Tariq A. Z. I. Z., Abbas T., Yousaf M. M., Altay V., Ozturk M. 2019. Alleviation of salinity stress in maize using silicon nutrition. *Not. Botan. Horti. Agrobot. Cluj-Napoca.* 47(4): 1340–1347.
140. Reddy M.P., Kaur M. 2008. Sodium fluoride induced growth and metabolic changes in *Salicornia brachiata roxb.* *Wat. Air Soil Poll.* 188: 171–179.
141. Rehman S., Yun, S. J., Iqbal Z. 2008. Seed Germination or Seed Hatching? Germination Behavior of Korean Bramble (*Rubus coreanus Miquel*) Seeds. 123–124.
142. Reilly K., Han Y., Tohme J., Beeching J.R. 2001. Isolation and characterisation of a cassava catalase expressed during post-harvest physiological deterioration. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression.* 1518: 317–323.
143. Rout G.R., Samantaray S., Das P. 1997. Differential chromium tolerance among eight mung bean cultivars grown in nutrient culture. *J. Plant Nutr.* 20: 473–483.
144. Rubio-Casal A.E., Castillo J.M., Luque C.J., Figueroa M.E. 2003. Influence of salinity on germination and seeds viability of two primary colonizers of Mediterranean salt pans. *J. Arid. Environ.* 53: 145–154.
145. Sabal D., Khan T.I., Saxena R. 2006. Effect of sodium fluoride on cluster bean (*Cyamopsis tragonoloba*) seed germination and seedling growth. *Fluoride.* 39(3): 228–230.

146. Sachan P., Lal N. 2018. Effect of sodium fluoride on germination, seedling growth and photosynthetic pigments in *Cicer arietinum* L. and *Hordeum vulgare* L. MOJ Ecol. Environ. Sci. 3: 300–304.
147. Saeidi-Sar S., Abbaspour H., Afshari H., Yaghoobi S.R. 2013. Effects of ascorbic acid and gibberellin GA3 on alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Acta Physiol. Plant. 35: 667–677.
148. Safikhan S., Khoshbakht K., Chaichi M. R., Amini A., Motesarezadeh B. 2018. Role of chitosan on the growth, physiological parameters and enzymatic activity of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) in a pot experiment. J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants. 10: 49–58.
149. Saini P., Khan S., Baunthiyal M. 2013. Effects of fluoride on germination, early growth and antioxidant enzyme activities of legume plant species *Prosopis juliflora*. J. Environ. Biol. 34: 205–209.
150. Sala J. M., Lafuente M.T. 2000. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. Postharvest Biol. Technol. 20 (1): 81–89.
151. Saleh A.H., Abdel-Kader D.Z. 2003. Metabolic responses of two *Helianthus annuus* cultivars to different fluoride concentrations during germination and seedling growth stages. Egypt. Acad. J. Biol. Sci. 5(1): 43–54.
152. Sapek B. 2014. Nagromadzenie i uwalnianie fosforu w glebach—źródła, procesy, przyczyny. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. 14: 77–100 .
153. Shafiq S., Akram N. A., Ashraf M., Arshad A. 2014. Synergistic effects of drought and ascorbic acid on growth, mineral nutrients and oxidative defense system in canola (*Brassica napus* L.) plants. Acta Physiol. Plant. 36 (6): 1539–1553.
154. Shalata A., Neumann P.M. 2001. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. J. Exp. Bot. 52 (364): 2207–2211.
155. Sharma P., Dubey R.S. 2007. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. Plant Cell Rep. 26 (11): 2027–2038.
156. Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. J. Bot. 1–21.
157. Sharma, R., Kaur R. 2018. Insights into fluoride-induced oxidative stress and antioxidant defences in plants. Acta Physiol. Plant. 40: 1–14.

158. Singh M., Verna K. 2013. Influence of fluoride-contaminated irrigation water on physiological responses of poplar seedlings (*populusdeltoides*. clone-s7c15). *Fluoride*. 46 (2): 83–89.
159. Skupień-Wysocka K., Cholewiński A. 1998. Ocena wpływu fluorku sodowego na kiełkowanie i aktywność wybranych enzymów w siewkach grochu. *Metab. Fluoru*. 8: 174–177.
160. Smirnoff N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*. 78: 661–669.
161. Smolik B. Pelc J. 2017. Skuteczność zastosowania substancji biologicznie czynnych w łagodzeniu stresu wywołanego przez fluorek sodu na podstawie parametrów morfologicznych, biochemicznych i fizjologicznych u pszenicy jarej (*Triticum aestivum* L.) odmiany Bryza. *Agron. Sci.* 62: 27–35.
162. Smolik B., Nowak J., Klodka D., Szymczak J., Telesiński A. 2009. Ocena przydatności humusu w ograniczeniu niekorzystnego działania jonów fluorku na aktywność wybranych hydrolaz glebowych w doświadczeniu laboratoryjnym. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 537: 337–344.
163. Śnioszek M., Telesiński A., Biczak R., Płatkowski M., Pawłowska B., Wróbel J. 2019. Comparison of the effects of soil treatment with NaF and KF on antioxidant enzymes in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Fluoride*. 2: 199–208
164. Solovchenko A. E. 2013. Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae. *Russ. J. Plant Physiol.* 60 (1): 1–13.
165. Stockbridge R. B., Kolmakova-Partensky L., Shane T., Koide A., Koide, S., Miller C., Newstead S. 2015. Crystal structures of a double-barrelled fluoride ion channel. *Nature*. 525 (7570): 548–551.
166. Streb P., Feierabend J. 1996. Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rye leaves. *Botanica Acta*. 109: 125–132.
167. Stręk M., Telesiński A. 2015. Zmiana aktywności wybranych enzymów oksydoredukcyjnych wytwarzanych przez mikroorganizmy w glebie lekko zanieczyszczonej benzyną w obecności jonów selenu. *Ochr. Środ.* 37 (1): 43–47.
168. Styła K. 2018. <https://www.rolnikuj.pl/blog/aktywnosc-enzymatyczna-jako-wskaznik-jakosci-srodowiska-glebowego>

169. Sudhakar C., Lakshim A., Giridarakumar S. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Sci.* 161: 613–619.
170. Suekawa M., Kondo T., Fujikawa Y., Esaka M. 2017. Regulation of ascorbic acid biosynthesis in plants [in *Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance*]. Springer. 157–176.
171. Szymańska R., Strzałka K., 2010. Reaktywne formy tlenu w roślinach - powstawanie, dezaktywacja i rola w przekazywaniu sygnału. *Post. Biochem.* 56 (2): 182–190.
172. Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil. Biol. Biochem.* 1: 301–307
173. Tak Y., Asthir B. 2017. Fluoride-induced changes in the antioxidant defense system in two contrasting cultivars of *Triticum aestivum* L. *Fluoride.* 50: 324–333.
174. Telesiński A., Musik D., Smolik B., Kłódka D., Śnioszek M., Szymczak J., Zakrzewska H. 2008. Próba określenia zależności pomiędzy aktywnością enzymatyczną a zawartością fluoru w glebach leśnych w strefie oddziaływania emisji z Zakładów Chemicznych „Police” SA.” [w: *Ekotoksykologia w ochronie środowiska*]. Red. Kołczan B., Grabas K. 421–426.
175. Telesiński A., Smolik B., Skrzypiec N., Nowak J. 2009. Kształtowanie się aktywności katalazy i peroksydazy na tle zmian zawartości fluorków w roślinach fasoli i po wprowadzeniu do gleby różnych dawek NaF. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych.* 41: 219–226.
176. Terzi R., Kalaycioglu E., Demiralay M., Saglam A., Kadioglu A. 2015. Exogenous ascorbic acid mitigates accumulation of abscisic acid, proline and polyamine under osmotic stress in maize leaves. *Acta Physiol. Plant.* 37(3): 1–9.
177. Thalman A. 1968. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenase aktivität im Boden mittels Triphenyltetrazolium chlorid (TTC). *W Landwirtsch. Forsch.* 21: 249–251.
178. Venkatesh J., Park S. W. 2014. Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Botanical Studies.* 55 (1): 1–19.
179. Wang S.Y., Jiao H.J., Faust M. 1991. Changes in the activities of catalase, peroxidase and polyphenol oxidase in apple buds during bud break induced by thidiazuron. *J. Plant Growth Regul.* 10 (1–4): 33–39.
180. Weinstein L.H. 1977. Fluoride and plant life. *J. Occup. Environ. Med.* 19: 49–78.

181. Wilde L.G., Yu M. 1998. Effect of fluoride on superoxide dismutase (SOD) activity in germinating mung bean seedlings. *Fluoride*. 31 (2): 81–88
182. World Health Organization (WHO). 2004. Fluoride in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. 1–5.
183. Yadu B., Chandrakar V., Keshavkanta S. 2016. Responses of plants to fluoride: an overview of oxidative stress and defense mechanisms. *Fluoride*. 49 (3): 293–302.
184. Yu M.H. 1996. Effects of fluoride on growth and soluble sugars in germinating mung bean (*Vigna radiata*) seeds. *Fluoride*. 29: 3–6.
185. Zabalza A., Gálvez L., Marino D., Royuela M., Arrese-Igor C., González E. M. 2008. The application of ascorbate or its immediate precursor, galactono-1, 4-lactone, does not affect the response of nitrogen-fixing pea nodules to water stress. *J. Plant Physiol.* 165 (8): 805–12.
186. Zhang, K., Wang, G., Bao, M., Wang, L., Xie, X. 2019. Exogenous application of ascorbic acid mitigates cadmium toxicity and uptake in Maize (*Zea mays* L.). *Enviro. Sci. Poll. Res.*. 26 (19): 19261–19271.
187. Zhao B.Q., Zhang F.S., Li Z.J., Li F.C., Shi C.Y., Zhang J., Zhang X.C., Shen J.Q., Pan H.J., Zhao J.M. 2003. The vertical distribution and its change of root quantity and activity of the inter-planted winter wheat. *Plant Nutr. Fertil. Sci.* 9: 214–219.