

Anna KRZEPIŁKO¹ i Iwona ZYCH-WĘŻYK¹

WPŁYW PREPARATU KARATE 025EC NA STĘŻENIE GRUP TIOLOWYCH W EKSTRAKCIE Z SIEWEK RZODKIEWKI *Raphanus sativus* L.

EFFECT OF THE PESTICIDE KARATE ON THE THIOL GROUP CONTENT OF RADISH (*Raphanus sativus* L.) SEEDLING EXTRACT

Abstrakt: Siewki rzodkiewki, ze względu na ich wrażliwość na czynniki środowiskowe, często wykorzystuje się jako organizmy modelowe w badaniach ekotoksykologicznych. Pyretroidy są jedną z najczęściej stosowanych grup insektycydów, mogą powodować zakłócenia metabolizmu chronionych roślin lub roślin następczych. Celem prezentowanej pracy było określenie wpływu lambda-cyhalotryny, aktywnego składnika preparatu Karate 025EC, na zawartość grup tiolowych w związkach obecnych w ekstrakcie z siewek rzodkiewki. W ekstraktach oznaczono białko metodą Lowry i stężenie grup tiolowych za pomocą odczynnika Ellmana zawierającego kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) według metody Rice-Evans z modyfikacjami Bartosza. Stwierdzono, że siewki rzodkiewki są wrażliwe na lambda-cyhalotrynę, związek ten hamował wzrost siewek, a efekt jego działania zależy od czasu hodowli i stężenia substancji aktywnej. Zawartość grup tiolowych w ekstrakcie z czterodniowej hodowli rosnących w obecności pyretroidu była zbliżona do kontroli. W 6-dniowych próbkach z pyretroidem zawartość grup –SH zwiększała się. W próbkach o największym zastosowanym stężeniu lambda cyhalotryny 0,1% stężenie grup –SH było o około 60% wyższe niż w obiekcie kontrolnym. Wzrost stężenia grup tiolowych obserwowany w prezentowanej pracy może sugerować uruchomienie mechanizmów obronnych komórki.

Słowa kluczowe: pyretroidy, *Raphanus* sp., grupy tiolowe

W badaniach ekotoksykologicznych wykorzystuje się różne organizmy modelowe, między innymi siewki rzodkiewki, gdyż one są wrażliwe na czynniki środowiskowe [1, 2]. Środki ochrony roślin oprócz korzystnych dla gospodarki człowieka skutków mogą też powodować niekorzystne zmiany w środowisku. Jedną z najczęściej stosowanych grup insektycydów są pyretroidy. Związki te są estrami alkoholi pierwszo- lub drugorzędowych (zawierającymi przynajmniej jedno wiązanie podwójne) i kwasu chryzantemowego (*kwasu 3-(2,2-dimetylowinylo)-2,2-dimetylocyklopropanokarboksylowego*) lub halogenowych analogów tego kwasu [3]. Pyretroidy mogą powodować zakłócenia metabolizmu chronionych roślin lub roślin następczych.

Celem prezentowanej pracy było określenie wpływu lambda-cyhalotryny, aktywnego składnika preparatu Karate 025EC, na zawartość grup tiolowych w związkach występujących w ekstrakcie z siewek rzodkiewki. Grupy tiolowe występują w cysteinie, glutationie, homocysteinie, koenzymie Q, koenzymie A i białkach będących budulcem wielu struktur komórkowych [4]. Grupa tiolowa glutationu ze względu na swoją reaktywność uczestniczy w neutralizacji reaktywnych form tlenu, utrzymuje grupy tiolowe białek w stanie zredukowanym, bierze udział w detoksykacji związków elektrofilowych i reakcja ta jest jednym z podstawowych mechanizmów detoksykacji ksenobiotyków [5].

¹ Katedra Biochemii i Chemii Środowiskowej, Wydział Nauk Rolniczych w Zamościu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Szczepieńska 102, 22-400 Zamość, tel. 84 677 27 24, fax 84 639 60 39, email: anna.krzepilko@up.lublin.pl

Material i metody

Nasiona rzodkiewki *Raphanus sativus* L. odmiany Rowa zakupiono z Przedsiębiorstwa Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa S.A. Torseed w Toruniu. Nasiona kiełkowały na szalkach Petriego wyłożonych bibułą filtracyjną, w naturalnych warunkach oświetlenia, w temperaturze 22°C, bez dodatku składników odżywczych [6]. W doświadczeniu wykorzystano handlowy preparat Karate 025 EC, który zawiera substancję aktywną lambda-cyhalotrynę o stężeniu 25%. Nasiona kiełkujące w obecności wody stanowiły obiekt kontrolny, natomiast w próbkach z preparatem Karate 025EC zastosowano wodne roztwory tego pestycydu o zawartości substancji aktywnej lambda-cyhalotryny od 0,005% do 0,1%. Siewki zbierano po 4 i 6 dniach od rozpoczęcia doświadczenia.

Wodne ekstrakty z hypokotyli siewek rzodkiewki przygotowano wg metody opisanej w pracy Zielińskiego i Kozłowskiej [7]. W ekstraktach oznaczono białko metodą Lowry [8] i stężenie grup tiolowych za pomocą odczynnika Ellmana zawierającego kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) według metody Rice-Evans z modyfikacjami Bartosza [9]. Stężenie grup tiolowych w próbce wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej dla glutationu i wyrażono w ekwiwalencie mmol GSH · mg⁻¹ białka.

Wyniki, ich omówienie i analiza

Preparat Karate 025EC, zawierający lambda-cyhalotrynę, hamował wzrost siewek rzodkiewki, a efekt jego działania zależał od czasu hodowli i stężenia substancji aktywnej. Zaobserwowano zmiany nekrotyczne na korzeniach siewek rzodkiewki ze względu na bezpośrednią styczność z bibułą nasączoną tym pyretroidem. Lambda-cyhalotryna powodowała zahamowanie wzrostu hypokotyli siewek (tab. 1), a efekt jej działania zależy od czasu hodowli i stężenia substancji aktywnej. Siewki rozwijające się w obecności lambda-cyhalotryny miały mniejszą długość hypokotyli niż w próbce kontrolnej.

Tabela 1
Wpływ preparatu Karate 025EC na długość hypokotyli i zawartość grup tiolowych w ekstrakcie z siewek rzodkiewki (*Raphanus sativus* L.).

Table 1
The effect of Karate 025EC on hypocotyl length and thiol group content of extract of radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings

Czas [dni] Time [day]	Stężenie lambda-cyhalotryny [%] Lambda-cyhalothrin concentration [%]				
	0	0,005	0,01	0,05	0,1
Długość hypokotyli w siewkach rzodkiewki [% kontroli] Hypocotyl length of radish seedlings [% of control]					
4	100%	100 (±25,59)	66,67 (±54,38)	40,61 (±23,21)	13,33 (± 15,58)
6	100%	72,16 (±19,49)	56,47 (±26,55)	8,24 (±14,00)	0,78 (±1,65)
Zawartość grup tiolowych w ekstrakcie z siewek rzodkiewki [mmol GSH · mg ⁻¹ białka] Thiol group content of extract of radish seedlings [mmol GSH · mg ⁻¹ protein]					
4	166,71 (±23,24)	175,34 (±7,64)	149,27 (±31,21)	160,43 (±27,32)	160,00 (±24,62)
6	164,07 (±63,37)	187,81 (±43,25)	194,80 (±41,95)	240,57 (±50,49)	262,28 (±43,33)

Zastosowanie największego stężenia tego pyretroidu 0,1% działa toksycznie, hamuje wzrost hypokotyli o około 87% w 4 dniu hodowli i 99% w 6 dniu hodowli w porównaniu

do obiektu kontrolnego. Także inne pestycydy, jak HCH [10], cypermetryna [11], powodowały zahamowanie wzrostu siewek. Ponadto stwierdzono, że pyretroidy mogą też negatywnie oddziaływać na dojrzałe morfologicznie rośliny: cypermetryna powodowała nieprawidłową mitozę w tkance merystematycznej *Vicia faba* [12], natomiast deltametametryna wywoływała aberracje chromosomowe u *Allium cepa* [13].

Komórki roślinne mają zdolność do skutecznej detoksykacji ksenobiotyków, co wiąże się ze zjawiskiem odporności na herbicydy i fitoremediacją. Czynniki środowiskowe modyfikują zawartość antyoksydantów w warunkach stresu u roślin [14]. Wiele enzymów biorących udział w ochronie antyoksydacyjnej komórki nie może funkcjonować bez związków zawierających grupy tiolowe [15]. Tworzą one tzw. system antyoksydacyjny, czyli komórki zależne od związków zawierających grupy tiolowe.

Zawartość grup tiolowych w ekstrakcie z czterodniowej hodowli rosnących w obecności pyretroidu było zbliżone do kontroli (tab. 1). W 6-dniowych próbkach z pyretroidem zawartość grup –SH zwiększała się. W próbach o najwyższym zastosowanym stężeniu lambda - cyhalotryny 0,1% stężenie grup SH było o około 60% większe niż w obiekcie kontrolnym. Wzrost stężenia grup tiolowych obserwowany w prezentowanej pracy może sugerować uruchomienie mechanizmów obronnych komórki. Jednymi z ważniejszych enzymów detoksykacji u roślin są polisubstratowe monooksygenazy zawierające molekuly cytochromu P-450 i reduktazy NADPH-cytochrom P-450. W budowie cytochromu P-450 występuje grupa tiolowa. Izoenzymy cytochromu P-450 mogą ulegać indukowanej syntezie między innymi pod wpływem pewnych pestycydów [16]. Glutation jest głównym donorem grup tiolowych w procesach detoksykacji [9]. Wiele pestycydów nie reaguje bezpośrednio ze zredukowanym glutationem, a jednak powodują one zmiany jego stężenia w komórce [17]. Problem ten jest szeroko opisywany dla komórek zwierzęcych, gdyż jego zrozumienie może być przydatne w badaniu etiologii chorób neurodegeneracyjnych czy leczeniu zatruc u ludzi wywołanych przez pyretroidy. Cypermetryna powodowała wzrost aktywności enzymu GST w komórkach wątrobowych szczura, natomiast stężenie GSH spadało, ponieważ molekula ta uczestniczyła w procesie detoksykacji poprzez tworzenie kompleksu z cypermetryną [18]. Objawy stresu oksydacyjnego w komórkach zwierząt wywoływane przez pyretroidy zależą od wielu czynników [19]. Pyretroidy mogą powodować przyrost stężenia glutationu w komórkach, co jest interpretowane jako przejaw wzmożonej reakcji obronnej systemu antyoksydacyjnego komórki. Literatura dostarcza też przykładów na obniżenie stężenia glutationu w komórkach poddanych działaniu pyretroidów, co z kolei sugeruje wyczerpywanie się rezerw antyoksydantów i zdolności ochrony komórek na skutek długotrwałego oddziaływania tych toksyn [20].

Literatura

- [1] Kim D.O., Lee K.W., Lee H.J. i Lee C.Y.: *Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals*. J. Agric. Food Chem., 2002, **50**, 3713-3717.
- [2] Wieczorek J., Wieczorek Z. i Olszewski J.: *Wrażliwość rzodkiewki (*Raphanus sativus* L.) i sałaty (*Lactuca sativa* L.) na niskie stężenia antracenu podawanego dolistnie*. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 2004, **496**, 527-536.
- [3] Nasuti C., Cantalamessa F., Falcioni G. i Gabbianelli R.: *Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats*. Toxicology, 2003, **191**, 233-244.
- [4] Berg J.M., Tymoczko J.L. i Stryer L.: *Biochemia*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2007.

- [5] Bukowska B.: *Funkcje glutationu oraz czynniki zmniejszające jego stężenie*. Med. Pracy, 2005, **56**(1), 69-80.
- [6] Barillari J., Canistro D., Paolini M., Ferroni F., Pedulli G.F., Iori R. i Valgimigli L.: *Direct Antioxidant Activity of Purified Glucoerucin, the Dietary Secondary Metabolite Contained in Rocket (Eruca sativa Mill.) Seeds and Sprouts*. J. Agric. Food Chem., 2005, **53**, 2475-2482.
- [7] Zieliński H. i Kozłowska H.: *Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions*. J. Agric. Food Chem., 2000, **48**, 2008-2016.
- [8] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. i Randall R.J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem., 1951, **193**, 265-275.
- [9] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2003.
- [10] Bidlan R., Asfar M. i Manonmani H.K.: *Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination*. Chemosphere, 2004, **56**, 803-811.
- [11] Krzepińko A. i Jeleń A.: *Wpływ preparatu Cyperkill Super 25EC na całkowitą zdolność antyoksydacyjną ekstraktu z siewek rzodkiewki (Raphanus sativus L.)*. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 2009, **542**(1), 297-303.
- [12] Amer S.M. i Aboul-Ela E.I.: *Cytogenetic effects of pesticides. III. Induction of micronuclei in bone marrow by the insecticides cypermethrin and rotenone*. Mutat. Res., 1985, **155**, 135-142.
- [13] Chauhan L.K.S., Dikshith T.S.S. i Sundoraraman V.: *Effects of deltamethrin on plant cell I. cytological effects on the root meristems of A. cepa*. Mutat. Res., 1986, **171**, 25-30.
- [14] Łata B.: *Mechanizmy chroniące roślinę przed stresem oksydacyjnym, wywołanym niekorzystnymi warunkami środowiska*. Post. Nauk Roln., 1998, **6**, 115-132.
- [15] Netto L.E.S., Chae H.Z., Kang S.W., Rhee S.G. i Stadtman E.R.: *Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity*. J. Biol. Chem., 1996, **271**(26), 15315-15321.
- [16] Zemleduch A. i Tomaszewska B.: *Komórkowy system detoksykacji zanieczyszczeń organicznych u roślin*. Post. Biol. Komór., 2007, **34**, 635-649.
- [17] Elskens M.T. i Penninckx M.J.: *Thiram and dimethyldithiocarbamic acid interconversion in Saccharomyces cerevisiae: a possible metabolic pathway under the control of the glutathione redox cycle*. Appl Environ. Microbiol., 1997, **63**(7), 2857-2862.
- [18] Grajeda-Cota P., Ramirez-Mares M.V. i Gonzalez de Mejia E.: *Vitamin C protects against in vitro cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes*. Toxicol. in Vitro, 2004, **18**, 13-19.
- [19] Krzepińko A.: *Znaczenie reakcji wolnorodnikowych w toksyczności insektycydów dla organizmów ssaków*. Post. Nauk Roln., 2010, **2**, 151-161.
- [20] Krzepińko A.: *System antyoksydacyjny a toksyczność pyretroidów*. Post. Nauk Roln., 2007, **1**, 93-103.

EFFECT OF THE PESTICIDE KARATE ON THE THIOL GROUP CONTENT OF RADISH (*Raphanus sativus* L.) SEEDLING EXTRACT

Faculty of Agricultural Sciences in Zamosc, University of Life Sciences in Lublin

Abstract: Radish seedlings, due to their sensitivity to environmental factors, are often used as model organisms in ecotoxicological research. Pyrethroids, which are one of the most frequently used groups of insecticides, can cause disturbances in the metabolism of the crops being protected or succeeding crops. The aim of this study was to determine the influence of lambda-cyhalothrin, the active ingredient in the pesticide Karate 025EC, on thiol group content in compounds occurring in radish seed extract. Protein in the extracts was determined by the Lowry method and thiol group concentration was measured using Ellman's reagent, containing 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), according to the Rice-Evans method modified by Bartosz. The radish seedlings were found to be sensitive to lambda-cyhalothrin. The compound inhibited seedling growth, with its effect dependent on growth time and on the concentration of the active substance. Thiol group content in the extract from the 4-day culture growing in the presence of the pyrethroid was similar to the control. In the 6-day samples with the pyrethroid, content of -SH groups increased. In the samples with the highest concentration of lambda-cyhalothrin, 0.1%, the concentration of -SH groups was about 60% higher than in the control. The increase in thiol group concentration observed in this study may indicate activation of cellular defence mechanisms.

Keywords: pyrethroids, *Raphanus* sp., thiol group