

Barbara HERMAN¹, Robert BICZAK¹ i Piotr RYCHTER¹

REAKCJA FASOLI SZPARAGOWEJ NA HERBICYD 1,10-FENANTROLINE

FRENCH BEAN REACTION ON HERBICIDE 1,10-PHENANTHROLINE

Abstrakt: W przeprowadzonych badaniach określono wpływ herbicydu fotodynamicznego 1,10-fenantroliny (1,10-Phe), o stężeniach 2,5; 7,5 i 10,0 mM, na aktywność katalazy (EC 1.11.1.6) i peroksydazy (EC 1.11.1.7) oraz zawartość chlorofilu całkowitego i karotenoidów w liściach fasoli szparagowej (*Phaseolus vulgaris* L., cv Złota Saxa). Rośliny traktowane 1,10-Phe charakteryzowały się wyższą aktywnością peroksydazy i niższą aktywnością katalazy niż rośliny nietraktowane tym związkiem. Poziom chlorofilu całkowitego i karotenoidów w liściach fasoli szparagowej także uzależniony był od zastosowanych stężeń 1,10-Phe. Rośliny opryskane 1,10-Phe o mniejszych stężeniach cechowały się podwyższonym poziomem chlorofilu całkowitego, podczas gdy największe stężenie 1,10-Phe wywołało spadek zawartości chlorofilu w odniesieniu do roślin kontrolnych. Przy wyższych stężeniach tego herbicydu wystąpił ponadto wzrost zawartości karotenoidów w liściach roślin.

Słowa kluczowe: herbicydy, 1,10-fenantrolina, aktywność enzymów, chlorofil, karotenoidy

Środki ochrony roślin mają olbrzymie znaczenie w powiększaniu efektywności i jakości produkcji rolnej. Na całym świecie stosuje się rocznie około 2,5 mln Mg (ton) pestycydów. 50÷60% stosowanych pestycydów stanowią środki chwastobójcze, które są szeroko wykorzystywane w rolnictwie [1]. Chociaż herbicydy przyczyniają się do ochrony roślin, obecność ich w żywności lub środowisku budzi powszechny niepokój. Stosowanie herbicydów może mieć ponadto negatywny wpływ na rośliny inne niż docelowe, np. rośliny uprawne [2].

Negatywne oddziaływanie herbicydów na rośliny uprawne może mieć różny zakres i charakter, co w dużej mierze uzależnione jest od budowy i właściwości chemicznych aktywnego związku. 1,10-fenantrolina (1,10-Phe) jest heterocyklicznym związkiem azotowym o wysokiej aktywności biologicznej [3, 4]. W badaniach nad 1,10-Phe jako herbicydem fotodynamicznym stwierdzono, że aktywność herbicydowa tego związku uwarunkowana jest obecnością dwóch atomów azotu i ich położeniem w pozycji 1 i 10 [5]. Herbicydy fotodynamiczne, takie jak 1,10-Phe i inne chelatory metali typu pirydynowego (2,2'-dipirydył, 8-hydroksychinolina), powodują w ciemności akumulację fotodynamicznie aktywnych porfiryn (protoporfiryna IX, magnezoporfiryna IX, protochlorofilid), porfiryny te, po ekspozycji roślin na światło, indukują produkcję *reaktywnych form tlenu* (RFT), co w konsekwencji prowadzić może do uszkodzenia, a nawet śmierci rośliny [6, 7].

RFT, takie jak anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), nadtlenuk wodoru (H_2O_2) oraz tlen singletowy (1O_2), mogą prowadzić do strukturalnych i funkcjonalnych zmian lipidów, białek, chlorofilu i kwasów nukleinowych [8]. Rośliny wytworzyły szereg systemów obronnych, które chronią je przed szkodliwym działaniem RFT, w tym antyoksydacyjne enzymy (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza

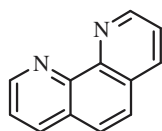
¹ Katedra Biochemii i Technologii Bioproduktów, Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie, al. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa, tel. 34 361 51 54, fax 34 366 53 22, email: b.herman@ajd.czest.pl, r.biczak@ajd.czest.pl, p.rychter@ajd.czest.pl

i reduktaza glutationowa) oraz nieenzymatyczne antyoksydanty małowymolekularne (kwas askorbinowy, glutation, karotenoidy, α -tokoferol) [8, 9].

Celem przeprowadzonych badań była ocena zmian aktywności katalazy i peroksydazy oraz zawartości chlorofilu całkowitego i karotenoidów w liściach fasoli szparagowej pod wpływem herbicydu 1,10-fenantroliny stosowanego w okresie wegetacji roślin.

Metodyka badań

W przeprowadzonym eksperymencie wazonowym fasolę szparagową (*Phaseolus vulgaris* L) odmiany Żłota Saxa wysiano w pierwszej połowie czerwca do wazonów plastikowych o pojemności około 5 dm³ napełnionych ujednocioną glebą brunatną o pH (KCl) 6,6 i zawartości próchnicy około 1,7%. Po wzejściu fasoli ilość roślin zredukowano do 5 sztuk na wazon. We wszystkich wazonach utrzymywano stałą wilgotność podłoża, na poziomie 70% ppw. W pierwszej połowie lipca rośliny jednorazowo opryskano roztworami 1,10-fenantroliny o stężeniach 2,5; 7,5 i 10,0 mM w ilości 3 cm³ roztworu na roślinę.



1,10-fenantrolina (1,10-Phe)

Materiał roślinny do oznaczenia aktywności enzymatycznej peroksydazy i katalazy oraz zawartości chlorofilu i karotenoidów pobierano czterokrotnie w odstępach 1-tygodniowych (7, 14, 21 i 28 dzień po oprysku). Wyciągi do badań enzymatycznych przygotowano poprzez homogenizację świeżego materiału roślinnego w schłodzonym buforze fosforanowym o ściśle określonym pH. Aktywność peroksydazy (EC 1.11.1.7) oznaczono z *o*-dianizydyną jako H-donor [10]. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 450$ nm w odstępach 15 s w okresie 3 min, wyniki przedstawiono jako przyrost absorbancji. Aktywność katalazy (EC 1.11.1.6) oznaczono poprzez określenie ilości rozłożonego H₂O₂ w czasie [11]. Zawartość chlorofilu całkowitego i karotenoidów w świeżym materiale roślinnym oznaczano metodą spektrofotometryczną [12].

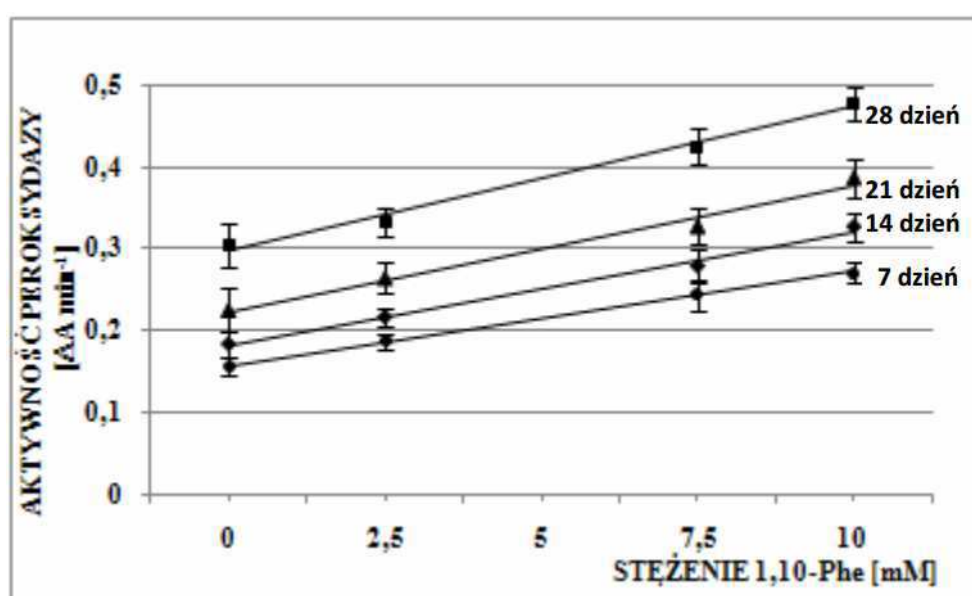
Dane zostały zanalizowane statystycznie jako odchylenia standardowe średniej. Do opisu zależności pomiędzy aktywnością enzymów a stężeniem fenantroliny zastosowano funkcję liniową.

Wyniki badań

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że 1,10-fenantrolina (1,10-Phe) w zakresie przebadanych stężeń (2,5÷10,0 mM) spowodowała istotne zmiany aktywności peroksydazy i katalazy w liściach fasoli szparagowej (rys. 1 i 2). Jednocześnie stwierdzono wzrost aktywności peroksydazy i spadek aktywności katalazy w miarę postępującej wegetacji roślin. 1,10-Phe działała stymulująco na aktywność peroksydazy i jednocześnie inhibitowała aktywność katalazy. Zmiany aktywności badanych enzymów w dużym stopniu uzależnione były od zastosowanego stężenia związku.

Aktywność peroksydazy w liściach fasoli szparagowej była tym większa, im wyższe było stężenie 1,10-Phe, podczas gdy aktywność katalazy systematycznie się obniżała wraz

ze wzrostem stężenia tego herbicydu. Rośliny potraktowane 1,10-Phe o stężeniu 2,5 mM cechowały się o około 15% wyższą aktywnością peroksydazy i jednocześnie niższą aktywnością katalazy, średnio o 18% w odniesieniu do roślin kontrolnych, nietraktowanych tym herbicydem. Przy najwyższym z zastosowanych stężeń 1,10-Phe (10 mM) stwierdzono natomiast aż 68% wzrost aktywności peroksydazy, czemu odpowiadało 49% obniżenie aktywności katalazy w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Pomiędzy aktywnością katalazy i peroksydazy a stężeniem 1,10-Phe stwierdzono liniowe zależności (rys. 1 i 2).



Rys. 1. Zależność pomiędzy aktywnością peroksydazy w liściach fasoli szparagowej a stężeniem 1,10-fenantroliny (7, 14, 21 i 28 dni po traktowaniu). Linie pionowe przedstawiają odchylenia standardowe średniej. Równania regresji liniowej i współczynników korelacji dla poszczególnych terminów analiz:

$$7 \text{ dzień: } y = 0,0114x + 0,1571, R = 0,999$$

$$14 \text{ dzień: } y = 0,0348x + 0,1464, R = 0,992$$

$$21 \text{ dzień: } y = 0,0385x + 0,1850, R = 0,985$$

$$28 \text{ dzień: } y = 0,0440x + 0,2530, R = 0,992$$

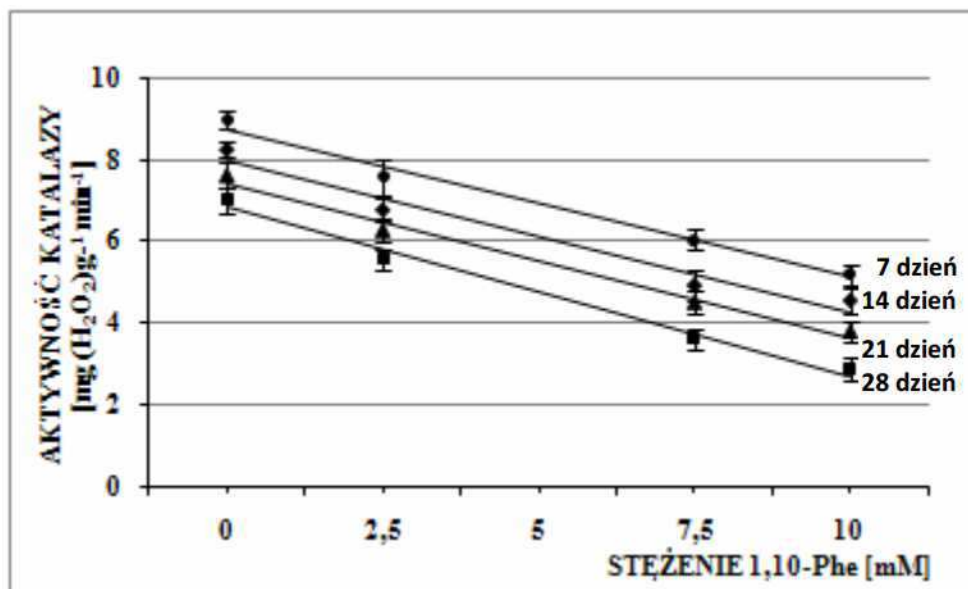
Fig. 1. Relationship between peroxidase activities in French bean leaves and concentration of 1,10-phenanthroline (7, 14, 21, 28 days after treatment). The vertical bars represent the standard deviation of the mean. Linear regression equations and correlation coefficients is present below:

$$7^{\text{th}} \text{ day: } y = 0,0114x + 0,1571, R = 0,999$$

$$14^{\text{th}} \text{ day: } y = 0,0348x + 0,1464, R = 0,992$$

$$21^{\text{th}} \text{ day: } y = 0,0385x + 0,1850, R = 0,985$$

$$28^{\text{th}} \text{ day: } y = 0,0440x + 0,2530, R = 0,992$$



Rys. 2. Zależność pomiędzy aktywnością katalazy w liściach fasoli szparagowej a stężeniem 1,10-fenantroliny (7, 14, 21 i 28 dni po traktowaniu). Linie pionowe przedstawiają odchylenia standardowe średniej. Równania regresji liniowej i współczynników korelacji dla poszczególnych terminów analiz:

$$7 \text{ dzień: } y = -0,3626x + 8,7486 \text{ R} = 0,985$$

$$14 \text{ dzień: } y = -0,9308x + 8,9154 \text{ R} = 0,965$$

$$21 \text{ dzień: } y = -0,9465x + 8,3820 \text{ R} = 0,987$$

$$28 \text{ dzień: } y = -1,0244x + 7,8365 \text{ R} = 0,988$$

Fig. 2. Relationship between catalase activities in French bean leaves and concentration of 1,10-phenanthroline (7, 14, 21, 28 days after treatment). The vertical bars represent the standard deviation of the mean. Linear regression equations and correlation coefficients is present below:

$$7^{\text{th}} \text{ day: } y = -0,3626x + 8,7486 \text{ R} = 0,985$$

$$14^{\text{th}} \text{ day: } y = -0,9308x + 8,9154 \text{ R} = 0,965$$

$$21^{\text{th}} \text{ day: } y = -0,9465x + 8,3820 \text{ R} = 0,987$$

$$28^{\text{th}} \text{ day: } y = -1,0244x + 7,8365 \text{ R} = 0,988$$

1,10-fenantrolina obok zmian aktywności enzymów spowodowała także zmiany w poziomie barwników asymilacyjnych w liściach fasoli szparagowej (tab. 1). Poziom chlorofilu całkowitego i karotenoidów w dużym stopniu uzależniony był od zastosowanych stężeń 1,10-Phe. Rośliny opryskane 1,10-Phe o mniejszych stężeniach cechowały się wyższym poziomem chlorofilu całkowitego niż rośliny nietraktowane tym herbicydem. Zaobserwowany wzrost zawartości tego barwnika wynosił średnio 22% dla stężenia herbicydu równego 2,5 mM i około 7% dla stężenia równego 7,5 mM. Największe stężenie 1,10-Phe równe 10 mM wywołało natomiast spadek poziomu chlorofilu całkowitego w odniesieniu do roślin kontrolnych, spadek ten wynosił średnio 7%. Jednocześnie stwierdzono, że generalnie poziom chlorofilu całkowitego w liściach fasoli szparagowej spada z wiekiem roślin. Odmienne zależności odnotowano natomiast w przypadku zmian zawartości karotenoidów w liściach fasoli szparagowej. Obserwowano wzrost poziomu karotenoidów w miarę postępującej wegetacji zarówno w roślinach kontrolnych, jak

i traktowanych 1,10-Phe. Niższe stężenia herbicydu spowodowały spadek zawartości karotenoidów w liściach fasoli, w porównaniu do roślin kontrolnych, spadek ten wynosił około 11% przy stężeniu związku równym 2,5 mM, oraz średnio 8% dla stężenia 1,10-Phe równego 7,5 mM. Najwyższe z zastosowanych stężeń 1,10-Phe (10 mM) prowadziło natomiast do 8% wzrostu poziomu karotenoidów w porównaniu do roślin nietraktowanych.

Tabela 1
Zmiany zawartości chlorofilu całkowitego i karotenoidów w liściach fasoli szparagowej (średnia \pm SD) w kolejnych dniach po traktowaniu 1,10-fenantroliną

Table 1
Changes in the contents of total chlorophyll and carotenoids (mean \pm SD) in French bean leaves after 7, 14, 21 and 28 days treated with 1,10-phenantroline

Stężenie 1,10-Phe [mM]	Chlorofil całkowity [mg g ⁻¹ (św.m.)]				Karotenoidy [mg g ⁻¹ (św.m.)]			
	7 dzień	14 dzień	21 dzień	28 dzień	7 dzień	14 dzień	21 dzień	28 dzień
0	2,042 \pm 0,070	1,674 \pm 0,054	1,522 \pm 0,058	1,363 \pm 0,063	0,070 \pm 0,007	0,071 \pm 0,008	0,101 \pm 0,007	0,127 \pm 0,009
2,5	2,157 \pm 0,052	2,317 \pm 0,056	1,912 \pm 0,073	1,643 \pm 0,053	0,062 \pm 0,009	0,070 \pm 0,010	0,083 \pm 0,010	0,113 \pm 0,008
7,5	2,047 \pm 0,059	1,927 \pm 0,049	1,600 \pm 0,064	1,510 \pm 0,062	0,067 \pm 0,010	0,068 \pm 0,009	0,090 \pm 0,010	0,117 \pm 0,008
10,0	1,749 \pm 0,063	1,579 \pm 0,086	1,510 \pm 0,062	1,277 \pm 0,061	0,074 \pm 0,007	0,077 \pm 0,007	0,109 \pm 0,006	0,136 \pm 0,007

SD - odchylenie standardowe średniej/standard deviation

Dyskusja i wnioski

Stosowanie chemicznych środków ochrony roślin może prowadzić do zaburzenia procesów fizjologiczno-biochemicznych przebiegających w roślinach uprawnych, które mogą objawiać się między innymi zmianą aktywności katalitycznej enzymów oraz zmianą ich składu biochemicznego. Jak wynika z doniesień literaturowych, zmiany aktywności enzymów w roślinach uprawnych poddanych działaniu herbicydów są spowodowane m.in. generowanym przez te związki stresem oksydacyjnym [8, 13-16]. O tym, że herbicydy, w tym herbicydy fotodynamiczne, indukują wytwarzanie reaktywnych form tlenu, świadczą wyniki wcześniejszych badań [1, 2, 14, 17]. Wskutek stosowania herbicydów odnotowano zmiany aktywności takich enzymów antyoksydacyjnych, jak peroksydaza i katalaza [8, 9, 13-17], przy czym zmiany były różne, zależne zarówno od rodzaju związku [13, 14], dawki [13, 15], terminu analizy [15, 17], jak i samej rośliny [13]. Wyniki badań niniejszej pracy wykazały, że 1,10-fenantrolina (1,10-Phe) działała stymulująco na aktywność peroksydazy w liściach fasoli i jednocześnie inhibitowała aktywność katalazy, przy czym stopień zmian był tym większy, im wyższe było stężenie związku. Podwyższoną aktywność peroksydazy z jednoczesnym obniżeniem aktywności katalazy, jako skutek stosowania 1,10-Phe, odnotowano także we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych na sałacie i porach [18, 19]. Wzrost aktywności peroksydazy z jednoczesnym spadkiem aktywności katalazy pod wpływem 1,10-Phe może świadczyć,

że związek ten przyspiesza proces starzenia się roślin. O tym, że wzrost aktywności peroksydazy i spadek aktywności katalazy są godnymi zaufania wskaźnikami starzenia się tkanki liściowej, sugerowano w wielu wcześniejszych pracach [20-23].

Wskaźnikami starzenia się liści mogą być także zmiany zawartości chlorofilu i karotenoidów [24-26]. Z doniesień literaturowych wynika, że herbicydy mogą wpływać na poziom barwników fotosyntetycznych w roślinach [2, 8, 14, 15, 27], co może być związane z oddziaływaniem ich na proces starzenia [25, 28]. Badania wykazały, że herbicydy fotodynamiczne, takie jak 1,10-Phe, wpływają na biosyntezę chlorofilu [29, 30]. Zmiany zawartości chlorofilu i karotenoidów w roślinach na skutek działania herbicydów uzależniane są zarówno od herbicydu [14], terminu analizy [14, 18, 19], jak i dawki [15, 18, 19]. Wyniki uzyskane w przeprowadzonych badaniach na fasoli szparagowej wskazują na silne uzależnienie zmian zawartości barwników fotosyntetycznych od stężenia herbicydu. Zaobserwowany w naszych badaniach spadek poziomu chlorofilu całkowitego w liściach fasoli traktowanej wyższą dawką 1,10-Phe może potwierdzać sugerowaną konkluzję, że związek ten przyspiesza proces starzenia się roślin wyższych. O spadku poziomu chlorofilu pod wpływem 1,10-Phe donoszono już wcześniej [6, 7, 31-34]. W przeprowadzonym eksperymencie obok zmian poziomu chlorofilu całkowitego odnotowano także zmiany zawartości karotenoidów w liściach fasoli szparagowej. Przy niższych stężeniach 1,10-Phe odnotowano spadek zawartości karotenoidów, podobne wyniki otrzymano także wcześniej [6, 7].

Literatura

- [1] Qian H, Chen W, Sun L, Jin Y, Liu W, Fu Z. *Ecotoxicology*. 2009;18:537-543. DOI: 10.1007/s10646-009-0311-8.
- [2] Saladin G, Clément C, Magné C. *Plant Cell Rep*. 2003;21:1221-1227. DOI: 10.1007/s00299-003-0658-x.
- [3] Śliwa W. *Prace Nauk Polit Wrocław, I Ch Org i Fiz, Seria: Studia i Materiały*. 1978.
- [4] Dumitrascu F, Caira MR, Drăghici C, Căproiu MT, Barbu L, Miu B. *Rev Roum Chim*. 2008;53(3):183-187.
- [5] Nandihalli UB, Rebeiz CA. *Pestic Biochem Physiol*. 1991;40:27-46.
- [6] Samovich TV, Shalygo NV, Kudryashov AP, Averina NG. *Russ J Plant Physiol*. 2006;53(6):814-823. DOI: 10.1134/S1021443706060136.
- [7] Toneva V, Gechev T, Mincov I. *Photosynthetica*. 2001;39(4):597-601. DOI: 10.1023/A:1015668415629.
- [8] Ferreira LC, Cataneo AC, Remaeh LMR, Corniani N, de Fatima Fumis T, de Souza YA, et al. *Pestic Biochem Physiol*. 2010;97:47-54. DOI: 10.1016/j.pestbp.2009.12.003.
- [9] Michałowicz J, Urbanek H, Bukowska B, Duda W. *Biol Plant*. 2010, 54(3), 597-600. DOI: 10.1007/s10535-010-0108-x.
- [10] Gardiner MG, Cleland R. *Phytochemistry*. 1974;13:1095-1098.
- [11] Bergmeyer HU. *Methods Enzym Anal*. New York: Academic Press; 1963.
- [12] Oren R, Werk KS, Buchmann N, Zimmermann R. *Can J For Res*. 1993;23:1187-1195.
- [13] Štajner D, Popović M, Štajner M. *Biol Plant*. 2003/4;47(4):575-579.
- [14] Hassan NM, Nemat Alla MM. *Acta Physiol Plant*. 2005;27(4A):429-438. DOI: 10.1007/s11738-005-0047-x.
- [15] Ivanov SV, Alexieva VS, Karanov EN. *Russ J Plant Physiol*. 2005;52(2):213-219. DOI: 10.1007/s11183-005-0033-6.
- [16] Moldes CA, Medici LO, Atahão OS, Tsai SM, Azevedo RA. *Acta Physiol Plant*. 2008;30:469-479. DOI: 10.1007/s11738-008-0144-8.
- [17] Nemat Alla MM, Hassan NM. *Acta Physiol Plant*. 2007;29:247-258. DOI: 10.1007/s11738-007-0031-8.
- [18] Herman B, Biczak R, Gurgul E. *Biol Plant*. 1998;41(4):607-611. DOI: 10.1023/A:1001808903867.
- [19] Herman B, Biczak R. *Biul Nauk UWM w Olsztynie*. 2001;12:227-237.
- [20] Vanacker H, Sandalio LM, Jimenez A, Palma JM, Corpas FJ, Meseguer V, Gomez M, Sevilla F, Leterrier M, Foyer CH, del Río LA. *J Exp Bot*. 2006;57(8):1735-1745. DOI:10.1093/jxb/erl012.
- [21] De Felipe MR, Lucas MM, Pozuelo JM. *Plant Physiol*. 1988;46:806-811.

- [22] Goud PB, Kachole MS. *Plant Signaling Behav.* 2011;6(9):1371-1376. DOI: 10.4161/psb.6.9.16316.
- [23] Upadhyaya A, Sankhla D, Davis TD, Sankhla N, Smith BN. *J Plant Physiol.* 1985;121:453-461.
- [24] De Michele R, Formentin E, Lo Schiavo F. *Plant Signaling Behav.* 2009;4(4):319-320. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02684.x.
- [25] Prochazkova D, Sairam RK, Srivastava GC, Singh DV. *Plant Sci.* 2001;161:765-771.
- [26] Falqueto AR, Cassol D, de Magalhães Júnior AM, de Oliveira AC, Bacarin MA. *Pesq Agropec Bras.* 2009;44(7): 695-700. DOI: 10.1590/S0100-204X2009000700007.
- [27] Khan MS, Chaudhry P, Wani PA, Zaidi A. *J Appl Sci Environ Manage.* 2006;10(3):141-146.
- [28] Hippeli S, Heiser I, Elstner EF. *Plant Physiol Biochem.* 1999;37(3):167-178.
- [29] Rebeiz CA, Montazer-Zouhoor A, Hopen HJ, Wu M. *Enzyme Microb Technol.* 1984;6(9):390-396. DOI: 10.1016/0141-0229(84)90012-7.
- [30] Tripathy BC, Mohapatra A, Gupta I. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1767:860-868. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.03.008.
- [31] Mostowska A. *Photosynthetica.* 1992;26(1):19-31.
- [32] Mostowska A, Kittsteiner U, Rüdiger W. *Protoplasma.* 1991;161:23-30. DOI: 10.1007/BF01328894.
- [33] Averina NG, Yaronkaya EB, Dudkina TS. *Fiziol Biokhim Kul't Rast.* 1992;24(1):54-59.
- [34] Mostowska A, Horvath G, Szigeti Z. *Z Naturforsch.* 1999;54:9-10.

FRENCH BEAN REACTION ON HERBICIDE 1,10-PHENANTHROLINE

Institute of Chemistry, Environment Protection and Biotechnology, Jan Długosz University in Czeszochowa

Abstract: Effect of photodynamic herbicide 1,10-phenanthroline (1,10-Phe), in the concentration of 2.5, 7.5 and 10.0 mM, on catalase (EC 1.11.1.6) and peroxidase (EC 1.11.1.7) activity and total chlorophyll and carotenoides contents in leaves of French bean (*Phaseolus vulgaris* L., cv Golds Saxa) have been determined. Plants treated with 1,10-Phe were characterized by higher activity of peroxidase and lower activity of catalase, as compared with non-treated plants. The total chlorophyll level and carotenoids level in French bean leaves depended on the concentration of 1,10-Phe. The plants sprayed with Phe at lower concentrations were characterized by a higher total chlorophyll level, whilst the highest 1,10-Phe concentration - 10 mM caused the chlorophyll level decrease, as compared with the control plants. Higher concentration of this herbicide resulted in a increase in the content of carotenoids in plants leaves.

Keywords: herbicides, 1,10-phenanthroline, enzyme activity, chlorophyll, carotenoids