



Otrzymano: 14 listopada 2016
Zaakceptowano: 16 grudnia 2016
Udostępniono online: 27 grudnia 2016

Reakcja selera naciowego na 1,10-fenantrolinę

Leaf celery reaction on 1,10-phenanthroline

Barbara HERMAN, Piotr RYCHTER, Robert BICZAK*

Zakład Biochemii i Ekotoksykologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie, 42-200 Częstochowa, Armii Krajowej 13/15, Polska

Streszczenie: Dla zwiększania efektywności i jakości produkcji rolnej nadal olbrzymie znaczenie mają pestycydy, w tym herbicydy. Herbicydy stosowane w rolnictwie do ochrony roślin mogą mieć jednocześnie negatywny wpływ na rośliny inne niż docelowe, np. rośliny uprawne. Przeprowadzone badania miały na celu określenie wpływu herbicydu fotodynamicznego 1,10-fenantroliny (1,10-Phe), o stężeniach 2.5, 5.0, 7.5 i 10.0 mM na aktywność katalazy (EC 1.11.1.6) i peroksydazy (EC 1.11.1.7) oraz zawartość chlorofilu i karotenoidów w liściach selera naciowego (*Apium graveolens* L. var. *dulce* (Mill.) Pers.). 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 selera naciowego uzależniony był także od zastosowanych stężeń 1,10-Phe. Rośliny opryskane 1,10-Phe o mniejszych stężeniach cechowały się podwyższonym poziomem chlorofilu całkowitego, podczas gdy wyższe stężenia 1,10-Phe wywoływały spadek zawartości tego barwnika w odniesieniu do roślin kontrolnych. Przy wyższych stężeniach tego herbicydu wystąpił ponadto wzrost zawartości karotenoidów w liściach roślin.

Słowa kluczowe: pestycydy; herbicydy; 1,10-fenantrolina; aktywność enzymów; barwniki asymilacyjne; stres oksydacyjny

Abstract: Pesticides, in that herbicides still play an important role in enhancing the efficiency and quality of agricultural production. Herbicides used in agriculture for plant protection can have a negative effect on nontarget plants as well, for example cultivated plants. The aim of this research was to determine the effect of photodynamic herbicide 1,10-phenanthroline (1,10-Phe), in the concentrations of 2.5, 5.0, 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 carotenoid contents in the leaf celery (*Apium graveolens* L. var. *dulce* (Mill.) Pers.) leaves. 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 celery leaves depended on the concentration of 1,10-Phe. The plants sprayed with 1,10-Phe at lower concentrations were characterized by a higher total chlorophyll level, whilst the higher 1,10-Phe concentrations caused the chlorophyll level decrease as compared with the control plants. Higher concentration of this herbicide resulted in an increase in the content of carotenoids in plants leaves.

Keywords: pesticides; herbicides; 1,10-phenanthroline; enzyme activity; photosynthetic pigments; oxidative stress

1. Wstęp

Termin „pestycyd” określa niejednorodną grupę substancji czynnych lub mieszanin zawierających jedną lub więcej substancji czynnych lub czynników biologicznych przeznaczonych do zapobiegania, niszczenia, odstraszania każdego organizmu, który jest uważany za szkodnika [1]. Pestycydy obejmują szeroki zakres związków, które zazwyczaj są klasyfikowane zgodnie z ich celem, przeznaczeniem (herbicydy, fungicydy, insektycydy, nematocydy, regulatory wzrostu roślin i inne), lub też mogą być klasyfikowane na podstawie budowy chemicznej, czy sposobu działania [2,3]. Stosowane są w celu zwalczania chwastów, szkodników i chorób w uprawach, w przechowalnictwie w celu przedłużenia trwałości produktów i wyeliminowania strat żywności po okresie zbiorów, a także dla ochrony zdrowia ludzi i zwierząt [4–7].

W większości sektorów produkcji rolnej, w celu zapobiegania lub ograniczenia strat przez szkodniki (w tym choroby i chwasty), szeroko stosowane są pestycydy, co może przyczynić się do zwiększenia plonu oraz poprawy jakości produk-

tu. Stosowanie pestycydów może również przyczynić się do zwiększenia wartości odżywczej żywności, a czasem jej bezpieczeństwa [4,6,7]. Rośliny podczas stresu oraz zaatakowane przez choroby, czy organizmy chorobotwórcze wywołujące choroby, mogą produkować toksyczne substancje chemiczne. Stosowanie odpowiednich pestycydów może temu zapobiec [4].

Rocznie, na całym świecie, stosuje się około 2.5 mln ton pestycydów [3,8,9], z czego około 50% stanowią środki chwastobójcze, które są szeroko wykorzystywane w rolnictwie [4,8,10]. Chociaż stosowanie w rolnictwie pestycydów, w tym herbicydów, przyczynia się do ochrony roślin, obecność ich w żywności lub środowisku budzi powszechny niepokój. Pestycydy łączone są z szeroką gamą zagrożeń dla zdrowia człowieka, począwszy od krótkoterminowych skutków, takich jak bóle głowy czy nudności, do przewlekłych oddziaływań takich jak np. nowotwory czy zaburzenia endokrynologiczne [7]. Środki te mogą zanieczyszczać gleby, wody, trawy i inne rośliny. Oprócz zabijania owadów czy chwastów, pestycydy mogą być toksyczne dla wielu innych organizmów, w tym ptaków, ryb, pożytecznych owadów i roślin niebędących przedmiotem zwalczania. Środki owadobójcze są na ogół najbardziej toksyczną grupą pestycydów, lecz herbicydy również

* Autor korespondencyjny.
Adres e-mail: r.biczak@ajd.czest.pl (R. Biczak).

mogą stanowić zagrożenie dla organizmów niebędących przedmiotem zwalczania [5].

Wpływ herbicydów na rośliny inne niż docelowe, w tym na rośliny uprawne może mieć różny zakres i charakter, co uzależnione jest m.in. od budowy i chemicznych właściwości aktywnego związku. 1,10-Fenantrolina (1,10-Phe) to heterocykliczny związek azotowy [11,12] należący do diazafenantrenów, zawierający dwa pierścienie pirydynowe [13–15]. 1,10-Phe i jej pochodne to związki o wysokiej aktywności biologicznej [13,14], dla których wykazano znaczną aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwnowotworową [16] oraz chwastobójczą [12,17–19]. 1,10-Phe ma szerokie zastosowanie, nie tylko w rolnictwie, ale np. w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym oraz przy uzdatnianiu wody, dlatego znaczne ilości tego związku można znaleźć w odświeżonych ściekach [20], skąd może on przeniknąć do środowiska, a następnie do roślin uprawnych. 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 [12,17]. Herbicydy fotodynamiczne, takie jak 1,10-fenantrolina oraz inne chelatory metali typu pirydynowego (2,2'-dipirydył, 8-hydroksychinolina) [21], powodują w ciemności akumulację fotodynamicznie aktywnych porfiryn (protoporfiryna IX, magnezoporfiryna IX, protochlorofilid), które po ekspozycji roślin na światło, indukują produkcję reaktywnych form tlenu, co w konsekwencji może skutkować uszkodzeniem roślin [21–23].

Reaktywne formy tlenu (RFT) są stale wytwarzane w komórkach roślinnych, głównie w chloroplastach, peroksymach i mitochondriach, głównie jako uboczne produkty metabolizmu tlenowego w procesach fotosyntezy, fotorespiracji czy oddychania komórkowego [24–32]. Do podstawowych RFT zaliczamy cząsteczki o charakterze rodnikowym takie jak: anionorodnik nadadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), oraz formy nierodnikowe, do których zaliczamy: nadtlenek wodoru (H_2O_2) i tlen singletowy (1O_2) [25,27–31,33–43]. RFT, występując w niskich stężeniach, pełnią funkcje sygnalizacyjną w komórkach roślinnych, biorą udział w regulacji takich procesów jak wzrost, rozwój, starzenie, programowana śmierć komórki, odpowiedź na stres biotyczny czy abiotyczny [24–30,39,40,44]. W przeciwieństwie do tego RFT, są wysoce reaktywne i toksyczne, gdy występują w dużych ilościach, mogą prowadzić do peroksydacji lipidów w błonach komórkowych, uszkodzeń takich biocząsteczek jak: białka, chlorofile, węglowodany czy DNA oraz mogą powodować upośledzenia aktywności enzymatycznych, co skutkuje przedwczesnym starzeniem się roślin, a w skrajnych wypadkach ich śmiercią [24,26,27,30,31,33,37–42,44–46]. Ponieważ wysoki poziom RFT jest szkodliwy dla komórek, dlatego rośliny wykształciły szereg mechanizmów obronnych (enzymatycznych i nieenzymatycznych), które umożliwiają usuwanie RFT. Enzymatyczny system antyoksydacyjny obejmuje m.in. takie enzymy, jak: dysmutaza nadadtlenkowa, peroksydazy (np. askorbiniana), katalaza oraz reduktaza glutationowa, natomiast nieenzymatyczne antyoksydanty to związki niskocząsteczkowe, takie jak: kwas askorbinowy, glutation, karotenoidy, tokoferole, flawonoidy [25–27,30,32–34,37,42,46–54].

Produkcja i wygaszanie RFT w roślinach jest pod ścisłą kontrolą. W normalnych warunkach wzrostu RFT są na niskim poziomie, istnieje równowaga pomiędzy wytwarzaniem a neu-

tralizacją RFT, natomiast niebezpieczna sytuacja pojawia się wtedy, gdy ta równowaga zostaje zachwiana [24,27,39,43,47,52]. Nadmiernemu wytwarzaniu RFT w roślinach sprzyjają różne środowiskowe czynniki stresowe, biotyczne i abiotyczne, takie jak: zasolenie, promieniowanie UV, susza, metale ciężkie, ekstremalne temperatury, niedobór składników odżywczych, zanieczyszczenie powietrza, herbicydy czy ataki patogenów [24,25,27,29,33,34,37,39,40,47]. Nadmiar RFT powoduje, że mechanizmy antyoksydacyjne nie są w stanie obniżyć ich zawartości do poziomu bezpiecznego dla komórki, co skutkuje pojawieniem się stanu niebezpiecznego określanego mianem stresu oksydacyjnego [24,34,52]. Stres oksydacyjny, zaistniały pod wpływem różnych czynników abiotycznych, jest ściśle związany z nadprodukcją i nagromadzeniem reaktywnych form tlenu (RFT) [46,49,55]. Stresy abiotyczne mogą sztucznie wywoływać starzenie i zwiększają produkcję RFT w szczególności w chloroplastach. W badaniach stresu oksydacyjnego w roślinach pod wpływem różnych abiotycznych czynników stresowych oznacza się m.in. takie biomarkery, jak aktywność enzymów odpowiedzialnych za usuwanie RFT, w tym aktywność dysmutazy nadadtlenkowej, katalazy i peroksydazy [31,39–41,44,46,48,50,54,57–60] oraz zmiany zawartości barwników asymilacyjnych [31,39,40,44,50,51,57,58,61].

W niniejszej pracy przebadano wpływ 1,10-Phe na aktywność katalazy i peroksydazy oraz zawartość chlorofilu *a*, chlorofilu *b* i chlorofilu całkowitego oraz karotenoidów w liściach selera naciowego. Ze względu na możliwość pojawienia się w środowisku wzrostu roślin 1,10-Phe wynikającą z szerokiego jej zastosowania oraz z uwagi na jej właściwości interesującym wydaje się być określenie wpływu tego związku na różne rośliny uprawne, w tym warzywa np. seler naciowy. Seler naciowy jest cennym warzywem ze względu na właściwości odżywcze, smakowe i lecznicze [62–64]. Celem przeprowadzenia powyższych badań było określenie możliwości zaistnienia w roślinach stresu oksydacyjnego oraz określenie, czy seler naciowy poradzi sobie z ewentualnym stresem spowodowanym przez 1,10-Phe, gdyby związek ten pojawił się w środowisku jego wzrostu.

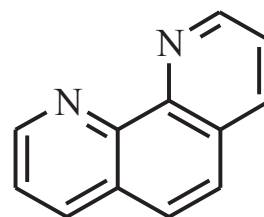
2. Część eksperymentalna

2.1. Związki chemiczne

1,10-Fenantrolina (1,10-Phe) wykorzystana w badaniach (czystość: 99%) zakupiona została w Sigma-Aldrich Chemical Co. Strukturę 1,10-Phe przedstawiono na Rysunku 1.

2.2. Warunki prowadzenia eksperymentu wazonowego

Badania dotyczące określenia reakcji selera naciowego na 1,10-fenantrolinę zostały przeprowadzone w Zakładzie



Rysunek 1. Struktura 1,10-fenantroliny (1,10-Phe).

Biochemii i Ekotoksikologii Akademii im. J. Długosza w Częstochowie. W przeprowadzonym eksperymencie wazonowym rozsądę selera naciowego (*Apium graveolens* L. var. *dulce* (Mill.) Pers.), odmiany Utah 52-70, wsadzono w drugiej połowie maja do wazonów plastikowych o pojemności około 5 dm³ napełnionych ujednoczoną glebą brunatną o pH (KCl) 6.5 i zawartości próchnicy około 1.6%. W pierwszej połowie lipca rośliny jednorazowo opryskano roztworami 1,10-fenantroliny o stężeniach: 2.5, 5.0, 7.5 i 10.0 mM, w ilości 3 cm³ roztworu na roślinę. Podczas wegetacji roślin, we wszystkich wazonach, utrzymywano stałą wilgotność podłoża na poziomie około 70% ppw. Materiał roślinny do oznaczenia aktywności enzymatycznej peroksydazy i katalazy oraz zawartości chlorofilu i karotenoidów pobierano czterokrotnie w odstępach tygodniowych (7., 14., 21. i 28. dzień po oprysku).

2.3. Oznaczanie aktywności peroksydazy i katalazy

Wyciągi do oznaczenia aktywności enzymów przygotowano poprzez homogenizację świeżego materiału roślinnego (1 g) w schłodzonym (4°C) buforze fosforanowym o pH 7.4. Aktywność peroksydazy (POD; EC 1.11.1.7) oznaczono spektrofotometrycznie, poprzez określenie szybkości utleniania o-dianizydyny w obecności H₂O₂ przez enzym zawarty w określonej objętości próbki w czasie 1 minuty [65]. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 450$ nm, wyniki przedstawiono jako przyrost absorbancji na minutę ($\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$). Aktywność katalazy (CAT; EC 1.11.1.6) oznaczono miareczkowo, poprzez określenie ilości rozłożonego H₂O₂ w czasie 15 minut [66] przez enzym zawarty w 1 g świeżej masy rośliny i wyrażono jako $\text{mg (H}_2\text{O}_2\text{)} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

2.4. Oznaczanie aktywności peroksydazy i katalazy

Zawartość barwników asymilacyjnych w świeżym materiale roślinnym oznaczano metodą spektrofotometryczną zgodnie z metodyką podaną przez Orena i wsp. [67]. Nawazkę (0.2 g) świeżej masy liści shomogenizowano z dodatkiem 80% roztworu acetonu schłodzonego do temp. 4°C, następnie odwirowano, a przesącz uzupełniono do stałej objętości 25 cm³. Zawartość chlorofilu *a*, chlorofilu *b* i karotenoidów oznaczono poprzez pomiar absorbancji wyciągu z liści przy długości fali 470 nm, 647 nm i 664 nm. Zawartość barwników asymilacyjnych wyrażoną w $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ świeżej masy (św.m.) obliczono z następujących wzorów:

$$\text{chl } a = \frac{25 a}{\text{mg } \acute{s}.m.} \quad (1)$$

$$\text{chl } b = \frac{25 b}{\text{mg } \acute{s}.m.} \quad (2)$$

$$\text{car} = \frac{25 c}{229 \cdot \text{mg } \acute{s}.m.} \quad (3)$$

gdzie:

$$a = 11.78 (A_{664}) - 2.29 (A_{647}) \quad (4)$$

$$b = 20.05 (A_{647}) - 4.77 (A_{664}) \quad (5)$$

$$c = 1000 (A_{470}) - 3.27 a - 104 b \quad (6)$$

2.5. Analiza statystyczna

Wszystkie otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Ocenię istotności otrzymanych wyników przepro-

wadzano wykorzystując analizę wariancji dwuczynnikową (test F Fishera-Snedecora), a wartości $\text{NIR}_{0.05}$ obliczono testem Tukeya. Wyniki przedstawiono jako średnie z *n* powtórzeń \pm odchylenie standardowe. Do opisu zależności pomiędzy aktywnością enzymów a stężeniem 1,10-fenantroliny zastosowano metodę regresji liniowej. Obliczono również współczynniki korelacji liniowej Pearsena pomiędzy aktywnością POD i CAT, a zawartością chlorofilu całkowitego w liściach selera naciowego ($p < 0.05$).

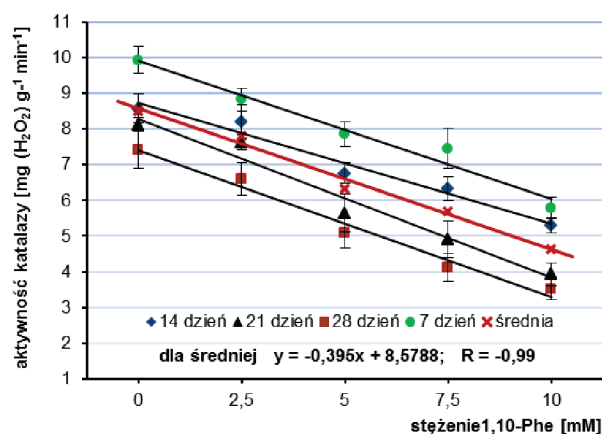
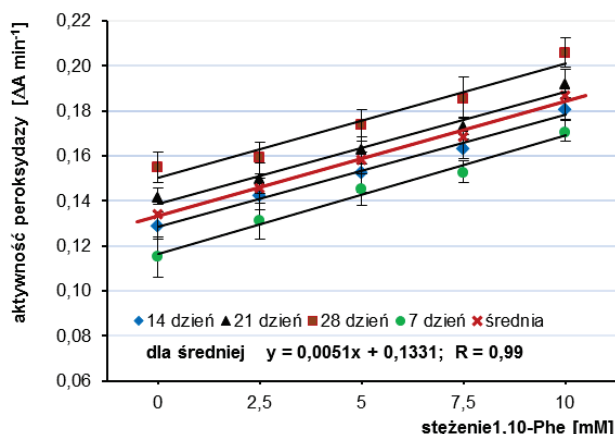
3. Wyniki i dyskusja

3.1. Wpływ 1,10-fenantroliny na aktywność katalazy i peroksydazy

W roślinach uprawnych poddanych działaniu herbicydów na skutek m.in. generowanego przez te związki stresu oksydacyjnego dochodzi do zmian aktywności enzymów [36,68–75]. Monitorowanie aktywności enzymów, które katalizują usuwanie RFT może ujawnić poziom stresu w roślinach [61]. Katalaza (CAT) i peroksydaza (POD), obok dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) są głównymi elementami enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego [35,46,76,77]. W określeniu oddziaływania różnych środowiskowych czynników stresogennych na rośliny bardzo często oznacza się aktywności CAT i POD [31,39–41,46,48,50,54,58,59,69,76,77], ponieważ enzymy te zmiatają najbardziej stabilne RFT, tj. H₂O₂, skutecznie zapobiegając oksydacyjnemu uszkodzeniu makromolekuł w roślinach [33,50,53,54,78]. W badaniach dotyczących oddziaływania środowiskowych czynników stresowych na aktywność POD w roślinach, generalnie wskazuje się na wzrost aktywności tego enzymu, jako skutek zaistniałego stresu [27,31,33,39,49,50,53,79–82], dlatego zmiana aktywności POD uważana jest jako bardzo dobry biomarker stresu oksydacyjnego w roślinach [31,78,80]. Niejednoznaczne są natomiast wyniki dotyczące kierunku zmian aktywności CAT pod wpływem czynników stresowych, istnieją zarówno doniesienia o spadku [27,31,33,46,57,72,75,81–85], jak i wzroście aktywności CAT [27,33,36,39,49,50,54,57,79,81,86]. Zwiększenie aktywności CAT jest przypuszczalnie cechą adaptacyjną, podczas gdy zmniejszenie aktywności tego enzymu może ograniczyć tolerancję rośliny na stres środowiskowy [87]. Według niektórych badaczy CAT jest jednym z najważniejszych komponentów roślinnych mechanizmów ochronnych występujących w mitochondriach oraz peroksysomach i pełni ważną rolę w usuwaniu H₂O₂, w stanie stresu [83,88].

O zmianach aktywności POD i CAT w roślinach pod wpływem herbicydów donoszono w wielu pracach [36,37,69,70,72–74,78,80,89–95], przy czym prezentowane wyniki badań wskazują na uzależnienie zmian m.in. od rodzaju związku [71,72,75], jego dawki [37,71,73,78,80,92], terminu analizy [37,73,75,80,90,91], jak i od samej rośliny [71], jej tolerancji na herbicyd [61,72], czy analizowanego organu [78].

Wyniki badań prezentowane w niniejszej pracy wykazały, że 1,10-fenantrolina (1,10-Phe) w zakresie przebadanych stężeń (2.5–10.0 mM), w każdym analizowanym terminie (7., 14., 21. i 28. dzień po oprysku) działała stymulująco na aktywność POD w liściach selera naciowego i jednocześnie inhibitowała aktywność CAT, przy czym stopień zmian był tym większy, im wyższe było stężenie związku (Rysunek 2). Ponadto stwierdzono wzrost aktywności POD i spadek aktywności CAT w miarę postępującej wegetacji roślin. Pomiedzy aktywnością



Rysunek 2. Proste zależności pomiędzy aktywnością POD i CAT w liściach selera naciowego pod wpływem 1,10-Phe ($n = 3$). Dla aktywności POD $NIR_{0.05}$ dla terminów pomiarów – 0.0094; $NIR_{0.05}$ dla stężeń 1,10-Phe – 0.0084. Dla aktywności CAT $NIR_{0.05}$ dla terminów pomiarów – 0.5514; $NIR_{0.05}$ dla stężeń 1,10-Phe – 0.4932.

CAT czy POD w liściach roślin a stężeniem 1,10-Phe stwierdzono liniowe zależności. Przy najniższym z zastosowanych stężeń 1,10-Phe (2.5 mM) odnotowano (średnio z całego okresu badań) około 9% wzrost aktywności POD i około 8% spadek aktywności CAT w porównaniu z próbkami kontrolnymi, nietraktowanymi 1,10-Phe. Przy najwyższym z zastosowanych stężeń 1,10-Phe (10 mM) stwierdzono (średnio z całego okresu badań) najwyższy wzrost aktywności peroksydazy – około 40%, przy jednoczesnym spadku aktywności CAT o około 46% w odniesieniu do aktywności tych enzymów w roślinach nietraktowanych 1,10-Phe. O wzroście aktywności POD pod wpływem herbicydów donoszono w licznych pracach [8,69,78,80,92–94,96]. Zwiększenie aktywności POD, jako skutek działania herbicydów, jest łączone z generowaniem RFT i zaistniałym stresem oksydacyjnym [78,94,96]. Odnotowany w przeprowadzonych badaniach wzrost aktywności POD w liściach selera naciowego traktowanego 1,10-Phe może wskazywać, że związek ten, w zakresie przebadanych stężeń, generuje wytwarzanie RFT i tym samym może prowadzić do zaistnienia stresu oksydacyjnego w roślinach. Powstawanie RFT w tym przypadku może być związane z akumulacją aktywnych porfiryn, gdyż jak wynika z doniesień literaturowych, herbicydy fotodynamiczne, takie jak 1,10-Phe powodują w ciemności akumulację fotodynamicznie aktywnych porfiryn [21,22], które po ekspozycji roślin na światło, indukują produkcję RFT [21–23]. Wiadomo, że enzymy antyoksydacyjne powodują detoksykację nadmiaru RFT i zmniejszają uszkodzenia oksydacyjne. Jednakże wysokie aktywności enzymów antyoksydacyjnych mogą być uważane za symptomy uszkodzenia oksydacyjnego [58].

Z doniesień literaturowych wynika, że herbicydy mogą prowadzić do obniżenia aktywności CAT w roślinach [72,75, 92,96–98]. Spadek aktywności CAT może być związany z nadprodukcją RFT, gdyż wysokie nagromadzenie RFT w komórkach roślin, może prowadzić do oksydacyjnego uszkodzenia enzymów antyoksydacyjnych i ich inaktywacji [97, 99], co wtórnie może prowadzić do zwiększenia puli H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$ w komórkach roślin traktowanych czynnikami stresogennymi [83,99]. Można zatem przypuszczać, że spadek aktywności CAT odnotowany w przeprowadzonych badaniach w liściach selera naciowego traktowanego 1,10-Phe mógł skutkować zwiększeniem poziomu H_2O_2 , co w następstwie mogło prowadzić do tak dużego wzrostu aktywności POD, co wi-

doczne było zwłaszcza przy wyższych stężeniach 1,10-Phe. Konkluzja taka jest zgodna z doniesieniem Vanackera i wsp. [100], którzy w przeprowadzonych badaniach odnotowali spadek aktywności CAT w starzejących się liściach roślin sugerując, że zapewne peroksydazy lub nieenzymatyczne przeciwutleniające przejęły rolę CAT w unieszkodliwianiu H_2O_2 . Mhamdi i wsp. [101] wskazują ponadto, że CAT może odgrywać istotną rolę w procesie starzenia się roślin. Z danych literaturowych wynika, że stres oksydacyjny może prowadzić do przedwczesnego starzenia się tkanki liściowej, gdyż RFT odgrywają istotną rolę w peroksydacji lipidów, uszkodzeniu błon [102,103] i w konsekwencji w starzeniu się liści [101–103]. Spadek aktywności CAT i wzrost aktywności POD traktowane są przez niektórych badaczy jako godne zaufania wskaźniki starzenia się tkanki liściowej [100,104–106]. Zaobserwowany w przeprowadzonych badaniach wzrost aktywności POD z jednoczesnym spadkiem aktywności CAT pod wpływem 1,10-Phe może świadczyć zatem, że związek ten przyspiesza proces starzenia się roślin. Podwyższoną zależność odnotowano także we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych na sałacie, porach i fasoli szparagowej [107–109] i w badaniach herbicydów indukujących chlorozę w liściach [96].

3.2. Wpływ 1,10-fenantroliny na zawartość barwników asymilacyjnych

W roślinach, pod wpływem działania herbicydów, obok zmian aktywności enzymów może dojść także do zmian zawartości barwników asymilacyjnych [8,36,37,45,61,68,72,73, 78,80,94,97,98]. W badaniach dotyczących oddziaływania różnych czynników stresogennych na rośliny bardzo często oznacza się zawartość barwników asymilacyjnych [31,39,40, 51,58,83,110–119]. Zmiany zawartości chlorofilu i karotenoidów traktowane są jako godne uwagi wskaźniki starzenia się liści [102,103,120,121]. Podaje się także, że zmniejszenie zawartości chlorofilu może być dobrym wskaźnikiem dla monitoringu uszkodzeń podczas wzrostu i rozwoju roślin [36]. Zawartość chlorofilu w roślinach jest pozytywnie skorelowana z aktywnością fotosyntezy [51,111,122]. Podczas wzrostu roślin w abiotycznych warunkach stresowych dochodzi do zmniejszenia poziomu chlorofilu [51,57,78,83,111,114,122], co wpływa na hamowanie fotosyntezy [51,78,83,111,114]. Jest to typowy objaw stresu oksydacyjnego [111,113,123] i może być

m.in. wynikiem fotoutleniania barwnika i degradacji chlorofilu [111], hamowania aktywności enzymów biorących udział w biosyntezie chlorofilu, zniszczenia błony chloroplastów przez peroksydację lipidów ze względu na kumulację wolnych rodników [83]. W niektórych pracach naukowych wskazuje się wręcz, że chlorofil jest najważniejszym biomarkerem stresu oksydacyjnego [31,124]. Karotenoidy są barwnikami o kilku funkcjach w roślinach, oprócz ich bezpośredniej roli w procesie fotosyntezy, bardzo ważny jest ich udział w mechanizmach tolerancji na stres oksydacyjny [51]. Na podstawie wy-

ników badań dotyczących oddziaływania herbicydów na zawartość barwników asymilacyjnych w roślinach można wnioskować, że zmiany te zależą m.in. od rodzaju [36,68,72] czy dawki [8,61,73,80,96,98,107–109,125] herbicydu oraz terminu analizy [72,107–109].

Przeprowadzone przez Autorów badania wykazały, że 1,10-Phe spowodowała zmiany zawartości barwników asymilacyjnych w liściach roślin selera naciowego, które były w znacznym stopniu uzależnione od stężenia zastosowanego związku (Tabela 1). Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniej-

Tabela 1. Zmiany zawartości barwników asymilacyjnych w liściach selera naciowego pod wpływem 1,10-Phe (średnia \pm odchylenia standardowe, n = 6).

Barwniki asymilacyjne mg·g ⁻¹ św.m.	Stężenie 1,10-Phe mM				
	0	2.5	5.0	7.5	10.0
7. dzień po oprysku					
chl a	1.080 \pm 0.020	1.193 \pm 0.033	1.107 \pm 0.038	1.028 \pm 0.012	0.870 \pm 0.047
chl b	0.858 \pm 0.018	0.911 \pm 0.041	0.854 \pm 0.033	0.838 \pm 0.015	0.759 \pm 0.044
chl a+b	1.938 \pm 0.034	2.104 \pm 0.057	1.961 \pm 0.058	1.866 \pm 0.020	1.629 \pm 0.065
car	0.127 \pm 0.005	0.131 \pm 0.003	0.126 \pm 0.007	0.140 \pm 0.004	0.140 \pm 0.007
chl a/chl b	1.258 \pm 0.021	1.311 \pm 0.062	1.297 \pm 0.055	1.227 \pm 0.024	1.149 \pm 0.091
chl a+b/car	15.264 \pm 0.634	16.117 \pm 0.833	15.555 \pm 0.972	13.338 \pm 0.443	11.674 \pm 0.434
14. dzień po oprysku					
chl a	1.194 \pm 0.023	1.250 \pm 0.029	1.184 \pm 0.024	1.116 \pm 0.040	0.942 \pm 0.024
chl b	1.010 \pm 0.023	1.013 \pm 0.025	0.956 \pm 0.026	0.960 \pm 0.034	0.893 \pm 0.025
chl a+b	2.204 \pm 0.042	2.263 \pm 0.045	2.140 \pm 0.046	2.076 \pm 0.041	1.835 \pm 0.045
car	0.135 \pm 0.007	0.130 \pm 0.008	0.140 \pm 0.006	0.143 \pm 0.004	0.158 \pm 0.010
chl a/chl b	1.183 \pm 0.020	1.234 \pm 0.034	1.238 \pm 0.023	1.164 \pm 0.068	1.055 \pm 0.020
chl a+b/car	16.415 \pm 0.990	17.489 \pm 0.957	15.265 \pm 0.846	14.513 \pm 0.496	11.683 \pm 0.955
21. dzień po oprysku					
chl a	1.062 \pm 0.019	1.140 \pm 0.030	1.100 \pm 0.027	0.996 \pm 0.038	0.916 \pm 0.015
chl b	0.825 \pm 0.030	0.894 \pm 0.021	0.904 \pm 0.027	0.834 \pm 0.031	0.792 \pm 0.029
chl a+b	1.887 \pm 0.043	2.034 \pm 0.034	2.004 \pm 0.025	1.830 \pm 0.067	1.708 \pm 0.038
car	0.141 \pm 0.008	0.138 \pm 0.004	0.143 \pm 0.008	0.152 \pm 0.005	0.158 \pm 0.005
chl a/chl b	1.288 \pm 0.039	1.277 \pm 0.048	1.218 \pm 0.059	1.195 \pm 0.023	1.157 \pm 0.040
chl a+b/car	13.393 \pm 0.889	14.702 \pm 0.290	14.031 \pm 0.833	12.075 \pm 0.752	10.844 \pm 0.463
28. dzień po oprysku					
chl a	1.033 \pm 0.027	1.079 \pm 0.013	1.055 \pm 0.024	0.943 \pm 0.042	0.820 \pm 0.022
chl b	0.769 \pm 0.021	0.828 \pm 0.023	0.822 \pm 0.028	0.779 \pm 0.031	0.720 \pm 0.029
chl a+b	1.802 \pm 0.046	1.907 \pm 0.032	1.877 \pm 0.050	1.722 \pm 0.064	1.540 \pm 0.049
car	0.142 \pm 0.005	0.146 \pm 0.008	0.144 \pm 0.006	0.152 \pm 0.006	0.158 \pm 0.006
chl a/chl b	1.343 \pm 0.023	1.305 \pm 0.031	1.285 \pm 0.025	1.211 \pm 0.050	1.139 \pm 0.030
chl a+b/car	12.863 \pm 0.696	13.087 \pm 0.568	13.058 \pm 0.611	11.335 \pm 0.579	9.740 \pm 0.453
Średnia ze wszystkich terminów pomiarów					
chl a	1.092 \pm 0.071	1.166 \pm 0.073	1.111 \pm 0.053	1.021 \pm 0.073	0.887 \pm 0.054
chl b	0.866 \pm 0.103	0.911 \pm 0.077	0.884 \pm 0.059	0.853 \pm 0.077	0.791 \pm 0.074
chl a+b	1.958 \pm 0.174	2.077 \pm 0.148	1.995 \pm 0.110	1.873 \pm 0.148	1.678 \pm 0.125
car	0.136 \pm 0.007	0.136 \pm 0.008	0.138 \pm 0.008	0.147 \pm 0.006	0.153 \pm 0.009
chl a/chl b	1.268 \pm 0.067	1.282 \pm 0.035	1.259 \pm 0.038	1.199 \pm 0.027	1.125 \pm 0.047
chl a+b/car	14.484 \pm 1.649	15.349 \pm 1.889	14.477 \pm 1.154	12.815 \pm 1.402	10.985 \pm 0.918

Tabela 1. (c.d.).

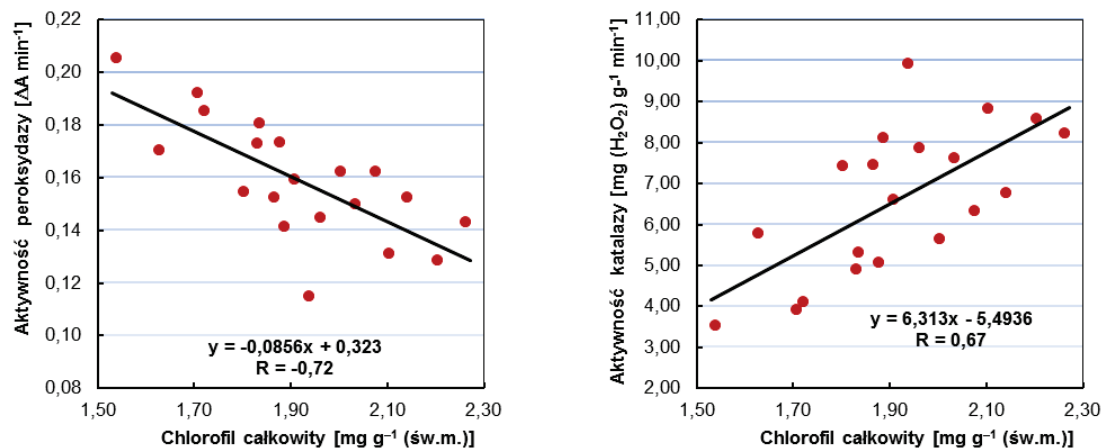
	NIR _{0,05} dla terminów pomiarów	NIR _{0,05} dla stężeń 1,10-Phe
chl <i>a</i>	0.041	0.036
chl <i>b</i>	0.040	0.036
chl <i>a+b</i>	0.065	0.058
car	0.009	0.008
chl <i>a</i> /chl <i>b</i>	0.061	0.055
chl <i>a+b</i> /car	1.003	0.897

szymi doniesieniami, z których wynika, że herbicydy fotodynamiczne, takie jak 1,10-Phe, wpływają na biosyntezę chlorofilu [22,126]. W analizowanych terminach (7., 14., 21. i 28. dzień po oprysku) rośliny traktowane 1,10-Phe o mniejszych stężeniach cechowały się nieco wyższym poziomem chlorofilu całkowitego (chl *a+b*) niż rośliny nietraktowane tym herbicydem. Zaobserwowany wzrost zawartości tego barwnika wynosił (średnio z całego okresu badań) około 6% przy najniższym z zastosowanych stężeń 1,10-Phe – 2.5 mM. Wyższe stężenia 1,10-Phe wywołały natomiast spadek poziomu chlorofilu całkowitego w odniesieniu do roślin kontrolnych, w całym analizowanym okresie. Przy stężeniu 1,10-Phe 7.5 mM odnotowano (średnio z całego okresu badań) około 5%, a przy stężeniu 10 mM około 15% spadek zawartości chlorofilu. Jednocześnie stwierdzono, że generalnie poziom chlorofilu w liściach selera naciowego spada z wiekiem roślin (Tabela 1). O spadku poziomu chlorofilu w trakcie wegetacji roślin świadczą liczne badania, które wskazują na powiązanie poziomu chlorofilu z procesem starzenia [36,102,103,127,128]. Zaobserwowany w przeprowadzonych badaniach spadek poziomu chlorofilu całkowitego w liściach selera traktowanego wyższymi dawkami 1,10-Phe może potwierdzać sugerowaną konkluzję, że związek ten przyspiesza proces starzenia się roślin wyższych, gdyż wiadomo, że starzenie liści charakteryzuje się degradacją chlorofilu [102,103]. Odnotowane w przeprowadzonym eksperymencie zmiany poziomu chlorofilu w liściach selera naciowego mogą sugerować, że 1,10-Phe generuje nadprodukcję RFT i stres oksydacyjny, zwłaszcza przy wyższych stężeniach związku. Dobrym markerem stresu oksydacyjnego jest nie tylko sam poziom chlorofilu [31,39,113,124], ważnym wskaźnikiem jest także stosunek chlorofilu *a* do chlorofilu *b* (chl *a*/chl *b*) [39,58,129]. W przeprowadzonych bada-

niach stosunek chl *a*/chl *b* w liściach selera naciowego istotnie uległ obniżeniu w stosunku do roślin kontrolnych, przy dwóch najwyższych zastosowanych stężeniach 1,10-Phe i wynika ze spadku poziomu chlorofilu *a* (Tabela 1). Spadek stosunku chl *a*/chl *b* wynikający ze spadku poziomu chlorofilu *a* świadczy o dużych uszkodzeniach fotosystemów i idącą za tym fotoinhibicją [39,58,129].

Uzyskane wyniki zmian aktywności enzymów CAT i POD oraz zawartości chlorofilu całkowitego w liściach selera naciowego pozwoliły na określenie wzajemnych korelacji (Rysunek 3). Stwierdzono ujemną korelację na poziomie 95% ($r = -0.72$; $n = 20$) między aktywnością POD a poziomem chlorofilu całkowitego oraz dodatnią korelację między aktywnością CAT a poziomem chlorofilu całkowitego ($r = 0.67$; $n = 20$). Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi, zaobserwowanymi w liściach salaty traktowanej 1,10-Phe [108].

Ujemna korelacja między aktywnością POD a poziomem chlorofilu całkowitego może wskazywać, że POD odgrywa ważną rolę w degradacji chlorofilu, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, w których wzrost aktywności POD łączony jest z procesem starzenia [103–105,130] i w których podaje się, że POD jest odpowiedzialna za degradację chlorofilu [130,131]. W pracach naukowych wskazuje się także na istotną rolę CAT w starzeniu się roślin oraz na spadek aktywności tego enzymu podczas starzenia [88,101,103,104]. Donoszono również, że spadek aktywności CAT pod wpływem czynników stresogennych, z powodu spadku detoksykacji H₂O₂, powoduje wzrost peroksydacji lipidów prowadzący do zniszczenia błony chloroplastów [88], co może skutkować spadkiem poziomu chlorofilu. W niektórych pracach, podczas starzenia liści obserwowano jednocześnie spadek aktywności CAT, wzrost aktywności POD oraz spadek zawartości chloro-


Rysunek 3. Korelacja pomiędzy aktywnością POD i CAT a zawartością chlorofilu całkowitego w liściach selera naciowego.

filu [103,104]. Zaobserwowana w niniejszej pracy ujemna korelacja między aktywnością POD a poziomem chlorofilu całkowitego oraz dodatnia korelacja między aktywnością CAT a poziomem chlorofilu całkowitego w liściach selera może zatem wskazywać, że 1,10-Phe przyspiesza proces starzenia.

Wyniki badań prezentowane w niniejszej pracy wykazały ponadto zmiany zawartości karotenoidów w liściach selera naciowego traktowanego wyższymi stężeniami 1,10-Phe, przy niższych stężeniach 1,10-Phe zawartość tego barwnika w liściach była na poziomie zbliżonym do roślin kontrolnych – nietraktowanych związkiem (Tabela 1). Przy stężeniu 1,10-Phe 7.5 mM zaobserwowano (średnio z całego okresu badań) około 8% wzrost poziomu karotenoidów w porównaniu do roślin nietraktowanych, a przy najwyższym z zastosowanych stężeń 1,10-Phe (10 mM) wzrost ten wynosił około 12.5%. Akumulacja karotenoidów uważana jest za jeden z przejawów odpowiedzi roślin na działanie różnych stresów abiotycznych [83,110], np. herbicydów [125]. Wzrost zawartości tego barwnika jest wynikiem ważnej roli tego pigmentu w detoksykacji RFT [83,99,110,132]. Zwiększenie poziomu karotenoidów w liściach selera naciowego traktowanego 1,10-Phe o wyższych stężeniach może świadczyć o nadprodukcji RFT w roślinach i wskazywać na próbę obrony poprzez zwiększenie zawartości karotenoidów. Przy wyższych z zastosowanych stężeń 1,10-Phe odnotowano ponadto istotny spadek stosunku chlorofilu całkowitego do karotenoidów ($chl\ a+b/car$) (Tabela 1), co może być potwierdzeniem, że przy tych stężeniach związku dochodzi w roślinach do stresu oksydacyjnego. O tym, że spadek stosunku $chl\ a+b/car$ jest niezbitym dowodem istnienia stresu oksydacyjnego w roślinach donoszono już wcześniej [39,116,118].

4. Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonego eksperymentu wykazały, że wysokie stężenia 1,10-Phe mogą niekorzystnie oddziaływać na rośliny uprawne. Obserwowany przy wyższych stężeniach związku wzrost aktywności peroksydazy i zawartości karotenoidów, przy jednoczesnym spadku aktywności katalazy i poziomu chlorofilu całkowitego w liściach selera naciowego oraz spadek stosunku $chl\ a/chl\ b$ i $chl\ a+b/car$ wskazują na zaistnienie stresu oksydacyjnego i uszkodzenie roślin.

Literatura

- [1] L. Settimi, R. Orford, F. Davanzo, C. Hague, H. Desel, D. Pelclova, G. Dragelyte, M. Mathieu-Nolf, R. Adams, R. Duarte-Davidson, *Environ. Int.*, **2016**, *91*, 332–340. doi: 10.1016/j.envint.2016.02.034
- [2] M. Arias-Estévez, E. López-Periago, E. Martínez-Carballo, J. Simal-Gándara, J.-C. Mejuto, L. García-Río, *Agric., Ecosyst. Environ.*, **2008**, *123*, 247–260. doi: 10.1016/j.agee.2007.07.011
- [3] U.S. McKnight, J.J. Rasmussen, B. Kronvang, P.J. Binning, P.L. Bjerg, *Environ. Pollut.*, **2015**, *200*, 64–76. doi: 10.1016/j.envpol.2015.02.015
- [4] J. Cooper, H. Dobson, *Crop Prot.*, **2007**, *26*, 1337–1348. doi: 10.1016/j.cropro.2007.03.022
- [5] W. Aktar, D. Sengupta, A. Chowdhury, *Interdiscip. Toxicol.*, **2009**, *2*, 1–12. doi: 10.2478/v10102-009-0001-7
- [6] C.A. Damalas, I.G. Eleftherohorinos, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **2011**, *8*, 1402–1419. doi: 10.3390/ijerph8051402
- [7] B. Lozowicka, *Sci. Total Environ.*, **2015**, *502*, 184–198. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.09.026
- [8] H. Qian, W. Chen, L. Sun, Y. Jin, W. Liu, Z. Fu, *Ecotoxicology*, **2009**, *18*, 537–543. doi: 10.1007/s10646-009-0311-8
- [9] C.L. Fabian, C.R. Binder, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **2015**, *12*, 4670–4696. doi: 10.3390/ijerph120504670
- [10] R. Gupta (red.), *Biomarkers in toxicology*, chapter 24, *Herbicides and fungicides*, **2014**, 409–431. doi: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00024-5
- [11] M. Anbia, M. Alvand, *Sci. Iran., Trans. C*, **2012**, *19*, 1573–1579. doi: 10.1016/j.scient.2012.07.004
- [12] N. Padmaja, G. NageswaraRao, *Chem. Speciation Bioavailability*, **2012**, *24*, 234–240. doi: 10.3184/095422912X13489993038027
- [13] W. Śliwa, *Prace Nauk. P. Wr., I. Ch. Org. i Fiz., Seria: Studia i Materiały*, **1978**.
- [14] A.D. Yapi, M. Mustofa, A. Valentin, O. Chavignon, J.-C. Teulade, M. Mallie, J.-P. Chapat, Y. Blache, *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, *48*, 1886–1889.
- [15] D. McNaughton, P.D. Godfrey, R.D. Brown, S. Thorwirth, J.-U. Grabow, *The Astrophys. J.*, **2008**, *678*, 309–315.
- [16] Z. Jaman, M.R. Karim, K. Dumenyo, A.H. Mirza, *Adv. Microbiol.*, **2014**, *4*, 1140–1153. doi: 10.4236/aim.2014.415124
- [17] U.B. Nandihalli, C.A. Rebeiz, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **1991**, *40*, 27–46. doi: 10.1016/0048-3575(91)90046-O
- [18] F. Dumitraşcu, M.R. Caira, C. Drăghici, M.T. Căprioiu, L. Barbu, B. Miu, *Rev. Roum. Chim.*, **2008**, *53*, 183–187.
- [19] D. İnci, R. Aydın, Ö. Vatan, D. Yılmaz, H.M. Gençkal, Y. Zorlu, T. Cavaş, *Spectrochim. Acta A*, **2015**, *145*, 313–324. doi: 10.1016/j.saa.2015.03.011
- [20] M. Anbia, M. Alvand, *Sci. Iran., Trans. C*, **2012**, *19*, 1573–1579. doi: 10.1016/j.scient.2012.07.004
- [21] T.V. Samovich, N.V. Shalygo, A.P. Kudryashov, N.G. Averina, *Russ. J. Plant Physiol.*, **2006**, *53*, 814–823. doi: 10.1134/S1021443706060136
- [22] B.C. Tripathy A. Mohapatra, I. Gupta, *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1767*, 860–868. doi: 10.1016/j.bbabi.2007.03.008
- [23] T.-H. Phung, S. Jung, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **2014**, *116*, 103–110. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.10.002
- [24] R. Szymańska, K. Strzałka, *Post. Biochem.*, **2010**, *56*, 182–190.
- [25] B.C. Tripathy, R. Oelmüller, *Plant Signaling Behav.*, **2012**, *7*, 1621–1633. doi: 10.4161/psb.22455
- [26] B. Nowicka, J. Kruk, *KOSMOS Probl. Nauk Biol.*, **2013**, *62*, 583–596.
- [27] K. Das, A. Roychoudhury, *Front. Environ. Sci.*, **2014**, *2*:53. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053
- [28] Y. Song, Y. Miao, C.-P. Song, *New Phytol.*, **2014**, *201*, 1121–1140. doi: 10.1111/nph.12565
- [29] V. Petrov, J. Hille, B. Mueller-Roeber, T.S. Gechev, *Front. Plant Sci.*, **2015**, *6*:69. doi: 10.3389/fpls.2015.00069
- [30] L.A. del Río, *J. Exp. Bot.*, **2015**, *66*, 2827–2837. doi: 10.1093/jxb/erv099
- [31] R. Biczak, *J. Hazard. Mater.*, **2016**, *304*, 173–185. doi: 10.1016/j.hazmat.2015.10.055
- [32] Ł. Wojtyła, M. Garnczarska, *KOSMOS Probl. Nauk Biol.*, **2016**, *65*, 207–215.
- [33] S.S. Gill, N. Tuteja, *Plant Physiol. Biochem.*, **2010**, *48*, 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- [34] P. Sharma, A.B. Jha, R.S. Dubey, M. Pessaraki, *J. Bot.*, **2012**, Article ID 217037, 1–26. doi: 10.1155/2012/217037

- [35] U. Krasuska, P. Staszek, A. Antosik, A. Gniazdowska, *KOSMOS Probl. Nauk Biol.*, **2014**, *63*, 95–106.
- [36] D. Agostinnetto, L.T. Perboni, A.C. Langaro, J. Gomes, D.S. Fraga, J.J. Franco, *Planta Daninha*, **2016**, *34*, 1–9. doi: 10.1590/S0100-83582016340100001
- [37] L.C. Ferreira, A.C. Cataneo, L.M.R. Remaeh, N. Corniani, T. de Fátima Fumis, Y.A. de Souza, J. Scavroni, B.J.A. Soares, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **2010**, *97*, 47–54. doi: 10.1016/j.pestbp.2009.12.003
- [38] M. Hasanuzzaman, K. Nahar, Md. M. Alam, R. Roychowdhury, M. Fujita, *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, *14*, 9643–9684. doi: 10.3390/ijms14059643
- [39] R. Biczak, B. Pawłowska, J. Feder-Kubis, *Chem. Environ. Biotechnol.*, **2016**, *19*, 35–45. doi: 10.16926/ceb.2016.19.05
- [40] R. Biczak, A. Telesiński, B. Pawłowska, *Plant Physiol. Biochem.*, **2016**, *107*, 248–256. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.016
- [41] A. Hanaka, M. Wójcik, S. Dresler, M. Mroczek-Zdyrska, W. Maksymiec, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2016**, *124*, 480–488. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.11.024
- [42] N. Sewelam, K. Kazan, P.M. Schenk, *Front. Plant Sci.*, **2016**, *7*:187. doi: 10.3389/fpls.2016.00187
- [43] M.S. Hossain, K.-J. Dietz, *Front. Plant Sci.*, **2016**, *7*:548. doi: 10.3389/fpls.2016.00548
- [44] S. Singh, S.M. Prasad, *Biochem. Cell. Arch.*, **2013**, *13*, 383–393.
- [45] M.P. Gomes, P. Juneau, *Environ. Pollut.*, **2016**, *218*, 402–409. doi: 10.1016/j.envpol.2016.07.019
- [46] B. Ali, Q. Tao, Y. Zhou, R.A. Gill, S. Ali, M.T. Rafiq, L. Xu, W. Zhou, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2013**, *92*, 271–280. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.02.006
- [47] A. Telesiński, B. Smolik, N. Skrzypiec, J. Nowak, *Ochr. Środ. Zasob. Natur.*, **2009**, *41*, 219–226.
- [48] S. Chawla, S. Jain, V. Jain, *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, **2013**, *22*, 27–34. doi: 10.1007/s13562-012-0107-4
- [49] E. Anjaneyulu, P.S. Reddy, M.S. Sunita, P.B.K. Kishor, B. Meriga, *J. Plant Physiol.*, **2014**, *171*, 789–798. doi: 10.1016/j.jplph.2014.02.001
- [50] S. Singh, S.M. Prasad, *Sci. Hortic.*, **2014**, *176*, 1–10. doi: 10.1016/j.scienta.2014.06.022
- [51] M. Al Hassan, M. Martínez Fuertes, F.J. Ramos Sánchez, O. Vicente, M. Boscaiu, *Not. Bot. Horti Agrobot.*, **2015**, *43*, 1–11. doi: 10.15835/nbha4319793
- [52] V. Mahdavi, M.M. Farimani, F. Fathi, A. Ghassempour, *Anal. Biochem.*, **2015**, *478*, 65–72. doi: 10.1016/j.ab.2015.02.021
- [53] A. de Sousa, H. AbdElgawad, A. Han, J. Teixeira, M. Matos, F. Fidalgo, *Front. Plant Sci.*, **2016**, *7*:685. doi: 10.3389/fpls.2016.00685
- [54] A. Singh, S.M. Prasad, S. Singh, M. Singh, *Chem. Ecol.*, **2016**, *32*, 684–706. doi: 10.1080/02757540.2016.1182994
- [55] V. Demidchik, *Environ. Exp. Bot.*, **2015**, *109*, 212–228. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021
- [56] H.G. Sedigheh, M. Mortazavian, D. Norouzian, M. Atyabi, A. Akbarzadeh, K. Hasanpoor, M. Ghorbani, *BMC Res. Notes*, **2011**, *4*, 477–485. doi: 10.1186/1756-0500-4-477
- [57] S. Hattab, S. Hattab, H. Boussetta, M. Banni, *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **2014**, *14*, 89–99.
- [58] Y. Chen, F. Lin, H. Yang, L. Yue, F. Hu, J. Wang, Y. Luo, F. Cao, *Acta Physiol. Plant.*, **2014**, *36*, 3173–3187. doi: 10.1007/s11738-014-1684-8
- [59] B. Duarte, D. Santos, J.C. Marques, I. Caçador, *Plant Physiol. Biochem.*, **2014**, *77*, 122–132. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.01.023
- [60] T.-H. Phung, S. Jung, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, *459*, 346–351. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.125
- [61] R.C. de Souza, D.T. da Rocha Gomes Ferreira, H. dos Santos Vitorino, G.V. de Souza Barbosa, L. Endres, V.M. Ferreira, *Int. Res. J. Plant Sci.*, **2012**, *3*, 80–87.
- [62] R. Biczak, B. Herman, P. Rychter, *Proc. ECOpole*, **2011**, *5*, 161–171.
- [63] E. Rożek, R. Nurzyńska-Wierdak, M. Kosior, *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, **2013**, *12*, 227–239.
- [64] S. Kalembasa, E. Malinowska, D. Kalembasa, B. Symanowicz, K. Pakuła, *J. Elem.*, **2014**, *3*, 683–696. doi: 10.5601/jelem.2014.19.3.699
- [65] M.G. Gardiner, R. Cleland, *Phytochemistry*, **1974**, *13*, 1095–1098.
- [66] H.U. Bergmeyer, *Methods Enzym. Anal.*, New York: Academic Press, **1963**.
- [67] R. Oren, K.S. Werk, N. Buchmann, R. Zimmermann, *Can. J. For. Res.*, **1993**, *23*, 1187–1195.
- [68] A.C. Langaro, D. Agostinnetto, C. Oliveira, J.D.G. Silva, M.S. Bruno, *Planta Daninha*, **2016**, *34*, 277–289. doi: 10.1590/S0100-83582016340200009
- [69] I.P. Grigoryuk, U.V. Lykholat, G.S. Rossykhina-Galycha, N.O. Khromykh, O.I. Serga, *Ann. Agrar. Sci.*, **2016**, *14*, 95–98. doi: 10.1016/j.aasci.2016.05.008
- [70] F. Islam, B. Ali, J. Wang, M.A. Farooq, R.A. Gill, S. Ali, D. Wang, W. Zhou, *Plant Physiol. Biochem.*, **2016**, *107*, 82–95. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.027
- [71] D. Štajner, M. Popović, M. Štajner, *Biol. Plant.*, **2003**, *47*, 575–579.
- [72] N.M. Hassan, M.M. Nemat Alla, *Acta Physiol. Plant.*, **2005**, *27*, 429–438. doi: 10.1007/s11738-005-0047-x
- [73] S.V. Ivanov, V.S. Alexieva, E.N. Karanov, *Russ. J. Plant Physiol.*, **2005**, *52*, 213–219. doi: 10.1007/s11183-005-0033-6
- [74] C.A. Moldes, L.O. Medici, O.S. Abrahão, S.M. Tsai, R.A. Azevedo, *Acta Physiol. Plant.*, **2008**, *30*, 469–479. doi: 10.1007/s11738-008-0144-8
- [75] M.A. Nohatto, D. Agostinnetto, A.C. Langaro, C. de Oliveira, Q. Ruchel, *Pesq. Agropec. Trop., Goiânia*, **2016**, *46*, 28–34. doi: 10.1590/1983-40632016v4638011
- [76] H. Jiang, X. Deng, J. Wang, J. Peng, T. Zhou, *PLoS One*, **2014**, *9*, e93654. doi: 10.1371/journal.pone.0093654
- [77] X. Liu, C. Qi, Z. Wang, Y. Li, Q. Wang, M. Guo, A. Cao, *Chilean J. Agric. Res.*, **2014**, *74*, 438–444. doi: 10.4067/S0718-58392014000400010
- [78] L. Jiang, Y. Yang, L.X. Jia, J.L. Lin, Y. Liu, B. Pan, Y. Lin, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2016**, *127*, 87–94. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.01.012
- [79] S. Ali, P. Bai, F. Zeng, S. Cai, I.H. Shamsi, B. Qiu, F. Wu, G. Zhang, *Environ. Exp. Bot.*, **2011**, *70*, 185–191. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.09.002
- [80] G.B. Akbulut, E. Yigit, D. Bayram, *J. Environ. Anal. Toxicol.*, **2015**, *5*:271. doi: 10.4172/2161-0525.1000271
- [81] M.K. Daud, L. Mei, M.T. Variath, S. Ali, C. Li, M.T. Rafiq, S.J. Zhu, *BioMed Res. Int.*, **2014**, Article ID 975946. doi: 10.1155/2014/975946
- [82] T. Abedi, H. Pakniyat, *Czech J. Genet. Plant Breed.*, **2010**, *46*, 27–34.
- [83] P. Parmar, B. Dave, A. Sudhir, K. Panchal, R.B. Subramanian, *Int. J. Curr. Res.*, **2013**, *5*, 080–089.
- [84] P. Ahmad, C.A. Jaleel, M.A. Salem, G. Nabi, S. Sharma, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2010**, *30*, 161–175. doi: 10.3109/07388550903524243
- [85] P. Wang, X. Yang, W.W. Huang, M. Zhang, W.H. Lu, H.T.

- Zhao, J. Wang, H.L. Liu, A.J. Dong, H. Zhang, R.B. Xu, P. Zou, C.L. Cheng, Y.C. Zhang, J. Jing, *Food Chem.*, **2014**, *146*, 569–576. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.085
- [86] Z. Chen, H. Chen, Y. Zou, Y. Wen, *Sci. Total Environ.*, **2016**, *562*, 73–80. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.205
- [87] T. Karuppanapandian, J.-C. Moon, C. Kim, K. Manoharan, W. Kim, *Aust. J. Crop Sci.*, **2011**, *5*, 709–725.
- [88] L.A. del Río, F.J. Corpas, L.M. Sandalio, J.M. Palma, J.B. Barroso, *IUBMB Life*, **2003**, *55*, 71–81. doi: 10.1080/1521654031000094694
- [89] J. Michałowicz, W. Duda, *Pol. J. Environ. Stud.*, **2009**, *18*, 845–852.
- [90] M.M. Nemat Alla, N.M. Hassan, *Acta Physiol. Plant.*, **2007**, *29*, 247–258. doi: 10.1007/s11738-007-0031-8
- [91] M.P. Radchenko, A.M. Sychuk, Y.Y. Morderer, *J. Plant Prot. Res.*, **2014**, *54*, 390–394.
- [92] G.L. Wu, J. Cui, L. Tao, H. Yang, *Ecotoxicology*, **2010**, *19*, 124–132. doi: 10.1007/s10646-009-0396-0
- [93] U. Janicka, H. Mioduszezowska, E. Kielak, J. Klocek, M. Horbowicz, *Pol. J. Environ. Stud.*, **2008**, *17*, 485–490.
- [94] N. Ahuja, H.P. Singh, D.R. Batish, R.K. Kohli, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **2015**, *118*, 64–70. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.11.012
- [95] T. Mahakavi, R. Bakiyaraj, L. Baskaran, N. Rashid, K.S. Ganesh, *Int. Lett. Nat. Sci.*, **2014**, *9*, 58–65. doi: 10.18052/www.scipress.com/ILNS.9.58
- [96] K.A. Fayez, D.E.M. Radwan, A.K. Mohamed, A.M. Abdelrahman, *Photosynthetica*, **2014**, *52*, 548–554. doi: 10.1007/s11099-014-0062-5
- [97] M.P. Gomes, S.G. Le Manac'h, S. Maccario, M. Labrecque, M. Lucotte, P. Juneau, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **2016**, *130*, 65–70. doi: 10.1016/j.pestbp.2015.11.010
- [98] A. Kaya, E. Yigit, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2014**, *106*, 232–238. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.04.041
- [99] R. Rucińska-Sobkowiak, *Post. Biochem.*, **2010**, *56*, 191–200.
- [100] H. Vanacker, L.M. Sandalio, A. Jiménez, J.M. Palma, F.J. Corpas, V. Meseguer, M. Gómez, F. Sevilla, M. Leterrier, C.H. Foyer, L.A. del Río, *J. Exp. Bot.*, **2006**, *57*, 1735–1745. doi: 10.1093/jxb/erl012
- [101] A. Mhamdi, G. Queval, S. Chaouch, S. Vanderauwera, F. Van Breusegem, G. Noctor, *J. Exp. Bot.*, **2010**, *61*, 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282
- [102] D. Prochazkova, R.K. Sairam, G.C. Srivastava, D.V. Singh, *Plant Sci.*, **2001**, *161*, 765–771.
- [103] İ. Karataş, L. Öztürk, Y. Erşahin, Y. Okatan, *Pak. J. Bot.*, **2010**, *42*, 1881–1888.
- [104] M. Kar, D. Mishra, *Plant Physiol.*, **1976**, *57*, 315–319.
- [105] P.B. Goud, M.S. Kachole, *Plant Signaling Behav.*, **2011**, *6*, 1371–1376. doi: 10.4161/psb.6.9.16316
- [106] P. Yonova, E. Zozikova, *Bulg. J. Plant Physiol.*, **2001**, *27*, 60–75.
- [107] B. Herman, R. Biczak, E. Gurgul, *Biol. Plant.*, **1998**, *41*, 607–611. doi: 10.1023/A:1001808903867
- [108] B. Herman, R. Biczak, *Biul. Nauk. UWM w Olsztynie*, **2001**, *12*, 227–237.
- [109] B. Herman, R. Biczak, P. Rychter, *Proc. ECOpole*, **2012**, *6*, 199–205. doi: 10.2429/proc.2012.6(1)026
- [110] R. Chandra, R.N. Bharagava, S. Yadav, D. Mohan, *J. Hazard. Mater.*, **2009**, *162*, 1514–1521. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.06.040
- [111] S.A. Anjum, X.-Y. Xie, L.-C. Wang, M.F. Saleem, C. Man, W. Lei, *Afr. J. Agric. Res.*, **2011**, *6*, 2026–2032. doi: 10.5897/AJAR10.027
- [112] T. Tounekti, A.M. Vadel, M. Oñate, H. Khemira, S. Munné-Bosch, *Environ. Exp. Bot.*, **2011**, *71*, 298–305. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.12.016
- [113] M. Gholami, M. Rahemi, B. Kholdebarin, S. Rastegar, *Sci. Hortic.*, **2012**, *148*, 109–117. doi: 10.1016/j.scienta.2012.09.005
- [114] M. Ashraf, P.J.C. Harris, *Photosynthetica*, **2013**, *51*, 163–190. doi: 10.1007/s11099-013-0021-6
- [115] D. Di Baccio, A. Castagna, R. Tognetti, A. Ranieri, L. Sebastiani, *J. Plant Physiol.*, **2014**, *171*, 1693–1705. doi: 10.1016/j.jplph.2014.08.007
- [116] R. Jbir-Koubaa, S. Charfeddine, W. Ellouz, M.N. Saidi, N. Drira, R. Gargouri-Bouzi, O. Nouri-Ellouz, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, **2014**, *120*, 933–947. doi: 10.1007/s11240-014-0648-4
- [117] J. Žaltauskaitė, G. Kišonaitė, *Biologija*, **2014**, *60*, 148–154.
- [118] Z. Gengmao, H. Yu, S. Xing, L. Shihui, S. Quanmei, W. Changhai, *Ind. Crops Prod.*, **2015**, *64*, 175–181. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.10.058
- [119] B. Pawłowska, R. Biczak, *Chemosphere*, **2016**, *149*, 24–33. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.072
- [120] A. Pružinská, G. Tanner, S. Aubry, I. Anders, S. Moser, T. Müller, K.-H. Ongania, B. Kräutler, J.-Y. Youn, S.J. Liljegren, S. Hörtensteiner, *Plant Physiol.*, **2005**, *139*, 52–63. doi: 10.1104/pp.105.065870
- [121] A.R. Falqueto, D. Cassol, A.M. de Magalhães Júnior, A.C. de Oliveira, M.A. Bacarin, *Pesqui. Agropecu. Bras.*, **2009**, *44*, 695–700. doi: 10.1590/S0100-204X2009000700007
- [122] M.R. Amirjani, M. Mahdihyeh, *ARNP J. Agric. Biol. Sci.*, **2013**, *8*, 291–301.
- [123] G. Noctor, C. Lelarge-Trouverie, A. Mhamdi, *Phytochemistry*, **2015**, *112*, 33–53. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.09.002
- [124] M.C. Bubalo, K. Hanousek, K. Radošević, V.G. Srček, T. Jakovljević, I.R. Redovniković, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2014**, *101*, 116–123. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.12.022
- [125] A. Kaya, Z.B. Doganlar, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2016**, *124*, 470–479. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.11.026
- [126] C.A. Rebeiz, K.N. Reddy, U.B. Nandihalli, J. Velu, *Photochem. Photobiol.*, **1990**, *52*, 1099–1117.
- [127] R. De Michele, E. Formentin, F. Lo Schiavo, *Plant Signaling Behav.*, **2009**, *4*, 319–321.
- [128] R. De Michele, E. Formentin, M. Todesco, S. Toppo, F. Carimi, M. Zottini, E. Barizza, A. Ferrarini, M. Delledonne, P. Fontana, F. Lo Schiavo, *New Phytol.*, **2009**, *181*, 563–575. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02684.x
- [129] Q. Wang, X. Que, R. Zheng, Z. Pang, C. Li, B. Xiao, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2015**, *22*, 9646–9657. doi: 10.1007/s11356-015-4104-8
- [130] Z. Balouchi, M. Ghasemnezhad, M. Saadatian, G.A. Peyvast, *Electron. J. Pol. Agric. Univ.*, **2014**, *17*, #12. <http://www.ejpau.media.pl/volume17/issue2/art-12.html>
- [131] D. Guerrero-Arteaga, D. Trejo-Escobar, D. Mejía-España, O. Osorio, *Acta Hortic.*, **2014**, *1016*, 151–156. doi: 10.17660/ActaHortic.2014.1016.21
- [132] G.N. Smolikova, N.A. Laman, O.V. Boriskevich, *Russ. J. Plant Physiol.*, **2011**, *58*, 965–973. doi: 10.1134/S1021443711060161