

Eugeniusz Gurgul<sup>1</sup>  
Barbara Herman<sup>1</sup>  
Robert Biczak<sup>1</sup>  
Eberhard Lippmann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Częstochowa

<sup>2</sup>Uniwersytet, Lipsk

## ODDZIAŁYWANIE POCHODNYCH TETRAZOŁO[2,1-c]CHINOKSALINY NA PRZEMIANY METABOLICZNE W SELERZE NACIOWYM I PIETRUSZCZE NACIOWEJ

### CZĘŚĆ I. ZMIANY AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ PEROKSYDAZY, KATALAZY I FOSFATAZY KWAŚNEJ W OKRESIE WEGETACJI ROŚLIN

**Streszczenie:** Przebadano wpływ pochodnych tetrazolo[2,1-c]chinoksaliny o stężeniu 0,01% i 0,1% na aktywność katalityczną peroksydazy, katalazy i fosfatazy kwaśnej w selerze naciowym (*Apium graveolens* L. var. *dulce* Pers.) i pietruszce naciowej (*Petroselinum hortense* Hoffm. subsp. *macrocarpum* Mark.) w ich fazach rozwojowych. Obserwowano wzrost aktywności katalitycznej badanych enzymów w roślinach doświadczalnych pod wpływem tetrazolo[2,1-c]chinoksaliny.

#### 1. Wstęp

Stosowanie chemicznych środków ochrony roślin jest obecnie nieodzowne w prawidłowej agrotechnice. Środki te jako związki aktywne biologicznie mogą wywoływać zmiany w procesach fizjologiczno-biochemicznych roślin uprawnych, objawiające się między innymi zmianą aktywności katalitycznej enzymów w różnych stadiach rozwoju rośliny [1-4] oraz zmianą ich składu biochemicznego [5-7].

Ciągłe poszukiwania nowych środków ochrony roślin oraz substancji aktywnych, regulujących wzrost i skład roślin uprawnych, skłaniają do prowadzenia wielokierunkowych badań nad nowymi grupami związków chemicznych.

Pomiary aktywności enzymów roślinnych traktowane są coraz częściej jako wskaźniki służące do określenia zaopatrzenia roślin w poszczególne składniki mineralne, stopnia porażenia roślin chorobami czy wpływu czynników zewnętrznych, w tym także środków ochrony roślin. Przedmiotem studiów w tym zakresie są między innymi takie enzymy, jak katalaza [EC 1.11.1.6.], peroksydaza [EC 1.11.1.7.] i fosfataza kwaśna [EC 3.1.3.2.], z uwagi na funkcje jakie pełnią w roślinie. Główną rolą fizjologiczną katalazy jest rozkład  $H_2O_2$  [8], którego usuwanie jest także podstawową funkcją peroksydazy [9]. Enzymy te pełnią istotne funkcje w procesach wzrostu i rozwoju roślin [10]. O współzależności pomiędzy aktywnością fosfatazy kwaśnej a zdolnością rozwoju roślin donosili natomiast Janowski i Iguacio [11].

Niniejsza praca miała na celu przebadanie zmian aktywności katalitycznej: peroksydazy, katalazy i fosfatazy kwaśnej w selerze naciowym i pietruszce naciowej, pod wpływem pochodnych tetrazolo[2,1-c]chinoksaliny, w okresie wegetacji roślin.

## 2. Metodyka badań

Doświadczenie wazonowe zostało przeprowadzone w szklarni w latach 1992-1993, roślinami doświadczalnymi były: seler naciowy (*Apium graveolens* L.var. *dulce* Pers.) i pietruszka naciowa (*Petroselinum hortense* Hoffm. subsp. *macrocarpum* Mark.).

Wazony o pojemności 7l napełniono glebą brunatną posiadającą pH = 6,8; zawartość próchnicy 1,6%; wyjściowa zasobność składników pokarmowych: N - 120 mg,  $P_2O_5$  - 180 mg,  $K_2O$  - 120 mg i MgO - 80 mg w 1 dm<sup>3</sup>. Wilgotność podłoża utrzymywano na stałym poziomie we wszystkich wazonach.

Rozsadę selera naciowego posadzono do wazonów w połowie maja, a pietruszkę naciową wysiano bezpośrednio do wazonów w pierwszej połowie kwietnia.

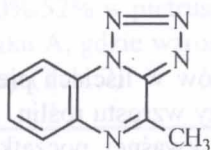
Badaniami objęto cztery pochodne tetrazolo[2,1-c]chinoksaliny zsyntetyzowane w Instytucie Chemii Uniwersytetu w Lipsku:

A - 2-metylotetrazolo[2,1-c]chinoksalina

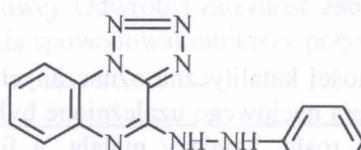
B - 2-chlorotetrazolo[2,1-c]chinoksalina

C - 2-(fenylohydrazyno)-tetrazolo[2,1-c]chinoksalina

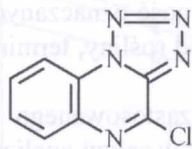
D - 2-(4'-nitrofenylohydrazyno)-tetrazolo[2,1-c]chinoksalina



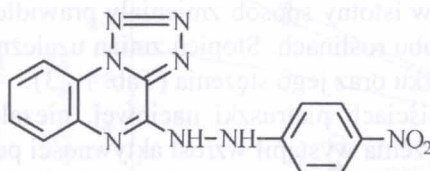
A



C



B



D

Oprysku związkami azaaromatycznymi o dwóch stężeniach 0.01% i 0.1% dokonano 12 czerwca. Ilość zastosowanych związków wynosiła ok. 2.0 cm<sup>3</sup> roztworu o danym stężeniu na wazon (co odpowiada 0.02 g i 0.2 g związku na powierzchnię 1 m<sup>2</sup>).

Materiał roślinny do oznaczenia aktywności enzymów pobierano trzykrotnie w odstępach jednego miesiąca począwszy od 1 lipca. Do analizy pobierano po trzy próbki z każdej kombinacji składającej się z 20 w pełni wyrosniętych liści.

Wyciągi do badań enzymatycznych przygotowano poprzez homogenizację 1 g świeżego materiału roślinnego w schłodzonym buforze o ściśle określonym pH dla każdego enzymu [12], w homogenizatorze typ MPW-120. Jednorodny materiał pozostawiono w komorze chłodniczej w temp. od 0 do +4 °C na okres 24 godzin. Po tym czasie całą objętość homogenatu odwirowano w temp. od 0 do +4 °C w czasie 15 minut w wirówce typ MPW-360 przy 3000 obr./min, a uzyskany wyciąg uzupełniono do objętości 20 cm<sup>3</sup>.

Aktywność peroksydazy oznaczono z o-dianizydyną jako H-donor [13], względną jednostkową aktywność enzymu stanowił przyrost ekstynkcji w czasie ( $\Delta A/\text{min}$ ) w temperaturze 30 °C. Katalazę oznaczono poprzez określenie ilości rozłożonego H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w mg/lg świeżej masy liści w ciągu 1 min. w temp. 30 °C, zgodnie z metodą Bergmayera [14] oraz Chance'a i Machlye'a [15]. Aktywność fosfatazy kwaśnej określono na drodze oznaczenia uwolnionego fosforu z  $\beta$ -glicerofosforanu sodu, przez enzym zawarty w 1 g świeżej masy roślin według metody opisanej przez Brandenburgera i Hansona [16].

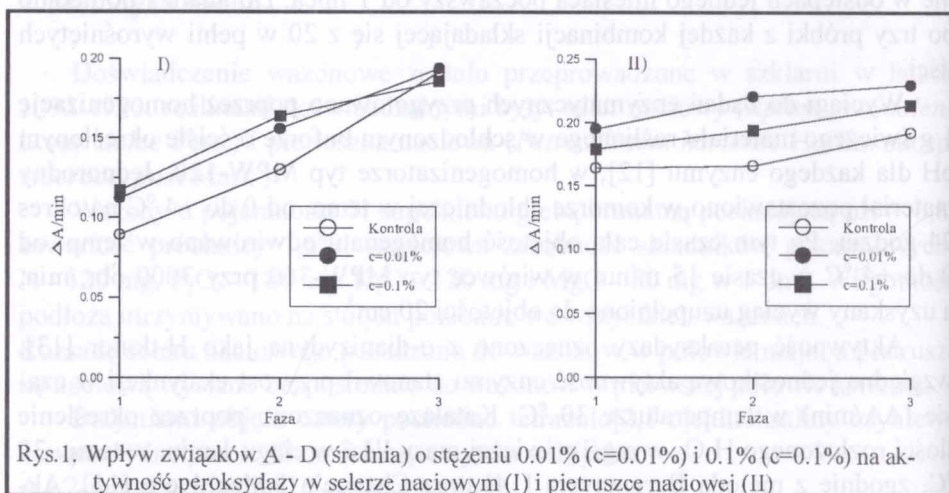
Obliczenia statystyczne wykonano zgodnie z układem doświadczenia - metodą kompletnej randomizacji, otrzymując półprzedziały ufności Tukey'a dla analizowanych aktywności enzymatycznych.

### 3. Wyniki

Aktywności katalityczne oznaczanych enzymów w liściach pietruszki naciowej i selera naciowego uzależnione były od fazy wzrostu roślin. Aktywność peroksydazy rosła, katalazy malała, a fosfatazy kwaśnej początkowo rosła, a następnie malała z wiekiem, niezależnie od kombinacji.

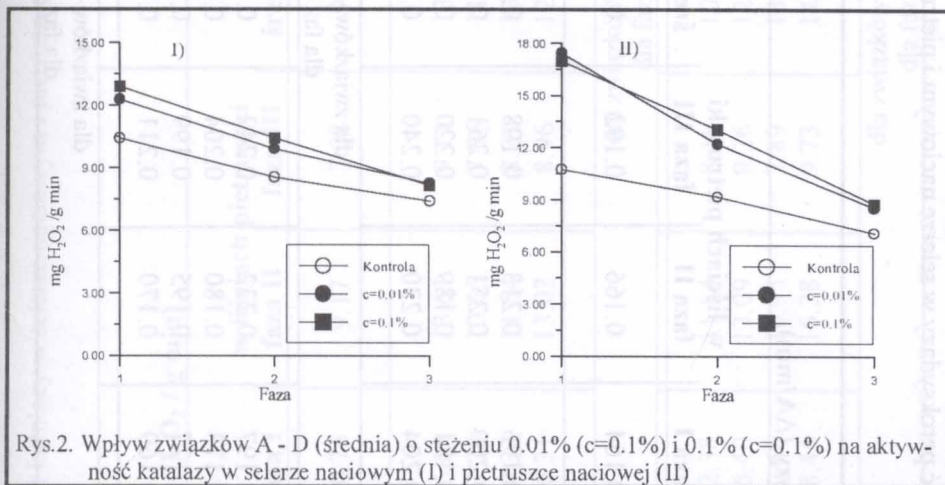
Zastosowane w doświadczeniu pochodne tetrazolo[2,1-c]chinoksaliny (A - D) w istotny sposób zmieniały prawidłową aktywność oznaczanych enzymów w obu roślinach. Stopień zmian uzależniony był od rośliny, terminu analizy, związku oraz jego stężenia (Tab. 1 - 3).

W liściach pietruszki naciowej, niezależnie od zastosowanego związku i jego stężenia wystąpił wzrost aktywności peroksydazy w całym analizowanym okresie, w stosunku do kontroli; stopień zmian wynosił średnio 16% dla związków o stężeniu 0.01% i 6% przy stężeniu 0.1%. W przypadku selera naciowego stymulujący wpływ badanych związków zaznaczył się głównie w pierwszych dwóch analizowanych fazach, obserwowany wzrost aktywności peroksydazy kształtował się na poziomie 22%/28% (Rys. 1). W trzeciej fazie (Tab. 1) podniesiony poziom tego enzymu wystąpił jedynie pod wpływem związku B o stężeniu 0.01% (7%) i związku A o stężeniu 0.1% (11%).



Analiza zmian w aktywności katalazy wskazuje na znaczny jej wzrost w roślinach opryskanych pochodnymi tetrazolochinoksaliny, w stosunku do kontroli, niezależnie od terminu analizy, przy czym największe zmiany wystąpiły w początkowym okresie wegetacji roślin (Rys. 2). Dla trzech związków (B, C, D) stopień zmian (średnio z faz) był tym większy, im wyższe było ich stężenie i wynosił średnio dla tych związków 16%/24% w liściach selera na-

ciowego i 40%/52% w pietruszce naciowej. Odwrotną zależność zaobserwowano dla związku A, gdzie wzrost stężenia spowodował mniejszy przyrost aktywności katalazy (Tab. 2).



Przebadane związki, oprócz stymulującego wpływu na aktywność katalazy i peroksydazy, wywoływały również wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej w roślinach doświadczalnych. Największe zmiany wystąpiły w pierwszych dwóch analizowanych fazach wzrostu (Tab. 3). Obserwowany wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej w odniesieniu do roślin kontrolnych wynosił średnio 10%/15% w selerze naciowym i 9%/8% w pietruszce naciowej, odpowiednio dla stężeń 0.01% i 0.1% (Rys. 3).

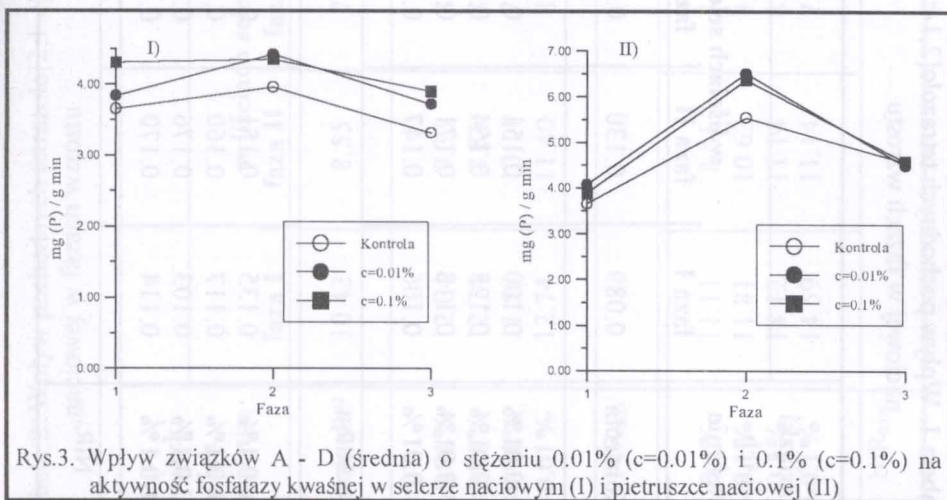


Tabela 1. Wpływ pochodnych tetrazolo[2,1-c]chinoksaliny na aktywność peroksydazy w selerze naciowym i pietruszce naciowej w fazach wzrostu

Związki i ich stężenia	Aktywność peroksydazy ( $\Delta A/\text{min}$ )							
	faza I	w liściach selera			faza I	w liściach pietruszki		
		faza II	faza III	średnia		faza II	faza III	średnia
<b>Kontrola</b>	0.089	0.130	0.192	0.137	0.164	0.166	0.192	0.174
<b>A-0.01%</b>	0.100	0.151	0.197	0.149	0.196	0.213	0.198	0.202
<b>B-0.01%</b>	0.123	0.154	0.205	0.161	0.200	0.251	0.261	0.237
<b>C-0.01%</b>	0.118	0.171	0.198	0.162	0.181	0.189	0.220	0.197
<b>D-0.01%</b>	0.106	0.147	0.175	0.143	0.204	0.230	0.240	0.225
NIR <sub>0,05</sub>	dla związków - 0.010 dla faz - 0.014				dla związków - 0.010 dla faz - 0.014			
<b>A-0.1%</b>	0.135	0.151	0.214	0.167	0.197	0.232	0.242	0.224
<b>B-0.1%</b>	0.117	0.160	0.184	0.154	0.173	0.180	0.204	0.185
<b>C-0.1%</b>	0.103	0.176	0.169	0.149	0.177	0.195	0.199	0.190
<b>D-0.1%</b>	0.114	0.170	0.176	0.153	0.169	0.170	0.211	0.183
NIR <sub>0,05</sub>	dla związków - 0.006 dla faz - 0.009				dla związków - 0.007 dla faz - 0.010			

Tabela 2. Wpływ pochodnych tetrazolo[2,1-c]chinoksaliny na aktywność katalazy w selerze naciowym i pietruszce naciowej w fazach wzrostu

Związki i ich stężenia	Aktywność katalazy (mg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / g min)							
	w liściach selera				w liściach pietruszki			
	faza I	faza II	faza III	średnia	faza I	faza II	faza III	średnia
<b>Kontrola</b>	10.42	8.55	7.41	8.79	10.73	9.17	7.08	9.00
<b>A-0.01%</b>	12.04	9.33	8.95	10.11	16.65	13.61	9.14	13.14
<b>B-0.01%</b>	12.74	8.81	8.64	10.06	17.39	10.65	7.86	11.97
<b>C-0.01%</b>	11.58	10.11	7.41	9.70	19.32	11.54	8.21	13.02
<b>D-0.01%</b>	12.74	11.40	8.03	10.72	16.31	13.02	8.96	12.77
NIR <sub>0,05</sub>	dla związków - 0.86 dla faz - 1.21				dla związków - 0.79 dla faz - 1.11			
<b>A-0.1%</b>	11.11	8.81	8.34	9.42	12.38	11.84	8.16	10.79
<b>B-0.1%</b>	11.81	10.62	8.64	10.36	16.40	13.09	9.26	12.92
<b>C-0.1%</b>	14.12	11.14	8.01	11.09	20.66	10.95	7.89	13.17
<b>D-0.1%</b>	14.59	11.14	7.64	11.12	18.46	16.28	9.73	14.82
NIR <sub>0,05</sub>	dla związków - 0.78 dla faz - 1.11				dla związków - 0.89 dla faz - 1.25			

Tabela 3. Wpływ pochodnych tetrazolo[2,1-c]chinoksaliny na aktywność fosfatazy kwaśnej w selerze naciowym i pietruszce naciowej w fazach wzrostu

Związki i ich stężenia	Aktywność fosfatazy kwaśnej (mg P / g)							
	faza I	w liściach selera			faza I	w liściach pietruszki		
		faza II	faza III	średnia		faza II	faza III	średnia
<b>Kontrola</b>	3.656	3.958	3.316	3.644	3.657	5.542	4.573	4.590
<b>A-0.01%</b>	3.646	4.271	3.375	3.764	3.938	5.833	4.698	4.823
<b>B-0.01%</b>	3.865	5.084	3.667	4.205	4.250	6.729	4.498	5.159
<b>C-0.01%</b>	3.885	4.094	3.969	3.983	4.385	6.792	4.135	5.104
<b>D-0.01%</b>	3.959	4.219	3.886	4.021	3.719	6.667	4.656	5.014
<b>NIR<sub>0.05</sub></b>			dla związków - 0.086 dla faz - 0.121				dla związków - 0.131 dla faz - 0.185	
<b>A-0.1%</b>	4.438	3.958	3.583	3.993	4.094	6.354	4.906	5.118
<b>B-0.1%</b>	4.709	4.438	3.750	4.299	3.823	6.417	4.584	4.941
<b>C-0.1%</b>	3.990	4.740	4.063	4.264	3.906	7.125	4.271	5.101
<b>D-0.1%</b>	4.084	4.250	4.219	4.184	3.729	5.583	4.573	4.628
<b>NIR<sub>0.05</sub></b>			dla związków - 0.088 dla faz - 0.125				dla związków - 0.118 dla faz - 0.167	



#### 4. Dyskusja

W celu określenia stopnia ingerencji związków aktywnych biologicznie w procesy fizjologiczno-biochemiczne roślin coraz częściej bada się zmiany aktywności enzymatycznej katalazy, peroksydazy i fosfatazy kwaśnej, co związane jest z funkcjami jakie pełnią w rozwoju i wzroście roślin [1, 3, 17, 18].

Różne związki w różny sposób wpływają na aktywność enzymów, np. badania nad herbicydami wykazały, że jedne z nich hamują aktywność peroksydazy i nieznacznie podnoszą aktywność katalazy [19], podczas gdy inne powodują wzrost peroksydazy [17] czy spadek katalazy [20] lub wzrost aktywności obu enzymów [21] w traktowanych roślinach uprawnych w odniesieniu do poziomu enzymów w roślinach kontrolnych.

Będąc przedmiotem badań pochodne tetrazolo[2,1-c]chinoksaliny stymulująco działały na aktywność katalazy, peroksydazy i fosfatazy kwaśnej zarówno w selerze naciowym, jak i w pietruszce naciowej. Wzrosty aktywności katalazy i peroksydazy mogą być uważane jako wartości przystosowawcze lub odzwierciedlać zwiększone natężenie procesu oddychania w roślinach [18]. Mogą być także związane z opóźnieniem procesu starzenia się roślin [22]. Grappelli i Rossi [23] łączyli wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej z przyspieszeniem wzrostu roślin.

Z przeprowadzonego doświadczenia wynika, że stopień zmian w aktywności badanych enzymów uzależniony był od rośliny i jej fazy rozwojowej, a także od stężenia związków. O uzależnieniu stopnia ingerencji związków aktywnych biologicznie od rodzaju, gatunku, a nawet odmiany roślin donosili w swych pracach Piskornik [3] oraz Kostowska i wsp. [2], którzy pisali ponadto o uzależnieniu zmian od fazy rozwojowej rośliny i stężenia związku.

Biorąc pod uwagę średnią z działania badanych związków na aktywności enzymatyczne w roślinach doświadczalnych, które wskazują na wzrost poziomu tych enzymów bez względu na związek można wnioskować, że o kierunku działania decyduje ich budowa chemiczna.

Zaobserwowane w niniejszej pracy zmiany w aktywności enzymatycznej peroksydazy, katalazy i fosfatazy kwaśnej w selerze naciowym i pietruszce naciowej pod wpływem badanych pochodnych tetrazolo[2,1-c]chinoksaliny dowodzą, że związki te w znaczny sposób oddziałują na procesy fizjologiczno-biochemiczne zachodzące w roślinach.

## LITERATURA

1. M.R. De Felipe, M.M. Lucas, J.M. Pozuelo: Cytochemical study of catalase and peroxidase in the mesophyll of *Lolium rigidum* plants treated with isotoproturon. *J. Plant Physiol.*, 1988, 132, 67-73.
2. B. Kostowska, K. Gabińska, J. Rola, J. Szymczak, A. Sykut, A. Wybieralska: Wpływ herbicydów na biologiczną wartość ziarna niektórych odmian pszenicy, *Rocz. Nauk Rol.*, S.E., 1984, 14 (1-2), 209-221.
3. Z. Piskornik: Wpływ wybranych fungicydów na aktywność inwertazy w liściach grochu cukrowego (*Pisum sativum* L.), *Zesz. Nauk. AR Kraków, Ogrodnictwo*, 1980, 157(7), 3-14.
4. P.L. Swarnkar, S.P. Bohra, N. Chandra: Biochemical studies on initiation of callus in *Solanum surattense*, *J. Plant Physiol.*, 1986, 126, 293-296.
5. Z. Ciećko, G. Nowak: Wpływ pestycydów na wysokość plonu i jakość bulw ziemniaka, *Pestycydy*, 1989, 3, 17-23.
6. A. Dobrzański: Wpływ ochrony przed chwastami na technologię produkcji, jakość i wartość biologiczną warzyw, XXXI Sesja Nauk. IOR, Cz.I, 1991, 125-133.
7. Z. Zwolińska-Śniatałowa: Zmiany biochemiczne w roślinach pod wpływem chemicznych środków ochrony roślin, *Biuletyn IOR*, 1974, 57, 81-90.
8. E.A. Mac Rae, I.B. Ferguson: Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature, *Physiol. Plant.*, 1985, 65, 51-56.
9. A. Upadhyaya, D. Sankhla, T.D. Davis, N. Sankhla, B.N. Smith: Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves, *J. Plant Physiol.*, 1985, 121, 453-461.
10. R.B. van Huystee, W.L. Cairns: Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development, *Phytochemistry*, 1982, 21, 1843-1847.
11. R. Janowski, G. Iguacio: Relation between phosphatase content and germinating capacity in seeds of different species, *Circ. Farm.*, 1977, 35, 33-34.
12. E. Gurgul, Wpływ nawadniania oraz nawożenia azotem i magnezem na aktywność niektórych enzymów, plonowanie oraz skład chemiczny kapusty głowiastej czerwonej i włoskiej, *Praca hab.*, AR Szczecin, 1982, 106.
13. M.G. Gardiner, R. Cleland: Peroxidase changes during the cessation of elongation in *Pisum sativum* stems, *Phytochemistry*, 1974, 13, 1095-1098.
14. H.U. Bergmayer, *Methods of enzymatic analysis*, Acad. Press, New York, 1963.
15. B. Chance, A.C. Machly: Assay of catalases and peroxidases, *Methods in enzymology*, Acad. Press, New York, 1955, 2, 764-775.
16. H. Brandenberger, R. Hanson: Spectrophotometric determination of acid and alkaline phosphatases, *Helv. Chim. Acta*, 1953, 36, 900.
17. M.J. Cañal, R.S. Sánchez Tamés, B. Fernández: Peroxidase and polyphenoloxidase activities in *Cyperus esculentus* leaves following glyphosate applications, *Physiol. Plant.*, 1988, 74, 125-130.
18. C.V. Murumkar, P.D. Chavan: Salinity induced biochemical changes during germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Acta Agron. Hung.*, 1987, 36(1-2), 43-49.

19. M.M. Declaire, Y.P. Honorez, G.V. van Roey: Activité des peroxidase, catalase et glycolate oxydase après traitement avec divers herbicides, *Weed Research.*, 1982, 22, 85-88.
20. E.A. Havar: The *in vivo* and *in vitro* inhibition of catalase from leaves of *Nicotiana sylvestris* by 3-amino-1,2,4-triazole, *Plant Physiol.*, 1992, 99, 533-537.
21. E.W. Carroll, O.J. Schwarz, L.G. Hickok: Biochemical studies of paraquat - tolerant mutants of the fern *Ceratopteris richardii*, *Plant Physiol.*, 1988, 87, 651-654.
22. M. Kar, D. Mishra: Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence, *Plant Physiol.*, 1976, 57, 315-319.
23. A. Grapelli, W. Rossi: The effect of phytohormones produced by arthobacter sp. on the phosphatase activity in plant roots, *Folia Microbiol.*, 1981, 26(2), 137-141.

E. Gurgul  
B. Herman  
R. Biczak  
E. Lippmann

## The influence of tetrazole[2,1-c]quinoxaline derivatives on the metabolism in celery and leafy parsley

### PART I. The changes of catalytic activity of peroxidase, catalase and acid phosphatase at plants development process

**Abstract:** There was studied the influence of tetrazole[2,1-c]quinoxaline derivatives at concentration 0.01% and 0.1% on the catalytic activity of peroxidase, catalase and acid phosphatase in celery (*Apium graveolens* L.var. *dulce* Pers.) and leafy parsley (*Petroselinum hortense* Hoffm. subsp. *macrocarpum* Mark.) at their development process. The increase of catalytic activity of studied enzymes in presented plants exposed to the action of tetrazole[2,1-c]quinoxaline derivatives was observed.

1. Wstęp

Stwierdzenie w rolnictwie związków chemicznych takich jak środki ochrony roślin czy substancji wzrostowych może wywoływać zaniepokojenie w metabolicznie roślin uprawnych czego objawem są między innymi zmiany w ich składzie biochemicznym [1, 2]. Stwarza to podstawy do prowadzenia badań nad wpływem nowych grup związków chemicznych na skład i jakość w zależności od sposobu gospodarowania jako drena i droga przetwarzania. W rolnictwie warzyw mogą