

Dynamics of free amino acid content changes in plants of field poppy (*Papaver rhoeas* L.) under the influence of tribenuron methyl

Dynamika zmian zawartości wolnych aminokwasów w roślinach maku polnego (*Papaver rhoeas* L.) pod wpływem działania tribenuronu metylu

Renata Kieloch, Jerzy Sadowski, Mariusz Kucharski

Summary

Experiments on the dynamics of free amino acid (valine, leucine and isoleucine) content changes in *Papaver rhoeas* L. tissues were carried out under controlled environment conditions, in climatic chambers, with fixed temperature 20/10°C (day/night). Plants were sprayed with tribenuron methyl jointly with adjuvant Trend 90 EC at the dose of 20 g/ha + 0.05%, when weeds were at the growth stage of 2–4 leaves. Amino acid content was determined using gas chromatography, with EZ faast Amino Acid Analyser. The initial analysis was made directly prior to plants spraying and successive ones were performed during two weeks period. In the untreated object, each amino acid content systematically increased during 14 days following the herbicide treatment. The plants treated with tribenuron methyl responded to herbicide by initial amino acid overproduction, which may be temporary response to herbicidal stress. Starting from the eighth day after the treatment, amino acid content successively reduced as compared to initial measurement data.

Key words: tribenuron methyl, *Papaver rhoeas* L., dynamics, free amino acids

Streszczenie

Badania nad oceną dynamiki zmian zawartości wolnych aminokwasów (waliny, leucyny i izoleucyny) w tkankach roślin *Papaver rhoeas* L. wykonano w warunkach kontrolowanych, w komorach klimatycznych, ze stałą temperaturą powietrza 20/10°C (dzień/noc). Rośliny opryskano tribenuronem metylu łącznie z adiuwantem Trend 90 EC w dawce 20 g/ha + 0,05%, gdy chwasty znajdowały się w fazie 2–4 liści (BBCH 12–14). Zawartość aminokwasów w roślinach oznaczono metodą chromatografii gazowej, z wykorzystaniem zestawu EZ faast Amino Acid Analysis. Początkową zawartość aminokwasów oznaczono bezpośrednio przed zastosowaniem herbicydu, kolejne analizy wykonano w ciągu dwóch tygodni od zabiegu. W obiekcie kontrolnym, w ciągu 14 dni zawartość każdego z aminokwasów systematycznie wzrastała. Rośliny potraktowane tribenuronem metylu zareagowały na herbicyd początkową nadprodukcją aminokwasów, co może być wynikiem przejściowej reakcji na stres herbicydowy. Począwszy od 8 dnia od wykonania zabiegu, zawartość aminokwasów systematycznie malała w porównaniu do stanu wyjściowego.

Słowa kluczowe: tribenuron metylu, *Papaver rhoeas* L., dynamika zmian, wolne aminokwasy

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Herbologii i Techniki Uprawy Roli
Orzechowa 61, 50-540 Wrocław
r.kieloch@iung.wroclaw.pl

Wstęp / Introduction

Tribenuron metylu jest substancją aktywną herbicydów należących do grupy pochodnych sulfonilomocznika stosowanych do zwalczania chwastów dwuliściennych w zbożach, zawartą m.in. w preparacie Granstar 75 WG. Jego działanie powoduje zahamowanie aktywności działania enzymu ALS (acetolactate synthase – syntaza acetomleczanowa), w następstwie czego pojawiają się zakłócenia w procesie biosyntezy aminokwasów o łańcuchach rozgałęzionych – waliny, leucyny i izoleucyny (Ray 1984; McCourt i Duggleby 2006). Aminokwasy stanowią materiał wyjściowy do biosyntezy białek, dlatego ich niedobór prowadzi do ograniczenia syntezy tych związków, a w konsekwencji zamierania roślin. Zastosowanie herbicydów hamujących działanie enzymu ALS skutkuje niedoborem waliny, leucyny i izoleucyny w tkankach roślin. Można przypuszczać, że spadek zawartości wolnych aminokwasów powinien iść w parze ze zmianami w roślinach, np. zahamowaniem ich wzrostu, co w przypadku herbicydów z tej grupy obserwuje się po upływie około 1 tygodnia. We wcześniejszych badaniach niski poziom waliny, leucyny i izoleucyny na skutek działania herbicydu wykazano po upływie 7 dni od zastosowania preparatu chwastobójczego (Kieloch i wsp. 2011). Nie ma informacji o kształtowaniu się poziomu tych związków w krótkim czasie po aplikacji herbicydu oraz jak szybko następują zmiany w ich zawartości.

Papaver rhoeas L. jest gatunkiem chwastu powszechnie występującym w uprawach zbóż i jednocześnie wysoce dla nich konkurencyjnym. Wykazuje on wysoką wrażliwość na prezentowany w niniejszej pracy tribenuron metylu, jakkolwiek stwierdzono przypadki uodpornienia się niektórych jego biotypów na herbicydy z grupy inhibitorów enzymu ALS (Marshall i wsp. 2010; Kaloumenos i wsp. 2011).

Celem badań była ocena dynamiki zmian zawartości wolnych aminokwasów w tkankach roślin *P. rhoeas* pod wpływem działania tribenuronu metylu.

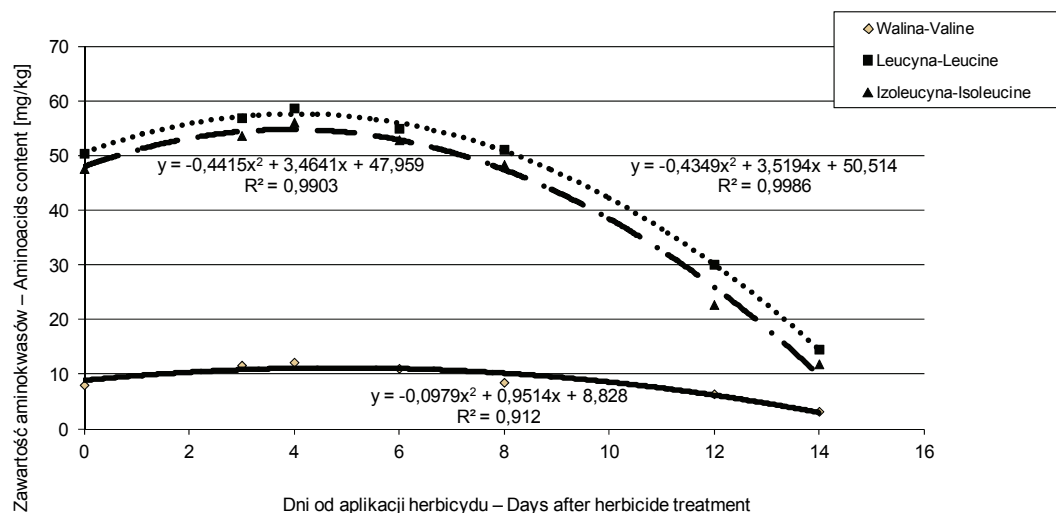
Materiały i metody / Materials and methods

Doświadczenia przeprowadzono w warunkach kontrolowanych w komorach klimatycznych. Nasiona *P. rhoeas* wysiano do plastikowych doniczek wypełnionych podłożem składającym się z torfu i piasku w stosunku objętościowym 2:1. Bezpośrednio po siewie doniczki umieszczono w komorze klimatycznej, w temperaturze 20°C (dzień)/10°C (noc). Dzień przed aplikacją herbicydu wykonano przerywkę, pozostawiając po 6 roślin w każdej doniczce. Zabieg herbicydowy wykonano, gdy rośliny znajdowały się we wczesnej fazie rozwojowej, tj. 2–4 liście (BBCH 22–24). Tribenuron metylu aplikowano w formie herbicydu Granstar 75 WG. Zastosowano go łącznie z surfaktantem Trend 90 EC w dawce 20 g/ha + 0,05%. Zabieg wykonano w komorze opryskowej „Aporo” wyposażonej w ruchomą dyszę (TeeJet XR 11003-VS), pracującą z ciśnieniem roboczym 200 kPa i zapewniającą wydatek cieczy użytkowej 250 l/ha.

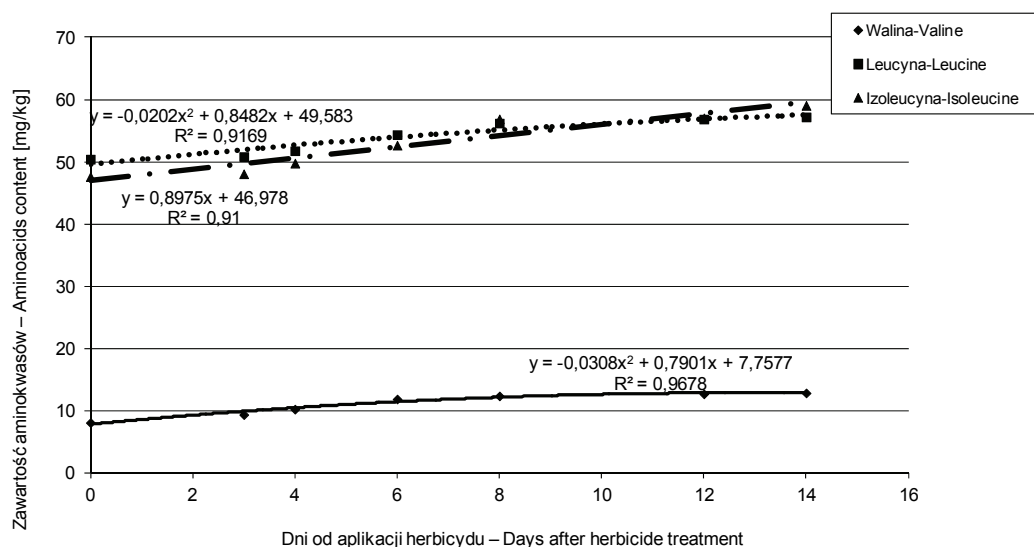
Materiał roślinny do oznaczenia zawartości wolnych aminokwasów pobierano w przebiegu dwóch tygodni od wykonania zabiegu (0, 3, 4, 6, 8, 12 i 14 dni). Ścinano w całości nadziemne części roślin potraktowanych herbicydem, jak i tych, które rosły w obiekcie kontrolnym. W pobranych próbkach roślinnych oznaczono zawartość waliny, leucyny i izoleucyny metodą chromatografii gazowej z zastosowaniem zestawu EZ faastAminoAcid Analysis firmy Phenomenex. Poszczególne próbki roślinne wstępnie poszatkowano i wymieszano. Do czasu wykonania analiz próbki przechowywano w polietylenowych woreczkach w zamrażarce (–20°C). Do analizy pobierano po 2 g próbki, do której dodawano 15 ml wody destylowanej, a następnie poddawano tę mieszaninę homogenizacji za pomocą homogenizatora ULTRA-TURRAX T25. Po dokładnym rozdrobnieniu, próbkę przesączono. Uzyskany ekstrakt (12 ml) odparowano na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 2 ml wody destylowanej i poddano procesowi odwirowania zawiesiny (4000 rpm/20 min). Dalsze przygotowanie ekstraktu wykonano z wykorzystaniem zestawu „EZ: faast GC–MS for freeamino-acidanalysis” (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Do analizy pobierano pipetą 200 µl klarownego roztworu znad osadu. Procedura analizy aminokwasów z wykorzystaniem zestawu EZ: faast opiera się na ekstrakcji do fazy stałej, po której następuje reakcja derywatyzacji (tworzenie pochodnych) i ekstrakcji typu ciecz/ciecz. Ekstrakcja do fazy stałej przeprowadzana jest za pomocą specjalnych tipsów z upakowanym sorbentem, które wiążą aminokwasy, podczas gdy reszta roztworu przepływa dalej i nie ulega związaniu. Następnie aminokwasy, za pomocą strzykawkę, są wypychane do fiolki i przechodzą w formę pochodną przy użyciu kolejnego odczynnika (temperatura pokojowa). Wszystkie aminokwasy w formie pochodnej migrują do wytworzonej warstwy organicznej, która następnie jest odseparowywana od reszty mieszaniny. Tak powstała próbka jest gotowa do analizy chromatograficznej GC/MS. Oznaczenie aminokwasów przeprowadzono na chromatografii gazowej Varian CP–3800 z detektorem mas Varian Saturn 2200. W analizie wykorzystano kolumnę Varian VF–5 ms, o długości 30 m i średnicy 0,25 mm. Temperatura w komorze nastrzykowej wynosiła 230°C, a temperatura kolumny 120–230°C w programie z gradientem równym 10°C/min. Gazem nośnym był azot (1,5 ml/min).

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Aminokwasy są materiałem wyjściowym do syntezy białek stanowiących materiał budulcowy dla tkanek roślinnych. Wraz ze wzrostem roślin, ich zawartość powinna systematycznie wzrastać, co potwierdzono w przeprowadzonych badaniach. Obserwowano wzrost koncentracji tych składników w roślinach z obiektu kontrolnego w stosunku do stanu wyjściowego. Spośród ocenianych wolnych aminokwasów zdecydowanie najmniej było waliny. Jej zawartość w roślinach, w dniu oprysku wynosiła 8,03 mg/kg i wzrosła w okresie 2 tygodni do 12,8 mg/kg. Pozostałe aminokwasy, tj. leucyna i izoleu-



Rys. 1. Zmiany w zawartości aminokwasów w obiekcie kontrolnym
Fig. 1. Amino acid content changes at untreated object



Rys. 2. Zmiany w zawartości aminokwasów pod wpływem tribenuronu metylu
Fig. 2. Amino acid content changes under the influence of tribenuron methyl

cyna osiągnęły zbliżone wartości, a ich poziom znacznie przewyższał zawartość waliny i wynosił początkowo 50,4 mg/kg leucyny oraz 47,6 mg/kg izoleucyny. W próbkach roślin pobieranych w regularnych odstępach, w ciągu 14 dni od pomiaru początkowego, obserwowano systematyczny wzrost zawartości tych składników (rys. 1). W roślinach traktowanych tribenuronem metylu, początkowo zawartość każdego z ocenianych aminokwasów wzrastała. Najwyższy poziom waliny, leucyny i izoleucyny stwierdzono w roślinach pobranych po upływie 4 dni od aplikacji herbicydu, przy czym największy przyrost dotyczył waliny (z 8,03 do 12,18 mg/kg). Począwszy od ósmego dnia od zastosowania tribenuronu metylu, notowano systematyczny spadek zawartości wolnych aminokwasów w stosunku do poziomu najwyższego oznaczonego w obiekcie herbicydowym, jak i w stosunku do wartości uzyskanych w tym samym czasie w obiekcie

kontrolnym. Po 14 dniach od wykonania zabiegu zawartość waliny została zredukowana o 60% w porównaniu do poziomu wyjściowego. W przypadku leucyny i izoleucyny spadek ten wynosił odpowiednio 71 i 75% (rys. 2).

Herbicydy powodują zakłócenia w przemianach biochemicznych chwastów, co w końcowym efekcie prowadzi do zamierania lub znacznego zahamowania wzrostu i rozwoju gatunków wrażliwych na zastosowaną substancję aktywną. Mechanizm działania niektórych substancji aktywnych herbicydów, m.in. prezentowanego w pracy tribenuronu metylu, jest ukierunkowany na hamowanie działania enzymu ALS (syntaza acetomleczanowa), które są odpowiedzialne za biosyntezę trzech aminokwasów o łańcuchach rozgałęzionych: waliny, leucyny i izoleucyny. W związku z powyższym można oczekiwać, że ich poziom będzie wyznacznikiem działania tych herbicydów już w początkowym okresie po opryskaniu roślin. Według

Shanera i Singha (1992) w roślinach traktowanych herbicydami sulfonilomocznikowymi powinien wystąpić deficyt aminokwasów o łańcuchach rozgałęzionych, tj. waliny, leucyny i izoleucyny, na skutek zahamowania ich biosyntezy, a w konsekwencji śmierć roślin z powodu braku materiału budulcowego. Podobne objawy obserwowano w przeprowadzonych badaniach. Następował znaczący spadek zawartości tych związków pod wpływem działania tribenuronu metylu. Początkowo jednak obserwowano nadmierną produkcję waliny, leucyny i izoleucyny. Taki stan jest reakcją rośliny na stres herbicydowy, spowodowany zastosowaniem inhibitora enzymu ALS (Royuela i wsp. 2000). Dotychczas prowadzone badania wykazały zwiększoną zawartość aminokwasów krótko po działaniu czynnika stresowego oraz gdy rośliny były poddane jego działaniu przez krótki okres czasu. W badaniach nad chlorosulfuronem wykazano wzrost poziomu wolnych aminokwasów jako rezultat jego działania, który był wynikiem wtórnych przemian aminokwasów i białek w roślinie (Bestman 1990). Zaobserwowano również wzrost zawartości aminokwasów jako wynik współdziałania aplikacji herbicydu oraz stresu środowiskowego, który indukuje określone procesy biochemiczne prowadzące do nagromadzenia się tych związków (Hjorth i wsp. 2006).

Przemiany związków azotowych w roślinach podlegają dynamicznym zmianom, zwłaszcza gdy są one narażone na działanie czynnika stresowego. w przypadku, gdy takim czynnikiem jest herbicyd, poziom aminokwasów zależy od mechanizmu ich działania. Niektóre herbicydy mogą ograniczać asymilację amoniaku, co w konsekwencji hamuje tworzenie się białek. W związku z tym wyższy poziom aminokwasów, na skutek stosowania herbicydów, może być prawdopodobnie wynikiem rozpadu istniejących

białek niż nowych syntez (Nemat Alla i wsp. 2008). Z kolei Huang i Xiong (2009) dowiedli, że znaczne nagromadzenie się wolnych aminokwasów po zastosowaniu acetochloru i bensulfuronu metylu wynikało z ich negatywnego wpływu na asymilację azotu oraz działanie enzymów biorących udział w przemianach azotu. Stosowanie herbicydów hamujących działanie enzymu ALS, nie zawsze daje jednoznaczne i oczekiwane wyniki (Kieloch i wsp. 2011), zwłaszcza gdy próbki roślinne do analizy chemicznej były pobrane tylko w jednym terminie. Badania nad oceną dynamiki zmian zawartości wolnych aminokwasów dają bardziej przejrzysty obraz zmian zachodzących w roślinie. Mogą również posłużyć do oceny wrażliwości danego gatunku na substancję aktywną herbicydu oraz do identyfikacji biotypów na nią odpornych (Marczewska i wsp. 2007).

Wnioski / Conclusions

1. Poziom poszczególnych aminokwasów był zróżnicowany, niezależnie od obiektu. Zawartość leucyny i izoleucyny była zbliżona i kształtowała się na poziomie kilkakrotnie wyższym niż waliny.
2. Zastosowanie tribenuronu metylu wywołało w roślinach *P. rhoeas* przejściową, trwającą do 8 dni, reakcję na stres herbicydowy w postaci wzrostu zawartości wolnych aminokwasów. Po upływie tego okresu poziom aminokwasów ulegał zmniejszeniu, co było zgodne z mechanizmem działania herbicydu.

Opracowanie wykonano w ramach zadania 2.6 w programie wieloletnim Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowego Instytutu Badawczego.

Literatura / References

- Bestman H.D., Devine M.D., Vanden Born W.H. 1990. Herbicide chlorsulfuron decreases assimilate transport out of treated leaves of field pennycress (*Thlaspi arvense* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 93 (4): 1441–1448.
- Hjorth M., Mathiassen S.K., Kudsk P., Ravn H.W. 2006. Amino acids in loose silky-bent (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.) responding to prosulfocarb exposure and the correlation with physiological effects. *Pestic. Biochem. Physiol.* 86 (3): 138–145.
- Huang H., Xiong Z.T. 2009. Toxic effects of cadmium, acetochlor and bensulfuron-methyl on nitrogen metabolism and plant growth in rice seedlings. *Pestic. Biochem. Physiol.* 94 (2–3): 64–67.
- Kaloumenos N.S., Adamouli V.N., Dordas C.A., Eleftherohorinos I.G. 2011. Corn poppy (*Papaver rhoeas*) cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides. *Pest. Manage. Sci.* 67 (5): 574–585.
- Kieloch R., Sadowski J., Domaradzki K. 2011. Wpływ tribenuronu metylu oraz mieszaniny 2,4-D + florasulam stosowanych w zróżnicowanych warunkach termicznych na zawartość aminokwasów w wybranych gatunkach chwastów. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 51 (2): 976–981.
- Marczewska K., Rola H., Sadowski J. 2007. Wolne aminokwasy wskaźnikiem odporności chwastów na chlorosulfuron. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 47 (3): 199–205.
- Marshall R., Hull R., Moss S.R. 2010. Target site resistance to ALS inhibiting herbicides in *Papaver rhoeas* and *Stellaria media* biotypes from the UK. *Weed Res.* 50 (6): 621–630.
- McCourt J.A., Duggleby R.G. 2006. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids* 31 (2): 173–210.
- Nemat Alla M.M., Badawi A.M., Hassan N.M., El-Bastawisy Z.M., Badran E.G. 2008. Effect of metribuzin, butachlor and chlorimuron-ethyl on amino acid and protein formation in wheat and maize seedlings. *Pestic. Biochem. Physiol.* 90 (1): 8–18.
- Ray T.B. 1984. Site of action of chlorsulfuron. Inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiol.* 75 (3): 827–831.
- Royuela M., Gonzalez A., Gonzales E.M., Arrese-Igor C., Aparicio Tejo P.M. 2000. Physiological consequences of continuous, sublethal imazethapyr supply to pea plants. *J. Plant Physiol.* 157 (3): 345–354.
- Shaner D.L., Singh B.K. 1992. How does inhibition of amino acids biosynthesis kill plants? p. 174–183. In: „Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants” (B.K. Singh, H.E. Flores, J.C. Shannon, eds). American Society of Plant Physiologist, Rockville, Md, 386 pp.