

EFEKAT NIKOSULFURONA NA BIOHEMIJSKE MARKERE OKSIDATIVNOG STRESA U LISTU I KORIJENU KUKURUZA

Andela Kuvelja¹, Biljana Davidović-Plavšić¹, Danijela Lukić¹, Nemanja Gajić¹, Mirjana Žabić², Siniša Škondrić¹, Biljana Kukavica^{1*}

¹Univerzitet u Banjoj Luci, Prirodno-matematički fakultet, Banja Luka

²Univerzitet u Banjoj Luci, Poljoprivredni fakultet, Banja Luka

E-mail: biljana.kukavica@pmf.unibl.org

Izvod

Kukuruz (*Zea mays* L.) je jedna od najznačajnijih poljoprivrednih kultura i kao takav, predstavlja predmet mnogih istraživanja, u cilju iskorištenja potpunog genetskog potencijala i kvaliteta, te zaštite od štetnog djelovanja spoljašnjih faktora. Obzirom da korov u početnim fazama razvoja biljaka kukuruza može ozbiljno uticati na prinos efikasno suzbijanje korova je od velikog značaja. Kao najznačajniji herbicidi u borbi protiv korovskih biljaka u kukuruzu izdvojili su se oni iz grupe sulfonilurea. U radu je ispitan uticaj različitih koncentracija (150 µg/mL i 250 µg/mL) herbicida nikosulfurona na biohemijske (oksidativne i antioksidativne) parametre listova i korijena dva hibrida (ZP 555 i ZP 606) kukuruza. Nakon tretmana biljaka kukuruza različitim koncentracijama nikosulfurona u trajanju od pet dana, mjerene su koncentracije vodonik peroksida (H₂O₂), fenolnih komponenti, ukupan hlorofil, te aktivnosti enzima peroksidaza Klase III (POD) i askorbat peroksidaza (APX). Rezultati su pokazali pojavu specifičnih razlika u listu i korijenu oba hibrida kukuruza. Uočene su razlike pri djelovanju različitih koncentracija nikosulfurona i razlike u tolerantnosti hibrida na nikosulfuron.

Ključne riječi: nikosulfuron; hibridi kukuruza; oksidativni stres; antioksidativni metabolizam; biohemijski parametri

UVOD

Biljke, kao slabo pokretljivi organizmi, ne mogu izbjeći stresne uticaje kojima su izložene tokom svog vegetacionog perioda. Ukoliko su duži vremenski period izložene nekom stresnom faktoru, biljke razvijaju niz morfoloških, fizioloških i biohemijskih adaptacija na nepovoljne uslove sredine (Tarchoune i sar., 2010). Biomarkeri oksidativnog stresa su mjerljivi parametri do čije promjene dolazi u prisustvu nekog stresnog faktora. Na osnovu promjene biomarkera moguće je odrediti jačinu, odnosno stepen nastalog oksidativnog stresa. Oksidativni stres nastaje usljed hiperprodukcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, *reactive oxygen species*), bez postojanja adekvatnog mehanizma za njihovo uklanjanje. Najvažnija posljedica dejstva stresnog faktora jeste indukcija oksidativnog stresa. Mjerenjem nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta (superoksid anjon radikal, vodonik peroksid, hidroksilni radikal ili singlet kiseonik) moguće je odrediti intenzitet dejstva stresnog faktora na biljku (Radovanović i sar., 2004). Vodonik peroksid (H_2O_2) reguliše odbrambene, aklimatizacione i razvojne procese u biljci i predstavlja najstabilniju i najmobilniju reaktivnu kiseoničnu vrstu. Reaktivne kiseonične vrste mogu indukovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje proteina i DNK, te oksidaciju skoro svih organskih molekula. Takođe, antioksidativni enzimi imaju važnu ulogu pri mjerenju stepena oksidativnog stresa, zbog mogućnosti relativno lakog mjerenja, spektrofotometrijskim metodama (Poljšak i sar., 2010). Askorbat peroksidaza (APX) je specifična za biljke i karakteriše se visokim afinitetom prema askorbatu. Nalazi se u svim dijelovima ćelije gdje učestvuje u procesu uklanjanja H_2O_2 u askorbat-glutation ciklusu (Asada i sar., 1987). Peroksidaze Klase III (POD) katalizuju redukciju vodonik peroksida uz pomoć elektrona koji potiču od jedinjenja kao što su fenoli, lignin, auksin ili sekundarni metaboliti. POD mogu uticati na odbrambeni sistem korijena i listova biljaka na izloženost raznim hemikalijama, herbicidima, i drugim izvorima abiotičkog stresa (Tarchoune i sar., 2010).

Kao indikator djelovanja abiotičkog stresa na biljku, može se koristiti i koncentracija fenolnih jedinjenja, kao neenzimskih komponenti antioksidativnog mehanizma. Dejstvo stresnih faktora može dovesti do inhibicije antioksidativnih enzima, pri čemu fenolna jedinjenja zauzimaju glavno mjesto u antioksidativnoj odbrani organizma (Veljović-Jovanović i sar., 2017). Njihova antioksidativna aktivnost je rezultat sposobnosti doniranja vodonikovog atoma, pri čemu nastaju fenoksil radikali, koji imaju manju reaktivnost (Huda-Faujan i sar., 2009). Fenolna jedinjenja neutrališu slobodne radikale u ćelijama, sprečavaju oksidativna oštećenja DNK lanaca, te pored antioksidativne imaju antikancerogenu i antitoksičnu ulogu. Osim toga, nakon hlorofila, fenolna jedinjenja antocijani su najrasprostranjeniji pigmenti u biljnom svijetu (Hakkinen, 2000). Hlorofil je ključna komponenta neophodna za proces fotosinteze, zbog svojstva apsorbovanja svjetlosti. Međutim, upravo zbog tog svojstva može biti i potencijalni ćelijski fototoksin. Apsorbovana energija se sa hlorofila može prenijeti na kiseonik, što za krajnji rezultat ima stvaranje ROS-a (Hörtensteiner, 2011).

Herbicidi su hemijska sredstva koja inhibiraju biohemijske procese neophodne

za rast i razvoj korovskih biljaka, bez negativnog uticaja na kulturu koja se želi uzgojiti (Horvat, 2019). Nakon primjene herbicida, korovska biljka ih apsorbira i prenosi kroz stablo, do mjesta djelovanja, čime inhibira sintezu aminokiselina, sintezu masnih kiselina, fotosintezu i slične procese. Krajnji ishod djelovanja herbicida jeste odumiranje korovske biljke (Topolovec, 2008). Uticaj herbicida pored anatomske-fizioloških razlika između uzgajane i korovske biljke, zavisi i od vremena njihove primjene, klimatskih uslova, primijenjene doze, kao i od procesa detoksifikacije molekula herbicida. Detoksifikacija se odvija tako što enzimi pretvaraju molekule herbicida u neaktivna jedinjenja koje biljka kasnije ugrađuje u ćelijsku membranu, akumulira u vakuoli ili izbacuje iz citoplazme (Topolovec, 2008).

Nikosulfuron pripada herbicidima iz grupe sulfoniluree. Ubrzo nakon njihovog otkrivanja počela su istraživanja njihovog djelovanja, te najefikasnijeg načina primjene. Utvrđeno je da herbicidi iz grupe sulfoniluree ne utiču direktno na rast biljaka, ali da posjeduju inhibitorna svojstva. Oštećuju fotosistem I i fotosistem II u fotosintetskom aparatu, čime smanjuju efikasnost fotosinteze (Wang i sar., 2018). Herbicidi iz grupe sulfoniluree imaju širok spektar djelovanja na različite vrste korova, pri niskim koncentracijama, uz dobru selektivnost usjeva i veoma nisku toksičnost po životinje. Nikosulfuron djeluje kao inhibitor acetolaktat sintaze (EC 4.1.3.18) blokirajući biosintezu razgranatih lanaca aminokiselina valina, leucina i izoleucina, što dovodi do smanjenja diobe ćelija i rasta (Brown, 1990).

Mjerenjem parametara kao što su koncentracija H_2O_2 , pigmentata, fenolnih jedinjenja, te promjena aktivnosti enzima kao što su POD i APX možemo utvrditi intenzitet stresnih uslova, i samim tim uticaj stresnog faktora na biljku. Na ovaj način moguće je odrediti uslove spoljašnje sredine u kojima određena vrsta raste, te uticaj različitih faktora (uključujući i tretiranje herbicidima) na njen razvoj.

MATERIJAL I METODE

Postavka eksperimenta

Za potrebe istraživanja izabrano je sjeme kukuruza Instituta za kukuruz „Zemun polje“ Beograd: hibridi ZP 555 i ZP 606. Oko 500 zrna je nakon klijanja posađeno u hidropone na česmenu vodu i uzgajani su sedam dana u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (temperatura $25^{\circ}C$, svjetlosni režim 12/12 svjetlo/mrak, uz konstantnu aeraciju vode). Nakon sedam dana, dio biljaka je tretiran različitim koncentracijama nikosulfurona ($150 \mu g/mL$ i $250 \mu g/mL$) u obliku tehničke supstance u trajanju od četiri dana, a po jedan hidropon je označen kao kontrolni i nije tretiran. Pri označavanju uzoraka slovo R korišteno je za uzorke korijena, a L za uzorke lista. Takođe, brojevi 150 i 250 su označavali odgovarajuće koncentracije, dok je slovo K označavalo kontrolne uzorke. Brojevi 5 i 6 odgovaraju jednom od dva hibrida, 5-ZP 555 ili 6-ZP 606.

Mjerenje svježe i suve mase kukuruza

Nakon tretmana herbicidom, uzeto je po šest uzoraka lista i korijena kukuruza iz svih hidropona, posušeni su ubrusom i izmjerena je njihova svježa masa. Nakon vaganja, uzorci su sušeni u sušioniku na 105°C, te je nakon 24h mjerena i suva masa uzetih listova i korijenova.

Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentracija ukupnih proteina u listu i korijenu kukuruza određena je metodom Lowry i saradnici (1951). Mjerena je apsorbancu na 550 nm. Koncentracija proteina računata je na osnovu jednačine pravca dobijene za standardne rastvore goveđeg serum albumina (BSA).

Određivanje koncentracije H₂O₂

Kontrolni i tretirani uzorci listova i korijena kukuruza sprašeni su u avanu tučkom uz pomoć tečnog azota. Zatim je odvagano ~1 g biljnog materijala za svaki uzorak i homogenizovan sa 7 mL 0,1% trihlorsirćetne kiseline (TCA). Homogenat je raspoređen u ependorfice i centrifugiran 20 minuta na 10 000 obrtaja na temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja, za potrebe određivanja koncentracije vodonik peroksida korišteno je 0,5 mL supernatanta, čemu je dodato 0,5 mL 10 mM natrijum fosfatnog pufera, čija pH vrijednost iznosi 6,8 i 1 mL 1M kalijum jodida. Mjerenje je vršeno spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 390 nm, uz upotrebu dvije slijepe probe. U sastavu jedne slijepe probe nalazio se 1 mL 10 mM natrijum fosfatnog pufera, čija je pH vrijednost jednaka 6,8 i 1 mL 1M kalijum jodida, dok je druga sadržala 1,5 mL 10 mM natrijum fosfatnog pufera iste pH vrijednosti i 0,5 mL supernatanta. Za svaki uzorak mjerenje je vršeno u duplikatu (Alexieva i sar., 2001). Koncentracija H₂O₂ je izračunata na osnovu standardne krive za H₂O₂, te izražena u μmol/g_{FW}.

Određivanje aktivnosti peroksidaza Klase III (APX)

Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima vršena je na listovima i korijenu kukuruza čija je svježa masa homogenizovana tečnim azotom u avanu, a zatim ekstrahovana puferom. Ekstrakcija je vršena tako što je u 0,5 g do praha usitnjenog biljnog tkiva sa tečnim azotom dodato 5 mL 0,1 M natrijum fosfatnog pufera, čija je pH vrijednost 6,4, 0,1 mM PMSF i 0,1% TWEEN. Uzorci su nakon toga centrifugirani 10 minuta na 10 000 obrtaja (Maehly i sar., 1954).

Reakciona smješa za mjerenje aktivnosti POD je sadržavala 30 μL supernatanta (ekstrakt proteina lista i korijena), 10 μL 1M pirogalola, 3 μL 1M vodonik peroksida i 1 mL pufera (0,1M natrijum fosfatni pufer pH 6,4). Spektrofotometrijski je izmjerena promjena apsorbance tokom jedne minute na 430 nm. Aktivnost peroksidaza je izražena u μmol/(mg*min).

$$\text{Aktivnost(POD)} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \right) = \frac{(A_{60s} - A_{0s}) \cdot R}{\epsilon \cdot c_p \cdot t}$$

R-razblaženje u kiveti

c_p - koncentracija proteina određena metodom po Lowry i saradnici (1951)

t- vrijeme za koje je mjerena promjena apsorbance

ϵ - ekstinkcioni koeficijent za purpuloalin je $12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaza (POD)

Za ekstrakcija APX je odvagano 1 g u tečnom azotu sprasšenog biljnog tkiva, a zatim dodato 4 mL ekstrakcionog pufera: 90 mM Na-Pi pufera pH 7,8 koji sadrži 1 mM PMSF, 8% glicerol, 1 mM EDTA i 5 mM askorbinsku kiselinu. Homogenat je centrifugiran na 10 000 obrtaja, 15 minuta na 8°C . Reakciona smjesa za mjerenje aktivnosti APX je sadržavala 0,5 mM askorbat, 0,1 mM H_2O_2 , 50 mM Na-Pi pufer (pH 7,0) i 50 μL prethodno pripremljenog ekstrakta. Smanjenje apsorbance na 290 nm je mjereno tokom 1 minute. Aktivnost askorbat peroksidaze je izražena u $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ (Miyake i sar., 1992).

Određivanje ukupne količine fenola

Za ekstrakciju fenolnih jedinjenja u listovima i korijenu kukuruza korišteno je 0,5 g svježe biljne mase koja je homogenizovana sa 4 mL metanola, te inkubirana 30 minuta. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10 000 obrtaja. Za određivanje sadržaja ukupnih fenola reakciona smjesa sadržavala je 100 μL supernatanta, 450 μL Folin- Čikalteovog reagensa (razblaženog u odnosu 1:3 sa destilovanom vodom) i 450 μL 1M natrijum karbonata. Nakon miješanja na Vorteksu, uzorci su inkubirani 60 minuta na tamnom mjestu. Apsorbanca je mjerena na 724 nm. Koncentracija fenola je izračunata na osnovu standardne krive za galnu kiselinu i izražena je u $\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{FW}}$ (Wolfe i sar., 2003).

Određivanje ukupnog hlorofila

Za određivanje ukupnog hlorofila korišteni su ekstrakti dobijeni na isti način kao i za određivanje ukupnih fenola. Korišteno je 500 μL metanolnog ekstrakta i 2500 μL metanola, koji su izmiješani na vorteksu, a nakon toga su izmjerene apsorbance na talasnim dužinama: hlorofil A (666 nm), hlorofil B (653 nm) i karotenoidi (470 nm). Koncentracija ukupnog hlorofila predstavlja zbir koncentracija hlorofila A i hlorofila B koji su izračunati po sljedećim formulama (Wettstein, 1957):

$$c(\text{hlorofil A}) = 15,65 \cdot A_{666} - 7,34 \cdot A_{653}$$

$$c(\text{hlorofil B}) = 27,05 \cdot A_{653} - 11,21 \cdot A_{666}$$

Koncentracija ukupnog hlorofila je izražena u $\text{mg}/\text{g}_{\text{FW}}$.

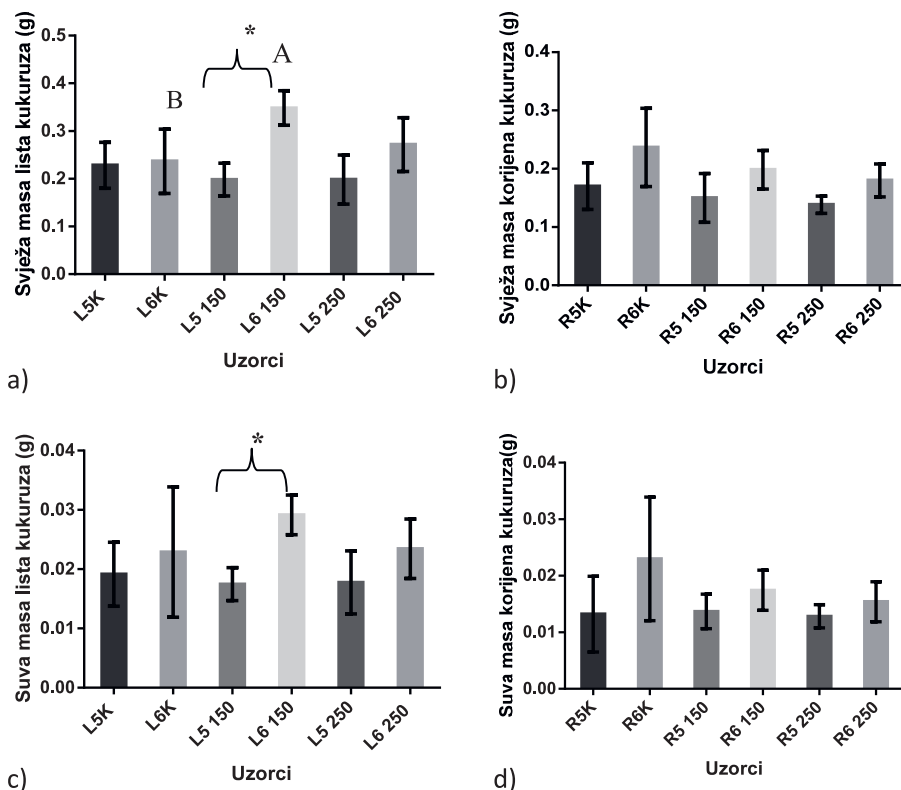
Statistička obrada podataka

Svi dobijeni rezultati su statistički obrađeni metodom analize varijanse (ANOVA), predstavljeni grafički korištenjem programa Graph Pad i Microsoft Office Excel. Određen je Pearsonov koeficijent korelacije i postojanje statistički značajnih ($p < 0,05$) razlika između rezultata.

REZULTATI I DISKUSIJA

Svježa i suva masa listova i korijena kukuruza

Srednje vrijednosti svježe i suve mase za uzorke listova i korijena biljaka kukuruza u kontrolnim i tretiranim uzorcima predstavljene su na Slici 1.



Slika 1. Srednje vrijednosti svježe i suve mase za list i korijen kukuruza \pm SD. Oznake: L-list, R-korijen, 5- hibrid ZP 555, 6- hibrid ZP 606, 150 i 250 odgovarajuće koncentracije nikosulfurona, K- kontrola. Oznake za statističke značajnosti ($p < 0,05$): A-uzorci se statistički značajno razlikuju sa L6K, B-uzorci se statistički značajno razlikuju sa L6 150. Zvezdicom se označava postojanje statistički značajne razlike između hibrida.

Poređenjem kontrolnog uzorka lista hibrida ZP 555 sa tretmanima, možemo uočiti da je nikosulfuron u koncentracijama 150 i 250 µg/mL doveo do smanjenja svježe mase lista za 13% u odnosu na kontrolni uzorak. Takođe, kod listova hibrida ZP 606 u poređenju sa kontrolnim uzorkom uočavamo porast svježe mase kod svih uzoraka tretiranih nikosulfurom. Statistički značajan ($p < 0,05$) porast svježe mase je izmjeren kod uzorka L6 150 za 47 %. S druge strane, svježa masa uzoraka korijena hibrida ZP 606 tretiranih nikosulfurom opada u poređenju sa kontrolnim uzorkom ovog hibrida. Kod uzoraka hibrida ZP 555, svježa masa korijena opada sa porastom koncentracije herbicida.

Ukoliko poredimo svježu masu uzoraka korijena kukuruza između hibrida, veća je kod hibrida ZP 606. Sa porastom koncentracije nikosulfurona, vrijednosti svježe mase uzoraka korijena pokazuju značajno smanjenje, kod R5 250 18% i R6 250 25%.

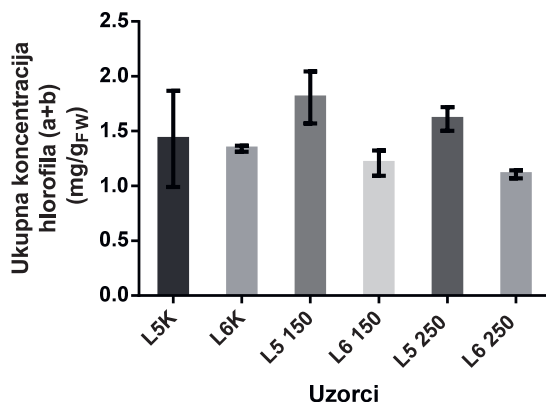
Uzorci L5 150 i L5 250 pokazuju da nikosulfuron indikuje smanjenje suve mase lista kukuruza za 8,8% i 7,2% respektivno. Izmjerena suva masa kod korijena kukuruza hibrida ZP 555 je veća u odnosu na kontrolni uzorak, izuzev suve mase uzorka R5 250, gdje je izmjereno smanjenje za oko 12%. Sumiranjem dobijamo da je samo tretman nikosulfurom koncentracije 250 µg/mL doveo do smanjenja svježe i suve mase korijena kod oba hibrida u poređenju s kontrolnim uzorkom.

Herbicidi iz grupe sulfonilurea, kao što je nikosulfuron, ne utiču direktno na zastavljanje rasta biljke, već na ALS enzim dovodeći do inhibicije ćelijske diobe pri čemu tako utiču i na rast (Ray, 1985). Obzirom da fotosinteza određuje rast biljke, inhibira neke od faza fotosinteze, kao što su Calvinov ciklus ili aktivnost Rubisca, djelovanjem nikosulfurona mogu dovesti do smanjenog rasta biljke (Ahammed i sar., 2013).

Sadržaj fotosintetičkih pigmenata

Koncentracija hlorofila u listovima ukazuje na efikasnost fotosinteze. Naročito je važna uloga hlorofila a, jer njegovi oblici P₇₀₀ i P₆₈₀ predstavljaju aktivne centre u fotosistemu I i II. Promjena sadržaja hlorofila, naročito smanjenje njegove koncentracije nakon tretmana sa herbicidima siguran je znak abiotičkog stresa (Kravić i sar., 2006).

Na Slici 2. su predstavljene srednje vrijednosti ukupne koncentracije hlorofila za kontrolne i tretirane uzorke listova kukuruza. Ukupna koncentracija hlorofila kod hibrida ZP 606 u uzorcima koji su tretirani nikosulfurom smanjivala se sa povećanjem koncentracije nikosulfurona, ali smanjenje nije statistički značajno ($p < 0,05$). Kod hibrida ZP 555 je izmjereno povećanje koncentracije hlorofila kod svih uzoraka.

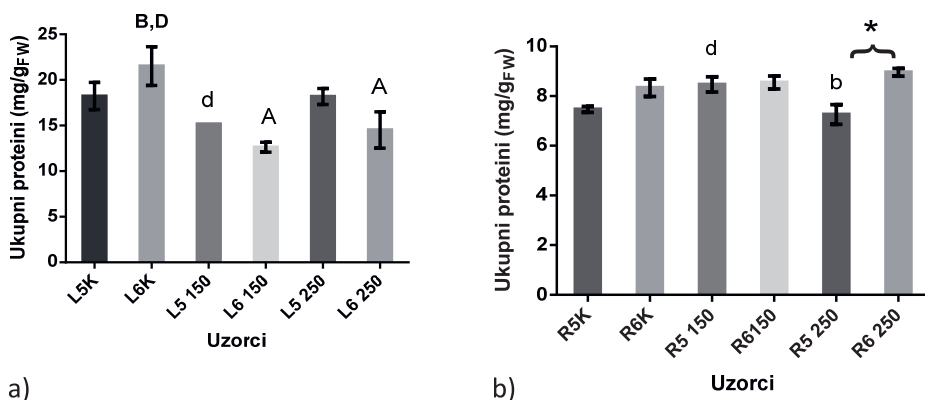


Slika 2. Srednje vrijednosti ukupne koncentracije hlorofila kod listova dva hibrida kukuruza \pm SD. Oznake: L-list, 5- hibrid ZP 555, 6- hibrid ZP 606, 150 i 250 odgovarajuće koncentracije nikosulfurona, K- kontrola.

Wang i saradnici (2018) su pokazali da kod kukuruza koji je osjetljiv na nikosulfuron dolazi do smanjenja sadržaja ukupnog hlorofila. Naše istraživanje je pokazalo da je kod hibrida ZP 606 i uzoraka koji su tretirani nikosulfuronom izmjereno smanjenje ukupne koncentracije hlorofila. Kod hibrida ZP 555 je izmjereno povećanje ukupne koncentracije hlorofila.

Koncentracija ukupnih solubilnih proteina

Ukupna koncentracija proteina može biti važan indikator reverzibilnih i ireverzibilnih promjena koje se dešavaju u biljkama (Doganlar, 2012).



Slika 3. Koncentracija ukupnih proteina izmjerena u listu (a) i korijenu (b) hibrida kukuruza ZP 555 i ZP 606 u kontrolnim uzorcima i uzorcima izloženim različitim koncentracijama (150 i 250 μ g/mL) nikosulfurona. Predstavljene su srednje

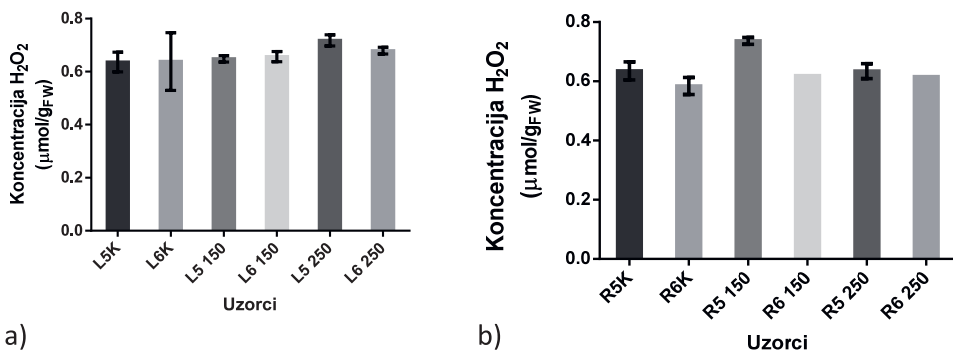
vrijednosti \pm SD. Oznake za statističke značajnosti ($p < 0,05$): b-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L5 150 i R5 150, d-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L5 250 i R5 250, A- postojanje značajne razlike pri poređenju sa kontrolnim uzorkom, B-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L6 150 i R6 150, D-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L5 250 i R5 250. Zvezdicom su označene statistički značajne ($p < 0,05$) razlike između hibrida.

Uzorci L6 150 i L6 250 pokazuju statistički značajne ($p < 0,05$) razlike u sadržaju proteina u odnosu na kontrolni uzorak hibrida ZP 606. U poređenju sa kontrolnim uzorkom izmjereno je smanjenje koncentracije proteina u uzorku L6 150 za 41%, a kod uzorka L6 250 za 33%. Analizom rezultata uzoraka korijena, primjećeno je da nije došlo do značajne promjene koncentracije proteina kod oba hibrida, u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Izuzev uzorka R5 150, svi uzorci hibrida ZP 555 pokazuju smanjenje koncentracije proteina u odnosu na kontrolni uzorak. S druge strane, uzorci korijena hibrida ZP 606 pokazuju povećanje koncentracije ukupnih proteina u odnosu na kontrolni uzorak.

Najveća koncentracija proteina u korijenu je izmjerena kod uzorka R6 250. Niža koncentracija nikosulfurona dovela je do porasta koncentracije proteina kod oba hibrida. Porast koncentracije proteina pri niskim koncentracijama herbicida može biti posljedica povećane sinteze proteina indukovanih stresom, odnosno enzima koji su uključeni u antioksidativne mehanizme (Liu i sar., 2019). S druge strane, enzimi koji su uključeni u metabolizam, proteaze, nitrat reduktaze ili neki drugi katabolički enzimi, mogu se aktivirati i dovesti do degradacije proteina, odnosno do smanjenja koncentracije ukupnih proteina (Mishra i sar., 2007).

Koncentracija H_2O_2

Abiotički stres za posljedicu često ima akumulaciju vodonik peroksida u biljkama (Liu i sar., 2019). Na Slici 4. predstavljene su srednje vrijednosti koncentracija vodonik peroksida u listovima i korijenu dva hibrida kukuruza. Analizom rezultata dobijenih kod oba hibrida za list i korijen uočena je tendencija porasta koncentracije H_2O_2 kod većine uzoraka, u odnosu na kontrolne. Izuzetak je uzorak korijena R5 250, kod kojeg je vrijednost koncentracije vodonik peroksida neznatno manja u odnosu na kontrolu. Najveće promjene u koncentraciji H_2O_2 kod korijena, u odnosu na kontrolne uzorke, uočene su u slučaju uzorka R5 150, gdje je koncentracija vodonik peroksida porasla za ~16%.



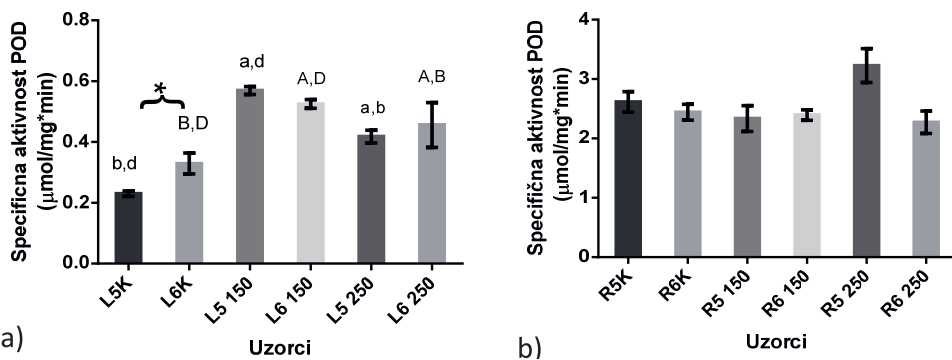
Slika 4. Srednje vrijednosti koncentracije H₂O₂ izmjerena kod lista (a) i korijena (b) kukuruza ±SD. Oznake: L-list, R-korijen, 5- hibrid ZP 555, 6- hibrid ZP 606, 150 i 250 odgovarajuće koncentracije nikosulfurona, K- kontrola.

Wang i saradnici (2018) su dokazali da kod mladih biljaka kukuruza nakon tretmana sa nikosulfuronom dolazi do povećanja koncentracije H₂O₂ kod osjetljivih linija kukuruza čak i do 65% u odnosu na kontrolni uzorak. U našem istraživanju, kod uzorka L5 250 izmjereno je najveće povećanje koncentracije H₂O₂ (13% u odnosu na kontrolni uzorak).

Takođe, istraživanje Lukatkina i saradnika (2012), vršeno na žitaricama, pokazalo je da do najvećeg porasta koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta, pa i vodonik peroksida dolazi pri najvećim koncentracijama herbicida.

Specifična aktivnost POD

Specifična aktivnost POD kod listova hibrida ZP 555 i ZP 606 veća je kod tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolni uzorak (Slika 5-a). Takođe, zabilježeno je i smanjenje specifične aktivnosti POD sa porastom koncentracije nikosulfurona. Analizom specifične aktivnosti POD kod korijena hibrida ZP555, uočeno je da vrijednost raste kod uzorka R5 250, za razliku od R5 150, čija je vrijednost nešto manja od kontrolnog uzorka. Nešto drugačiji trend promjene specifične aktivnosti POD primjećen je kod uzorka korijena hibrida ZP 606, gdje se specifična aktivnost POD smanjuje pri svim tretmanima (Slika 5-b).



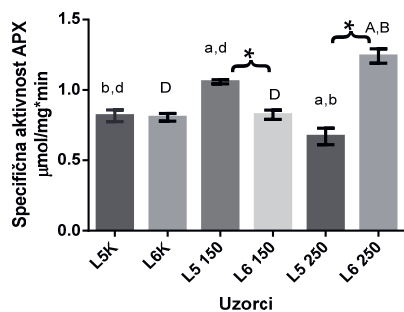
Slika 5. Srednja vrijednost specifične aktivnosti POD izmjerene u listu (a) i korijenu (b) dva hibrida kukuruza \pm SD. Oznake L-list, R-korijen, 5- hibrid ZP 555, 6- hibrid ZP 606, 150 i 250 odgovarajuće koncentracije nikosulfurona, K- kontrola. Oznake za statističke značajnosti ($p < 0,05$): a- uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L5K, b-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L5 150, d-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L5 250, A- postojanje značajne razlike pri poređenju sa kontrolnim uzorkom L6K, B-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L6 150, D-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L5 250.

Veliki broj istraživanja pokazao je da antioksidativni enzimi kod različitih biljnih vrsta mogu različito da reaguju na prisustvo herbicida. Razlike potiču od biljne vrste, koncentracije i vremena izloženosti herbicidu (Wang i sar., 2018). Wang i saradnici (2018) su vršili istraživanje na rezistentnom i osjetljivom hibridu kukuruza tretiranom nikosulfuronom. Kod rezistentnog hibrida, tretman je doveo do porasta aktivnosti POD, s tim što je aktivnost rasla s vremenom izloženosti herbicidu. Međutim, s vremenom izloženosti nikosulfuronu, došlo je do smanjenja aktivnosti POD kod osjetljivog hibrida. Opadanje aktivnosti POD, zabilježeno kod osjetljivog hibrida, može biti rezultat mehanizma odbrane ćelija. Porast specifične aktivnosti POD kod lista oba hibrida kukuruza, u našem istraživanju, može ukazati na rezistentnost ovih hibrida.

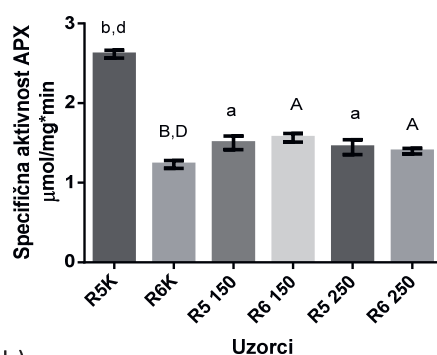
Djelovanje nikosulfurona (0,8 L/ha i 1,25 L/ha), ispitivano je na tri samooplodne linije kukuruza (Kravić i sar., 2006). Autori su pokazali da je manja koncentracija nikosulfurona dovela do neznatne promjene u aktivnosti POD, dok je veća koncentracija dovela do porasta aktivnosti POD kod sve tri linije kukuruza.

Specifična aktivnost APX

Analizom specifičnih aktivnosti APX za uzorke lista uočen je različit odgovor biljaka na tretman nikosulfuronom koncentracije 250 µg/mL (Slika 6). Uzorak L5 250 pokazuje smanjenje od oko 17% u odnosu na kontrolni uzorak, dok kod L6 250 imamo povećanje od 35%. Tretman nižom koncentracijom nikosulfurona doveo je do smanjenja specifične aktivnosti APX kod oba hibrida.



a)



b)

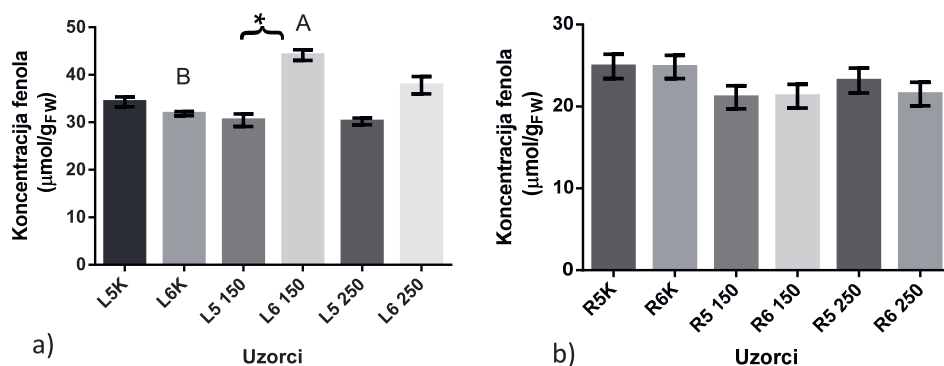
Slika 6. Srednja vrijednost specifične aktivnosti APX u listu(a) i korijenu (b) kukuruza \pm SD. Oznake L-list, R-korijen, 5- hibrid ZP 555, 6- hibrid ZP 606, 150 i 250 odgovarajuće koncentracije nikosulfurona, K- kontrola. Oznake za statističke značajnosti ($p < 0,05$): a- uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L5K ili R5K, b-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L5 150 ili R5 150, d-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L5 250 ili R5 250, A- postojanje značajne razlike pri poređenju sa kontrolnim uzorkom L6K ili R6K, B-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L6 150 ili R6 150, D-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L5 250 ili R6 250. Zvezdicom su označene razlike između hibrida.

Tretman nikosulfuronom je doveo do smanjenja specifične aktivnosti APX kod korijena kukuruza hibrida ZP 555 za oko 42%. Specifična aktivnost APX je povećana kod tretiranih uzoraka hibrida ZP 555, a smanjenje kod uzoraka hibrida ZP 606.

Promjene u aktivnosti APX ukazuju na značaj ovog enzima pri odbrani biljke od oksidativnog stresa (Yabuta i sar., 2004).

Ukupna koncentracija fenola

Izmjerene koncentracije fenola u listovima i korijenu dva hibrida kukuruza prikazane su na Slici 7. Sinteza fenolnih komponenti kod biljaka može biti indukovana dejstvom herbicida (Huseynova i sar., 2017).



Slika 7. Srednja vrijednost koncentracije fenola izmjerena u listu (a) i korijenu (b) dva hibrida kukuruza \pm SD. Oznake: L-list, R-korijen, 5- hibrid ZP 555, 6- hibrid ZP 606, 150 i 250 odgovarajuće koncentracije nikosulfurona, K- kontrola. Oznake za statističke značajnosti ($p < 0,05$): A- postojanje značajne razlike pri poređenju sa kontrolnim uzorkom L6K, B-uzorci se značajno razlikuju u poređenju sa L6 150. Zvezdicom su označene značajne razlike između hibrida.

Analizom rezultata za listove uočeno je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje koncentracije fenola kod uzorka L6 150 u odnosu na kontrolni uzorak. Kod hibrida ZP 555, koncentracija fenola u listovima tretiranih uzoraka se smanjivala u odnosu na kontrolni uzorak. Obrnuto, koncentracija fenola u listovima hibrida ZP 606 tretiranog nikosulfuronom je bila veća kod svih uzoraka, u odnosu na kontrolne.

Koncentracija fenola u korijenu kukuruza kod oba hibrida smanjila se u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim uzorcima. Kod hibrida ZP 606, uzorak tretiran nikosulfuronom koncentracije 150 µg/mL imao je koncentraciju fenola za 15% manju od kontrolnog uzorka, što je i najveća promjena zabilježena kod ovog hibrida.

Upotreba različitih herbicida dovodi i do različitih efekata na sintezu fenolnih jedinjenja. Herbicidi kao što su atrazin, butidazol ili metribuzin dovode do smanjenja sadržaja fenolnih jedinjenja u biljkama, dok suprotan efekat nalazimo kod aci-fluorfena, hlormetoksifena ili herbicida iz grupe urea, hlorsulfurona (Huseynova i sar., 2017). Takođe, isti herbicid može imati različito djelovanje ukoliko se tretman vrši na različitim biljkama (Daniel i sar., 1999).

ZAKLJUČAK

Koncentracija vodonik peroksida, iako nije statistički značajna, porasla je kod većine uzoraka lista i korijena oba hibrida tretiranih nikosulfuronom u odnosu na kontrolni uzorak, što ukazuje na pojavu oksidativnog stresa kod biljaka.

Statistički značajne razlike između hibrida ZP 555 i ZP 606 tretiranih nikosulfuronom zabilježene su kod sledećih parametara:

- svježa i suva masa uzoraka lista (L5 150, L6 150),
- koncentracija ukupnih proteina u korijenu kukuruza (R5 250, R6 250),
- specifična aktivnost POD kod kontrolnih uzoraka lista,
- specifična aktivnost APX u listu kukuruza tretiranom sa obe koncentracije nikosulfurona,
- koncentracija fenola u uzorcima lista (L5150, L6150),

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na pojavu specifičnih razlika između hibrida pri odgovoru na tretman nikosulfuronom.

LITERATURA

- Ahammed, G. J., Choudhary, S. P., Chen, S., Xia, X., Shi, K., Zhou, Y., Yu, J. (2013): Role of brassinosteroids in alleviation of phenanthrenecadmium co-contamination-induced photosynthetic inhibition and oxidative stress in tomato. *J. Exp. Bot.* 64: 199–213.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E. (2001): The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Pl. Cell Environm.* 24(12): 1337-1344.
- Asada, K., Takahashi, M. (1987): Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. Pp. 227–287. In: *Photoinhibition.* (eds. Kyle, D. J., Osmond, C. B., Arntzen, C. J.). Elsevier, Amsterdam.
- Brown, H. M. (1990): Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonyleurea herbicides. *Pestic. Sci.* 29(3): 263-281.
- Daniel, O., Meier, M. S., Schlatter, J., Frischknecht, P. (1999): Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environm. Health Perspect.* 107(Suppl 1): 109-114.
- Doganlar, Z. B. (2012): Quizalofop-p-ethyl-induced phytotoxicity and genotoxicity in *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *J. Environm. Sci. and Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 47 (11): 1631–1643.
- Häkkinen, S. H., Törrönen, A. R. (2000): Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res. Int.* 33(6): 517-524.

- Hörtensteiner, S., Kräutler, B. (2011): Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerget.* 1807(8): 977-988.
- Horvat, A. (2019): Utvrđivanje prisutnosti pesticida u odabranom citrusnom voću. Specijalistički rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb.
- Huda-Faujan, N., Norriham, A., Norrakiah, A. S., Babji, A. S. (2009): Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *African J. Biotechnol.* 8(3): 484-489.
- Huseynova, I., Balakishiyeva, G., Aliyeva, D., Gurbanova, U., Bayramova, J., Mustafayev, N., Aliyev, J. (2017): Changes in the activities of metabolic enzymes and antioxidant defense system in 'Candidatus phytoplasma solani' infected pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Net J. Agric. Sci.* 5(2): 58-65.
- Kravić, N., Dragičević, V., Stefanović, L. (2006): Ispitivanje delovanja Nikosulfurona na neke samooplodne linije kukuruza. *Acta herbologica* 15(1): 1-8.
- Liu, S., He, Y., Tian, H., Yu, C., Tan, W., Li, Z., Duan, L. (2019): Application of Brassinosteroid Mimetics Improves Growth and Tolerance of Maize to Nicosulfuron Toxicity. *J. Pl. Growth Regulat.* 38(2): 701-712.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lukatkin, A. S., Gar'kova, A. N., Bochkharjova, A. S., Nushtaeva, O. V., da Silva, J. A. T. (2013): Treatment with the herbicide TOPIK induces oxidative stress in cereal leaves. *Pestic. Biochem. Physiol.* 105(1): 44-49.
- Maehly, A. C., Chance, B. (1954): The assay of catalyses and peroxydases. *Methods Biochem. Anal.* 1: 357-424.
- Mishra, K. K., Rai, U. N., Prakash, O. (2007): Bioconcentration and phytotoxicity of Cd in *Eichhornia crassipes*. *Environm. Monit. Assessm.* 130: 237-243.
- Miyake, C., Asada, K. (1992): Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Pl. Cell Physiol.* 33(5): 541-553.
- Poljšak, B., Jamnik, P. (2010): Methodology for oxidative state detection in biological systems. Pp. 421-448 In: *Handbook of free radicals: formation, types and effects.* (eds. Kozyrev, D., Slutsky, V.). Nova Science Publishers, Inc.
- Radovanović, D. S., Ranković, G. Ž. (2004): Oxidative stress, stress proteins and antioxidants in exercise. *Acta Medica Medianae* 43(4): 45-47.
- Ray, T. B. (1985): The site of action of the sulfonylurea herbicides. *Proc. 1985 Br. Crop Prot. Conf-Weeds* 131-138.
- Tarchoune, I., Sgherri, C., Izzo, R., Lachaal, M., Ouerghi, Z., Navari-Izzo, F. (2010): Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization. *Plant Physiol. Biochem.* 48(9): 772-777.
- Topolovec, D. (2008). *Herbicidi i mehanizam djelovanja III.* Glasnik Zaštite Bilja 31(5): 98-101.

- Yabuta, Y., Maruta, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T., Shigeoka, S. (2004): Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Pl. Cell Physiol.* 45(11): 1586-1594.
- Veljović-Jovanović, S., Vidović, M., Morina, F. (2017): Ascorbate as a key player in plant abiotic stress response and tolerance. Pp. 47-109. In *Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance* (eds. Hossain, M. A., Munne-Bosch, S., Burritt, D. J., Diaz-Vivancos, P., Fujita, M., Lorence, A.) Springer, Cham.
- Wang, J., Zhong, X., Li, F., Shi, Z. (2018): Effects of nicosulfuron on growth, oxidative damage, and the ascorbate-glutathione pathway in paired nearly isogenic lines of waxy maize (*Zea mays* L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 145: 108-117.
- Wettstein, D. V. (1957): Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Exp. Cell Res.* 12(3): 427-506.
- Wolfe K., Wu X., Liu R. H., (2003): Antioxidant Activity of Apple Peels. *J. Agric. Food Chem.* 51 (3): 609-614.

Abstract

IMPACT OF NICOSULFURON ON BIOCHEMICAL MARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN MAIZE LEAVES AND ROOTS

Andela Kuvelja¹, Biljana Davidović-Plavšić¹, Danijela Lukić¹,
Nemanja Gajić¹, Mirjana Žabić², Siniša Škondrić¹, Biljana Kukavica^{1*}

¹University of Banja Luka, Faculty of Natural *Sciences* and Mathematics,
Dr Mladena Stojanovića 2, Banja Luka

²University of Banja Luka, Faculty of Agriculture, Bulevar vojvode Petra
Bojovića 1A, Banja Luka

E-mail: biljana.kukavica@pmf.unibl.org

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most important crops. It is the object of many studies, aiming to utilize its full genetic potential and quality, while protecting it from the harmful external factors. Considering that weeds in the early stage of maize development can severely affect the yield, effective weed control is of great importance. As the most significant herbicides in fighting maize weeds, sulfonylurea herbicides are singled out. The aim of this research was to test the impact of different concentrations of nicosulfuron (150 and 250 µg/mL) on the biochemical (oxidative and anti-oxidative) parameters of two maize hybrids (ZP 555 and ZP 606). After treating maize plants with different concentrations of nicosulfuron for five days, concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂), phenolic compounds and total chlorophyll were measured, as well as the activity of enzymes Peroxidase Class III (POD) and ascorbate peroxidase (APX). The results showed that nicosulfuron significantly impacted the biochemical parameters in the root and leaves of maize. Differences in impact of nicosulfuron at different concentrations and differences in the tolerance of two hybrids to treatment were also observed.

Key words: nicosulfuron; maize hybrids; oxidative stress; antioxidative metabolism; biochemical parameters.