Wstępna ocena fizjologicznej aktywności pochodnych kwasu 9-aminofluoreno-fosfonowego-9

W. CZERWIŃSKI¹, R. GANCARZ², E. PRZYBYŁKA¹, J. S. WIECZOREK²

¹Instytut Biologii Roślin i Biofizyki Akademii Rolniczej

²Instytut Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki

W. Czerwiński¹, R. Gancarz², E. Przybyłka¹, J. S. Wieczorek², (¹*Institute of Plant Biology and Biophysics, Agricultural Academy, Cybulskiego 32, 50-375 Wrocław, Poland;* ²*Institute of Organic and Physical Chemistry, Politechnical University, Łukasiewicza 2, 50-371 Wrocław, Poland*) *Acta Agrobotanica* 34 (2): 253-260, 1982.

Preliminary estimation of physiological activity of 9-amine-9-fluorenephosphonic acid derivatives

Abstract

The physiological activity of twenty one 9-amine-9-fluorenephosphonic acid derivatives was tested. The compounds were synthesized by the Wrocław Technical University. *Spirodela oligorrhiza* was used as the test plant. There was tested the inhibiting influence of these compounds on the growth of *Spirodela* and synergism with the herbicide "mecoprop". Ethyl esters substituted at the nitrogen atom with buthyl and heptyl group appeared to be most active. Their concentration of $0.5-1.5 \times 10^{-5}$ M inhibited the growth of *Spirodela* by 50%. Most of the 9-amine-9-fluorenephosphonic acid derivatives tested with different substitutes showed a strong synergism with the herbicide "mecoprop". An addition of these compounds to sublethal solution of the herbicide killed *Spirodela* within 10-20 hours.

WSTĘP

Pochodne fluorenu, których typowymi przykładami są morfaktyny, wywierają silny wpływ na morfogenezę roślin (Bopp i in., 1972; Gräser, 1978; Pieniążek i Saniewski, 1967; 1969; Schneider, 1970). Z rolniczego punktu widzenia interesującą cechą morfaktyn jest ich synergiczne współdziałanie z herbicydami. Dodatek tych związków do herbicydów takich jak 2,4-D, MCPA, dicamba zwiększa ich aktywność, co pozwala w praktyce rolniczej na zmniejszenie dawki herbicydu (Mohr, 1969; Schneider, 1964; Ostrowski, 1977). Może to mieć duże znaczenie w dobie nadmiernej chemizacji rolnictwa.

Aktywność fizjologiczna morfaktyn zależy między innymi od rodzaju podstawników w pozycji 9 fluorenu (Mohr, 1969). Dotychczas opisane morfaktyny mają w pozycji 9 przyłączoną grupę karboksylową oraz hydroksylową. Znane są również analogi morfaktyn mające grupę fosfonową w miejscu karboksylowej (Smith i Burger, 1953; Timmler i Kurz, 1971, 1973), względnie grupę aminową w miejscu hydroksylowej. Natomiast nie były dotychczas badane pochodne fluorenu z podstawioną w pozycji 9 grupą zarówno aminową, jak i fosfonową, czyli pochodne kwasu 9-aminofluorenofosfonowego-9 o wzorze:

Związki te nie są toksyczne dla roślin, lecz hamują ich wzrost, co ocenić można pomiarami suchej masy; po dodaniu do herbicydu zwiększają jego toksyczność, co wygodniej jest oceniać przy pomocy skali bonitacyjnej, opartej na zewnętrznych objawach ginięcia roślin.

Celem badań było wstępne określenie aktywności fizjologicznej 21 pochodnych kwasu 9-aminofluorenofosfonowego-9. Przebadano wpływ tych związków na wzrost roślin oraz współdziałanie z wybranym herbicydem typu regulatoru wzrostu.

MATERIAŁ I METODY

Pochodne kwasu 9-aminofluorenofosfonowego-9, opatrzone umownymi liczbami, zestawiono w wykazie. Związki te zsyntetyzowano w Instytucie Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej (Wieczorek i Gancarz, 1976; Gancarz, 1978; Gancarz i Wieczorek, 1976, 1977). Rośliną testową była *Spirodela*, często używana do takich badań (Hillman, 1961; Czerwiński i in., 1969; Skrabka, 1977; Knypl i in., 1976).

WYKAZ BADANYCH ZWIĄZKÓW LIST OF TESTED COMPOUNDS

1. Kwas fluorenofosfonowy-9
9-fluorenephosphonic acid
2. Kwas 9-N-n-heptyloaminofluorenofosfonowy-9
9-N-n-heptylamine-9-fluorenephosphonic acid
3. Kwas 9-N-feniloaminofluorenofosfonowy-9
9-N-phenylamine-9-fluorenephosphonic acid
4. Chlorowodorek kwasu 9-N-n-butyloaminofluorenofosfonowego-9
9-N-n-butylamine-9-fluorenephosphonic acid hydrochloride

5. Chlorowodorek estru dwuetylowego kwasu 9-aminofluoreno-fosfonowego-9
9-amine-9-fluorenephosphonic acid diethyl ester hydrochloride
6. Chlorowodorek estru dwuetylowego kwasu 9-N-n-butyloamino-fluorenofosfonowego-9
9-N-n-butylamine-9-fluorenephosphonic acid diethyl ester hydrochloride
7. Kwas 9-aminofluorenofosfonowy-9
9-amine-9-fluorenephosphonic acid
9. Chlorowodorek estru dwuetylowego kwasu 9-N-feniloaminofluorenofosfonowego-9
9-N-phenylamine-9-fluorenephosphonic acid diethyl ester hydrochloride
10. Chlorowodorek estru dwuetylowego kwasu 9-N-n-heptyloamino-fluorenofosfonowego-9
9-N-n-heptylamine-9-fluorenephosphonic acid diethyl ester hydrochloride
11. Ester dwuetylowy kwasu 9-N-phenylamine-2-bromofluorenofosfonowego-9
9-N-phenylamine-2-bromo-9-fluorenephosphonic acid diethyl ester
12. Chlorowodorek estru dwuetylowego kwasu 9-N-feniloamino-(2,7-dwuchloro)-fluorenofosfonowego-9
9-N-phenylamine-9-(2,7-dichloro)-fluorenephosphonic acid diethyl ester hydrochloride
13. Chlorowodorek estru dwuetylowego kwasu 9-N-feniloamino-(2,7-dwubromo)-fluorenofosfonowego-9
9-N-phenylamine-9-(2,7-dibromo)-fluorenephosphonic acid diethyl ester hydrochloride
14. Chlorowodorek estru dwuetylowego kwasu 9-N-sec-butyloaminofluorenofosfonowego-9
9-N-sec-butylamine-9-fluorenephosphonic acid diethyl ester hydrochloride
15. Chlorowodorek estru monoetylowego kwasu 9-N-sec-butyloaminofluorenofosfonowego-9
9-N-sec-butylamine-9-fluorenephosphonic acid monoethyl ester hydrochloride
16. Chlorowodorek kwasu 9-N-sec-butyloaminofluorenofosfonowego-9
9-N-sec-butylamine-9-fluorenephosphonic acid hydrochloride
17. Ester dwuetylowy kwasu 9-hydroksyfluorenofosfonowego-9
9-hydroxy-9-fluorenephosphonic acid diethyl ester
18. Fosforan 9-hydroksyfluorenodwuetylowy
9-hydroxy, diethyl phosphate
19. Ester dwuetylowy kwasu 9-N-fenylkarbamioaminofluorenofosfonowego-9
9-phenylcarbamidoamino-9-fluorenephosphonic acid diethyl ester
20. Ester dwubutyłowy kwasu 9-N-feniloaminofluorenofosfonowego-9
9-N-phenylamine-9-fluorenephosphonic acid dibutyl ester
21. Ester dwumetyłowy kwasu 9-N-feniloaminofluorenofosfonowego-9
9-N-phenylamine-9-fluorenephosphonic acid dimethyl ester
22. Chlorowodorek estru dwuetylowego kwasu N-karboetoksyaminofluorenofosfonowego-9
N-carbethoxyamine-9-fluorenephosphonic acid diethyl ester hydrochloride

Pomiary hamowania wzrostu roślin

Spirodela oligorrhiza (Kurz.) Hegelm., wyizolowana z kolekcji Wrocławskiego Ogrodu Botanicznego w roku 1964, rosła w aseptycznych po-

żywkach w ustalonych i niezmiennających się warunkach zewnętrznych. Stosowano zmodyfikowaną pożywkę Hoaglanda (na 1 litr wody dest.: $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0,25 g, KCl — 0,447 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,493 g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 1,653 g, NaFeEDTA — 10 mg, roztwór mikroelementów wg Gorhama — 1 ml). Pożywkę buforowano (pH 6,2) przez dodatek 100 mg^{-1} stałego CaCO_3 i sterylizowano w autoklawie przez 10 min. w temperaturze 120°C . Doświadczenia prowadzono w 100 ml kolbach Erlenmayera zawierających po 50 ml pożywki. Po sterylizacji dodawano do kolb odpowiednie dawki badanych substancji w postaci roztworów sporządzonych na sterylnej wodzie destylowanej (lub alkoholu etylowym w przypadku związków trudno rozpuszczalnych w wodzie). Dla wszystkich przebadanych związków zastosowano następujący szereg stężeń: 4×10^{-5} M, 8×10^{-5} M, 16×10^{-5} M, 32×10^{-5} M, 64×10^{-5} M. Doświadczenia powtarzano dwukrotnie w trzech kolbach. Każdą kolbę szczepiono dwiema trójczłonowymi roślinami z aseptycznej kultury podstawowej rosnącej na pożywce z dodatkiem sacharozy (10 g l^{-1}) i L-asparaginy (200 mg l^{-1}). Kultury rosły w temperaturze 26°C przy stałym oświetleniu lampami fluorescencyjnymi „Flora” (ok. 5000 luksów na poziomie roślin). Po upływie 8 dni rośliny odsączano, płukano, oznaczano ich suchą masę i wyliczano stopień zahamowania wzrostu w procentach względem roślin kontrolnych, tj. rosnących bez dodatku badanych substancji. Na tej podstawie sporządzano wykresy zahamowania wzrostu, z których drogą interpolacji wyliczano stężenie badanego związku wywołujące zahamowanie wzrostu w 50%.

Pomiary współdziałania badanych związków z herbicydem

We wstępnych doświadczeniach z różnymi herbicydami wybrano herbicyd U-46 KV Pulver, zawierający 75% mekopropu.

Synergizm tego herbicydu z badanymi związkami określano również przy pomocy spiroideli. W 100 ml zlewkach zawierających po 50 ml roztworów badanych substancji, sporządzonych na wodzie destylowanej, umieszczano po 6 trójczłonowych roślin (tj. 18 członów), pochodzących z aseptycznej kultury podstawowej. Mekoprop stosowano zawsze w stężeniu 10×10^{-5} M. Herbicyd w tym stężeniu nie wywoływał u roślin w danych warunkach żadnych widocznych zmian, można więc to stężenie uznać za subletalne. Badane pochodne fluorenu dodawano w następujących stężeniach: 0 (kontrola), 2×10^{-5} M, 4×10^{-5} M i 8×10^{-5} M. Jeden szereg zlewek zawierał tylko te związki, drugi natomiast zawierał dodatkowo herbicyd w podanym stężeniu. Doświadczenia powtarzano dwukrotnie w trzech zlewkach. Zlewki z roślinami umieszczano w takich samych warunkach jak poprzednio. Po upływie 24 godzin obserwowano

zmiany w wyglądzie roślin, powstałe w wyniku działania badanych substancji. Jako miarę aktywności przyjęto stopień uszkodzenia członów wyrażony w 5 stopniowej skali bonitacyjnej:

- 0 — brak uszkodzeń
- 1 — epinastia członów albo rozpad rośliny na pojedyncze człony
- 2 — odbarwienie brzegów członu
- 3 — odbarwienie 1/4 — 1/2 członu
- 4 — człony białe z bladzielonym nalotem w centrum
- 5 — człony całkowicie białe

Stopień uszkodzenia oznaczano dla każdego członu z osobna i wyliczano średnią.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ I DYSKUSJA

Badane związki są zróżnicowane pod względem swej aktywności fizjologicznej (tab. 2). Najsilniejsze działanie fitotoksyczne w stosunku do spirodeli przejawiały estry etylowe podstawione przy atomie azotu grupy aminowej grupą butylową i heptylową (nr 10, 14, 6). Związki te już w niskich stężeniach (2-6 ppm) hamowały wzrost suchej masy o 50% i były wyraźnie aktywniejsze od znanego już wcześniej kwasu fluorenofosfonowego-9 (Smith i Burger, 1953) oznaczonego nr 1. Wprowadzenie grupy aminowej zwiększa zatem aktywność w tych warunkach. Związki nr 15, 22, 3, 18 i 2 były mniej aktywne; dawka zmniejszająca suchą masę o 50% wynosiła 40-90 ppm. Jeszcze mniej aktywne były związki nr 12 i 13, podstawione przy pierścieniu aromatycznym chlorem lub bromem (ok. 200 ppm). Pozostałe związki również hamowały wzrost spirodeli, ale w stopniu mniejszym niż 50% (w stężeniu 64×10^{-5} M). Dlatego brak danych w tabeli 1 dla związków nr 4, 5, 7, 9, 11, 16, 17, 19 i 20 nie oznacza całkowitego braku ich aktywności.

Różnice w aktywności badanych związków mogą mieć różne przyczyny; związki te różniły się między innymi niektórymi cechami fizykochemicznymi takimi jak rozpuszczalność w wodzie i trwałość w roztworze. W szczególności mniejsza aktywność kwasów w porównaniu z estrami może być spowodowana ich słabszą rozpuszczalnością w wodzie. Są to zagadnienia wymagające dalszych badań.

Aktywność opisywanych związków przebadano również na innych roślinach (sałata, gorczyca, śmiałek, ogórek). Wyniki tych badań będą przedmiotem odrębnej publikacji.

Synergizm pochodnych kwasu 9-aminofluorenofosfonowego-9 z herbicydem mekoprop był niezwykle wyraźny dla większości związków (nr 22, 15, 12, 6, 16, 5, 1, 20 i 2, rys. 1). Dodatek 8×10^{-5} M tych związków do subtelnego roztworu herbicydu (10×10^{-5} M) już po kilku godzinach

Tabela 1—Table 1

Aktywność fizjologiczna pochodnych kwasu
9-aminofluorenofosfonowego-9

Physiological activity of 9-amine-9-fluorene-
phosphonic acid derivatives

Nr związku Compound No.	Stężenie zmniejszające plon suchej masy <i>Spirodela oligorrhiza</i> o 50% The concentration decreasing yield of <i>Spirodela oligorrhiza</i> dry matter by 50%	
	M	ppm
10	$0,5 \times 10^{-5}$	2,3
14	$0,7 \times 10^{-5}$	2,9
6	$1,5 \times 10^{-5}$	6,2
22	$14,0 \times 10^{-5}$	51,1
15	$16,0 \times 10^{-5}$	61,1
1 *	$16,5 \times 10^{-5}$	39,6
3	$18,5 \times 10^{-5}$	62,5
18	$22,0 \times 10^{-5}$	70,0
2	$25,0 \times 10^{-5}$	89,2
13	$33,2 \times 10^{-5}$	195,0
12	$34,0 \times 10^{-5}$	170,0

* Kwas fluorenofosfonowy-9.
9-fluorenephosphonic acid.

wywoływał wyraźne objawy w postaci bielenia członów spirodeli, a następnie szybko doprowadzał rośliny do śmierci. Natomiast sam herbicyd w zastosowanym stężeniu nie wpływał w widoczny sposób na rośliny. Same pochodne kwasu 9-aminofluorenofosfonowego-9 w stężeniu najwyższym (8×10^{-5} M) wprawdzie powodowały zmiany morfologiczne, lecz w stopniu o wiele słabszym, niż przy działaniu łącznym z herbicydem. Aktywność tego samego rzędu wykazał również przebadany dla porównania kwas fluorenokarboksylowy-9, jako przykład morfaktyny nie będącej pochodną kwasu 9-aminofluorenofosfonowego-9. Stopień uszkodzenia członów spirodeli dla tego związku przy stężeniu 8×10^{-5} M wynosił 1,2, a po dodaniu herbicydu w stężeniu 10×10^{-5} M wzrastał do 4,7. Związek nr 14 (ester etylowy podstawiony przy atomie azotu grupą butylową) był silnie aktywny w stężeniu 8×10^{-5} M wskutek czego dodatek herbicydu miał wpływ niewielki. Antagonizm wystąpił jednak wyraźnie przy niższym stężeniu tego związku (dla stężenia 4×10^{-5} M stopień uszkodzenia wynosił 2,0, a po dodaniu 10×10^{-5} M herbicydu wzrastał do 4,3, co praktycznie oznacza śmierć roślin). Związki nr 18, 3, 4 i 10 wykazywały nie synergizm lecz tendencję do działania antagoni-

Rys. 1. Synergizm pochodnych kwasu 9-aminofluorenofosfonowego z herbicydem mecoprop. Stopień uszkodzenia członów *Spirodela oligorrhiza* (Kurz.) Hegelm. a — badane pochodne (8×10^{-5} M); b — badane pochodne (8×10^{-5} M) + mecoprop (10×10^{-5} M). Skala oceny: 0 — brak wpływu, 5 — rośliny martwe

Fig. 1. Synergism of 9-amine-9-fluorenephosphonic acid derivatives with the herbicide mecoprop. The degree of damage of *Spirodela oligorrhiza* (Kurz.) Hegelm. fronds.

a — tested compounds (8×10^{-5} M); b — tested compounds (8×10^{-5} M) + mecoprop (10×10^{-5} M). Evaluation scale: 0 — no effect, 5 — plants died

stycznego, czyli obniżały fitotoksyczne działanie mekopropu przy wszystkich zastosowanych stężeniach. Wyjaśnienie tego zjawiska na podstawie przeprowadzonych doświadczeń nie jest możliwe. Związki nie wymienione na rysunku 1 nie wykazywały aktywności w zakresie badanych stężeń.

STRESZCZENIE

Przebadano aktywność fizjologiczną 21 pochodnych kwasu 9-aminofluorenofosfonowego-9, zsyntetyzowanych na Politechnice Wrocławskiej. Rośliną testową była *Spirodela oligorrhiza*. Badano hamujący wpływ tych związków na wzrost spirodeli oraz synergizm z herbicydem mekoprop. Największą aktywność wykazały estry etylowe podstawione przy atomie azotu grupą butylową i heptylową. Hamowały one wzrost spirodeli w 50% przy stężeniu $0,5-1,5 \times 10^{-5}$ M. Większość przebadanych pochodnych kwasu 9-aminofluorenofosfonowego-9 o różnych podstawnikach wykazała silny synergizm z herbicydem mekoprop. Dodatek tych związków do subletalnego roztworu herbicydu powodował śmierć spirodeli w ciągu kilkunastu godzin.

LITERATURA

- Bopp M., 1972. On the effect of morfactin, [w:] Kaldewey H., Vardar Y., Hormonal regulation in plant growth and development, Verlag Chemie, Weinheim, 333.
- Czerwiński W., Skrabka H., Szuwalska Z., 1969. Przewodnik do ćwiczeń z wybranych zagadnień fizjologii roślin, WSR, Wrocław, 17.
- Gancarz R., 1978. Synteza fosfonowych analogów morfakty. Instytut Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej, Komunikat nr 308.
- Gancarz R., Wieczorek J. S., 1976. Zgłoszenie patentowe P6/OP-2883/76.
- Gancarz R., Wieczorek J. S., 1977. Zgłoszenie patentowe P7/OP-828/77.
- Gräser H., 1978. Biochemie und Physiologie der Phytoeffektoren, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 307.
- Hillman W., 1961. Bot. Rev. 27: 222.
- Knypl J. S., Witek S., Oświećimska M., 1976. Z. Pflanzenphysiol. 79: 53.
- Mohr G., 1969. Dtsch. Bot. Ges. Neue Folge 3: 5.
- Ostrowski J., 1977. Nowe Rol. 26: 15.
- Pieniążek J., Saniewski M., 1967. Post. Nauk rol. 6: 39.
- Pieniążek J., Saniewski M., 1969. Post. Nauk rol. 3/4: 27.
- Schneider G., 1964. Naturwissenschaften 51: 416.
- Schneider G., 1970. Ann. Rev. Plant Physiol. 21: 499.
- Skrabka H., 1977. Zesz. nauk. A. R. Wroc., 1.
- Smith B. E., Burger A., 1953. J. Am. Chem. Soc. 75: 5891.
- Timmler H., Kurz I., 1971. Ber. 104: 3740, Pat. RFN 2 138 030.
- Timmler H., Kurz I., 1973. CA 78: 148072.
- Wieczorek J. S., Gancarz R., 1976. Roczn. chem. 50: 2171.