

两种农药树干注射对垂柳叶内 PPO 和 POD 活性及同工酶谱的影响

唐光辉¹, 田鹏鹏^{1a}, 陈安良^{1a,2}, 冯俊涛^{1a,2}, 张 兴^{1a,2}

(1 西北农林科技大学 a 无公害农药研究服务中心, b 林学院, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 研究了吡虫啉和啉虫脒树干注射对垂柳叶内多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)活性及其同工酶谱变化的影响。结果表明,两种杀虫剂树干注射均可引起垂柳叶片 PPO 活性上升,POD 活性下降。吡虫啉处理对 PPO 和 POD 活性的影响均大于啉虫脒,两种药剂处理后 15 d PPO 活性均达到最大值,10 d POD 活性均最低,药后 30 d PPO 和 POD 活性逐渐恢复到对照水平。吡虫啉处理使 PPO 同工酶酶带 E1($R_f = 0.71$)消失,E2($R_f = 0.77$)活性升高;啉虫脒处理使 PPO 同工酶酶带 E1 活性升高,E2 消失;药后 10,45 d 各处理酶带带型基本稳定。吡虫啉处理使 POD 同工酶药后 10 d 酶带 P1($R_f = 0.51$),P4($R_f = 0.67$)消失,45 d P1 消失而 P4 又出现;啉虫脒处理使 POD 同工酶酶带 P1 活性升高,P2($R_f = 0.56$)消失,药后 10,45 d 酶带带型相同。说明 PPO 和 POD 活性变化及其同工酶谱变化与注药种类有密切关系,可作为研究树干注药对树体生理影响的指标。

[关键词] 树干注药;吡虫啉;啉虫脒;垂柳;多酚氧化酶;过氧化物酶;同工酶

[中图分类号] S763.3;S718.43

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)04-0145-05

Effects of two pesticides on PPO, POD activity and isozymes in weeping willow (*Salix babylonica* Linn) by trunk injection

TANG Guang-hui¹, TIAN Peng-peng^{1a}, CHEN An-liang^{1a,2},
FENG Jun-tao^{1a,2}, ZHANG Xing^{1a,2}

(1 a Research and Development Center of Biorational Pesticide, b College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Shaanxi Research Center of Biopesticide Technology and Engineering, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The paper reported the effects of imidacloprid and acetamiprid on polyphenol (PPO), peroxidase (POD) activity and isozymes in weeping willow (*Salix babylonica* L.) leaves through trunk injection. Results showed that the two pesticides affected activities of PPO and POD as well as spectrums and activities of their isozymes after trunk injection; the activity of PPO was increased, while the activity of POD was decreased. Imidacloprid had more effect on the activity of PPO, POD than acetamiprid. After treatment of 15 days, the activity of PPO reached max, while after treatment of 10 days, the activity of POD reached minimum. The activities of PPO and POD resumed the normal level after 30 days of treatment. Imidacloprid caused the disappearance of E1 ($R_f = 0.71$) and the increased activity of E2 ($R_f = 0.77$) of PPO isozymes. Acetamiprid caused the increased activity of E1 and the disappearance of E2 of PPO isozymes. The changes of spectrums of PPO isozymes after 10 days were as stable as those after 45 days af-

[收稿日期] 2006-03-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30371145)

[作者简介] 唐光辉(1970—),男,新疆石河子人,讲师,在读博士,主要从事树木保护技术研究。E-mail: Tyhui621@yahoo.com.cn

[通讯作者] 冯俊涛(1967—),男,河南登封人,副教授,主要从事植物化学保护和农药学研究。E-mail: Fengjt@126.com

ter trunk injection with two pesticides. Imidacloprid caused the disappearance of P1 ($R_f = 0.51$) and P4 ($R_f = 0.67$) after 10 days but appearance of P4 after 45 days of POD isozymes. Acetamiprid caused the increased activity of P1, and the disappearance of P2 ($R_f = 0.56$) of POD isozymes. The effects of spectrums of POD isozymes after 10 days were the same as those after 45 days by trunk injection with acetamiprid. It was postulated that the activities of PPO, POD and their isozymes could be used as indicators to research the effects on physiology of trees through trunk infection.

Key words: trunk injection; imidacloprid; acetamiprid; weeping willow; PPO; POD; isozyme

化学农药作为植物的环境胁迫因子之一,对植物的影响已引起了人们的关注。研究表明,丁溴砒(bromacil)和乐果(dimethoate)两种药剂同时处理 9 个月的柑桔(*Citrus lambhiri*)幼苗,10 d 后柑桔光合作用受到抑制,细胞原生质膜产生严重损伤^[1];除虫脲(diflubenzuron)处理可降低大豆(*Glycine max*)的呼吸强度^[2];用 200 mg/L 溴氰菊酯喷施三叶期黄瓜幼苗可导致黄瓜叶片叶绿素含量降低,类胡萝卜素含量增加^[3];化学杀虫剂毒死蜱和植物源农药鬼臼毒素对蔬菜上海青抗氧化酶系活性及丙二醛含量产生一定影响^[4];高效氯氰菊酯、灭多威和辛硫磷等杀虫剂处理对甘蓝叶内多酚氧化酶的活性有一定影响^[5]。

药剂经树干注射对危害林木的多种蛀干、食叶、枝梢害虫均有较好的防效^[6-8]。树干注药技术在森林、公园、城市园林绿化、行道树林木害虫防治中已得到广泛应用^[9-10]。与常规叶面喷雾相比,树干注药是通过树干施药使药剂直接进入树体并分布于树体内。因此,药剂在树体内有着更长的残留期^[6,11],其对树体的影响较其他施药技术更加直接^[12]。但有关杀虫剂树干注药对树体生理生化影响的研究报道甚少。本试验研究了吡虫啉和啉虫脒两种杀虫剂树干注射对垂柳叶片多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)活性及其同工酶谱变化的影响,为深入了解农药使用对树体的负面效应,以及科学合理使用农药提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试药剂

4.5%吡虫啉注干液剂和 5%啉虫脒注干液剂(自制)。

1.2 供试树木

在杨凌农业高新产业示范区公路苗圃柳树幼林地内,选择树龄 4 a,树高 4~5 m,直径 5 cm 左右,生长良好、树势均一的垂柳(*Salix babylonica* L.)为试验对象。

1.3 试验样品的前处理

采用自流式树干注药技术施药^[10],注药前将 4.5%吡虫啉注干液剂和 5%啉虫脒注干液剂装入自流式注药器(西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供)中备用。用可充电式电钻在树干基部距离地面 20 cm 处斜向下 45°打一直径为 0.45 cm、深 3~4 cm 的小孔。用小刀将装有药剂的自流式注药器尖端削开,用针将盲口捅破后插入树孔内,待药剂完全进入树体后收回注药器。注药量为 8 mL/树,以不注药的垂柳为空白对照,每处理重复 3 次。

注药时间为 2004-05-15,于注药前及注药后 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60 d 分别采样。叶片采集方法:分别在树冠中部的东、南、西、北 4 个方位进行采样(叶片不少于 50 片),装袋带回实验室。用毛刷刷去叶片表面的污物,并用蒸馏水洗净、擦干,保藏于 -20 °C 冰箱中备用。

1.4 酶液制备

参考文献[13]的方法。准确称取垂柳叶片 0.2 g 样叶,加入磷酸缓冲液(PBS, pH7.8)3 mL,冰浴中研磨成匀浆,在高速冷冻离心机上 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,于 -20 °C 冰箱内保存备用。

1.5 酶活性测定

多酚氧化酶(PPO)活性测定参照李靖等^[14]的方法;过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法^[15]。

1.6 同工酶分析

同工酶分析采用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。PPO 同工酶电泳采用 4%浓缩胶,7.5%分离胶,邻苯二酚-对苯二胺染色液染色^[16]。POD 同工酶电泳采用 4%浓缩胶,10%分离胶,联苯胺染色液染色^[17]。所有同工酶均先在 80 V 恒压下电泳,当溴酚兰进入分离胶后,在 150 V 恒压下电泳,当溴酚兰指示剂达到下方前缘 0.5 cm 时结束电泳。染色后用玻璃纸将分离胶片固定并包好,放在室温下自然晾干,待 2~3 d 胶片晾干后,利用 UVP 凝胶

系统成像仪进行图像扫描和分析。

2 结果和分析

2.1 杀虫剂对垂柳叶内多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)活性的影响

由图 1 可见,吡虫啉和啶虫脒树干注射后,随处理时间的延长垂柳叶内 PPO 活性出现先上升,后逐

渐恢复的趋势。吡虫啉对 PPO 活性的影响大于啶虫脒,吡虫啉注干 1 d 后便可引起 PPO 活性上升,啶虫脒注干 5 d 后 PPO 活性才逐渐升高。15 d 时两种药剂处理的 PPO 活性均达到最大值,30 d 后 PPO 活性均逐渐趋于对照水平,恢复正常值。

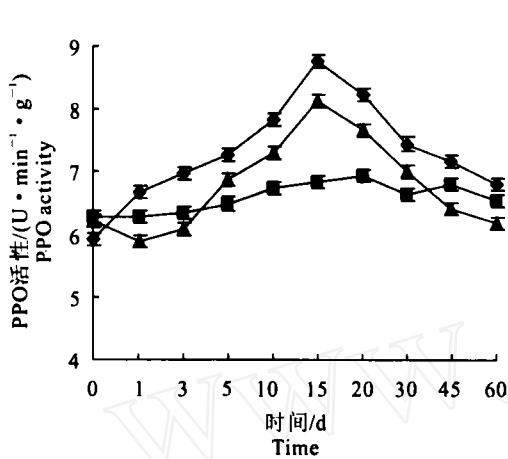


图 1 树干注药对垂柳叶内 PPO 活性的影响
—◆—, 吡虫啉; —▲—, 啶虫脒; —■—, 对照
Fig. 1 Changes of PPO activity after treatment
—◆—, Imidacloprid; —▲—, Acetamiprid; —■—, Control

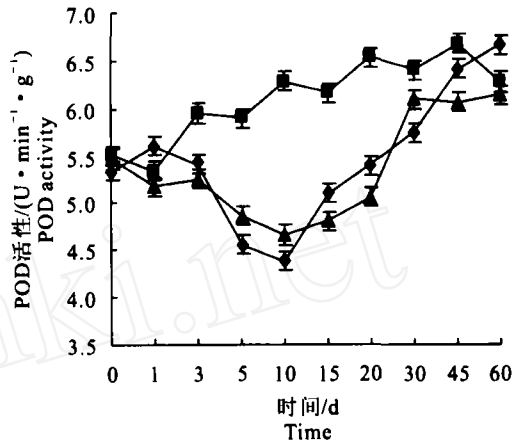


图 2 树干注药对垂柳叶内 POD 活性的影响
—◆—, 吡虫啉; —▲—, 啶虫脒; —■—, 对照
Fig. 2 Changes of POD activity after treatment
—◆—, Imidacloprid; —▲—, Acetamiprid; —■—, Control

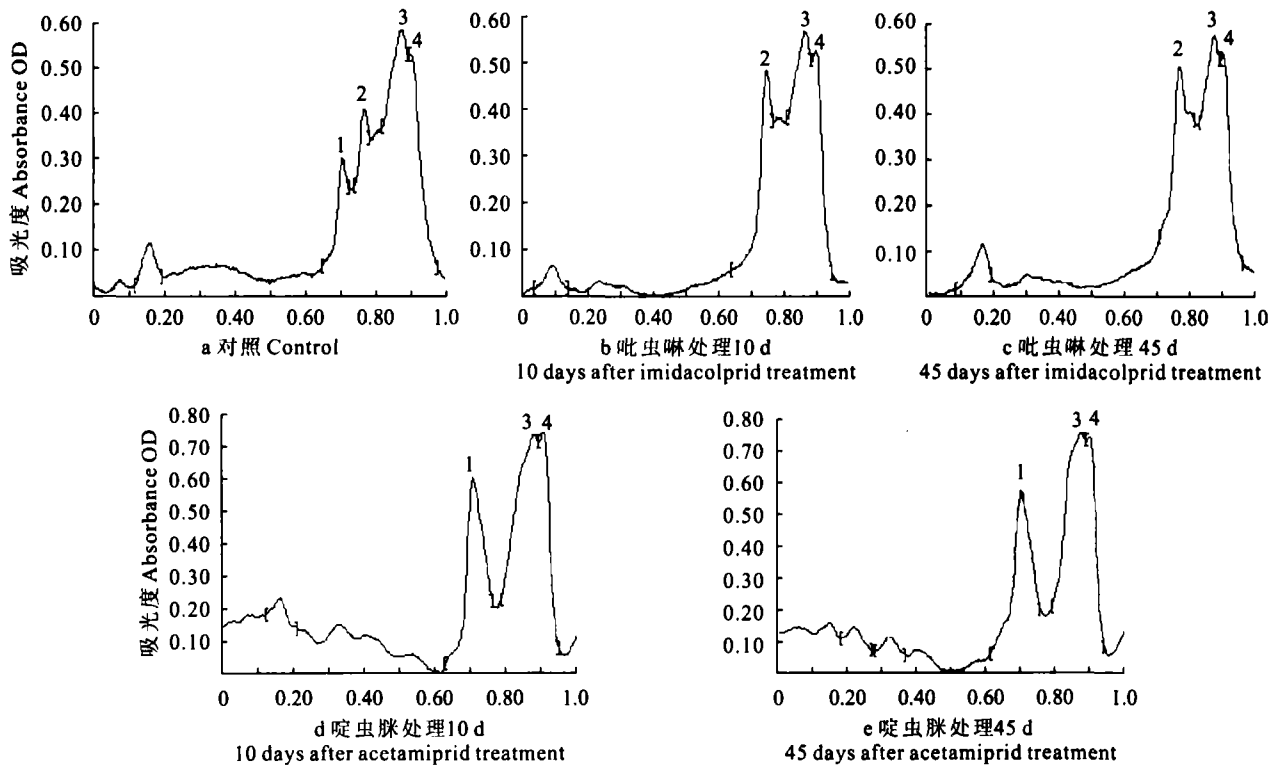


图 3 吡虫啉、啶虫脒树干注射对垂柳叶片 PPO 同工酶谱的影响
Fig. 3 Effect of different pesticides on PPO isozyme of *Salix babylonica* by trunk injection
由图 2 可见,吡虫啉和啶虫脒树干注射抑制垂柳叶内 POD 活性,随处理时间的延长 POD 活性逐

渐恢复。吡虫啉对 POD 活性的影响大于啶虫脒, 注于 10 d 后 POD 活性最低, 30 d 后 POD 活性逐渐恢复到对照水平。

2.2 杀虫剂对垂柳叶内多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)同工酶的影响

从图 3 可以看出, 两种药剂处理均使垂柳叶内 PPO 同工酶产生明显变化。空白对照主要有 4 条酶带, 分布在 R_f 值 0.70~0.95 的区域, 分别为 E1

($R_f = 0.71$)、E2 ($R_f = 0.77$)、E3 ($R_f = 0.87$)、E4 ($R_f = 0.91$)。吡虫啉处理使 E1 消失, E2 活性升高, 药后 10、45 d 时酶带数量及活性无明显差异, 从区带的积分 OD 值来看, E2 活性较对照升高。而啶虫脒处理使 E2 消失, E1 活性升高, 药后 10、45 d 时酶带数量无明显变化, 从区带的积分 OD 值来看, E1、E3 和 E4 的活性均明显高于对照。

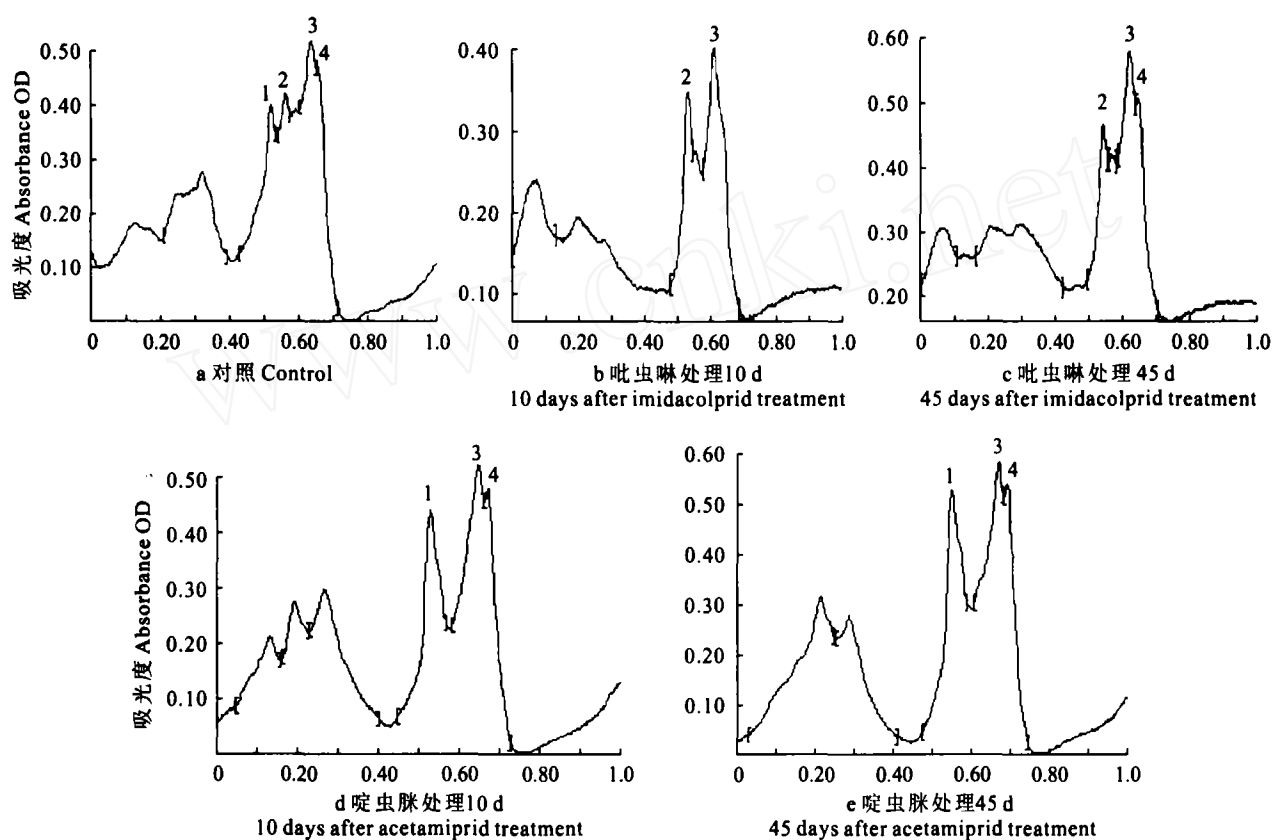


图 4 吡虫啉和啶虫脒树干注射对垂柳叶片 POD 同工酶谱的影响

Fig. 4 Effect of different pesticides on POD isozyme of *Salix babylonica* by trunk injection

吡虫啉和啶虫脒树干注射对垂柳叶片 POD 同工酶谱的影响见图 4。从图 4 可以看出, 吡虫啉和啶虫脒树干注射后对垂柳叶内 POD 同工酶产生明显影响。空白对照主要酶带分为两个区域, 其中分布在 R_f 值 0.10~0.40 酶带的活性低, 分布在 R_f 值 0.50~0.70 酶带的活性较高, 分别为 P1 ($R_f = 0.51$)、P2 ($R_f = 0.56$)、P3 ($R_f = 0.64$)、P4 ($R_f = 0.67$)。吡虫啉处理后 10 d P1 和 P4 消失, 药后 45 d P1 消失, 但 P4 又出现, 从区带的积分 OD 值来看, 药后 10 d 时 P2 和 P3 的活性均明显低于对照, 药后 45 d 时 P3 的活性明显高于对照。啶虫脒处理后 10、45 d 使 P2 消失, 药后 45 d P1、P3 和 P4 的活性均明显高于对照。

3 讨论

同工酶对环境的影响非常敏感^[18]。酶活性的改变表现在同工酶谱上出现不同数量及不同迁移率的谱带, 这主要是由环境胁迫引起基因表达的改变而造成的。因此, 同工酶分析可反映生物对外界环境变化的响应情况。

吡虫啉和啶虫脒同属于氯代烟酰胺类杀虫剂, 本研究结果表明, 两种药剂经树干注射后均可引起垂柳叶内 PPO 活性上升, POD 活性下降。在药剂诱导下 PPO 活性 15 d 后达到最大值, POD 活性 10 d 时最低, 30 d 后各处理组 PPO、POD 活性均恢复到正常水平。吡虫啉对 PPO、POD 活性的影响大于啶

虫脒。

两种药剂对垂柳叶内 PPO、POD 活性及其同工酶变化的影响规律存在一定差异,树干注药引起垂柳叶内 PPO、POD 同工酶谱有较长时间的变化,这种变化与药剂在树体内有较长的残留期相一致(两种药剂在柳树叶内的残效期均达到 110 d)^[19]。但树体通过调节 PPO、POD 同工酶不同谱带活性变化,使得药剂处理 30 d 后 PPO、POD 活性便恢复到正常水平。说明吡虫啉和啉虫脒树干注射后,引起垂柳叶内 PPO、POD 活性及其同工酶变化是暂时性的、可恢复的。这充分反映出药剂处理可导致垂柳叶内 PPO、POD 基因表达变化,这种基因表达变化在药效期内可以维持较长时间,并且可以通过各基因表达量的变化来调节 PPO、POD 活性,使 PPO、POD 活性在相对较短时期内恢复到正常水平,保持其正常生理活性,减少药剂胁迫对树体正常生理生化活动的影响。

[参考文献]

- [1] Kriton K H, Donald P. The effect of diflubenzuron on soybean photosynthesis, respiration and leaf ultrastructure[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1978, 9: 65-69.
- [2] Marison M J, Vandyk L P. The phytotoxic interaction between bromazil and dimethoate in citrus plants[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1987, 29: 10-16.
- [3] 郑东, 黄卓烈. 溴氰菊酯对黄瓜光合色素、叶绿素和氨基乙酰丙酸合酶活性的影响[J]. 华南农业大学学报, 1997, 17(3): 75-80.
- [4] 徐教明, 马志卿, 冯俊涛, 等. 毒死蜱和鬼臼毒素胁迫对蔬菜上海青抗氧化酶系及丙二醛的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(6): 1089-1092.
- [5] 王丽红, 高希武. 甘蓝多酚氧化酶的生物化学性质及其杀虫剂的诱导作用[J]. 农药学报, 2004, 6(4): 33-37.
- [6] 戴建昌, 张兴. 杀虫剂在木本植物体内传导理论研究进展[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(4): 128-134.
- [7] 梁细弟. 日本树干注入剂的应用及最新进展[J]. 林业科技通讯, 1997(8): 35-36.
- [8] 张怡, 李刚, 戴建昌, 等. 自流式树干注药防治杨树光肩星天牛幼虫研究[J]. 西北农业学报, 2001, 10(2): 87-90.
- [9] 高瑞桐, 冯秀丽, 沈波. 吡虫啉杀虫剂注干对 4 种鞘翅目害虫毒杀效果研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17(2): 263-266.
- [10] 罗都强, 陈安良, 冯俊涛, 等. “注干液剂”的概念及实践[J]. 农药, 2001, 40(4): 16-18.
- [11] 许志春, 田海燕, 陈学英, 等. 吡虫啉在杨树中持留量的动态变化研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(1): 62-65.
- [12] 唐光辉. 30%敌畏·氧乐注干液剂对木本植物的药害机理及药效研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2001.
- [13] 薛应龙. 植物生理实验手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1985: 191-192.
- [14] 李靖, 利荣千, 袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 277-283.
- [15] 袁朝兴, 丁静. 水分胁迫对棉花叶片中 IAA 含量、IAA 氧化酶和过氧化物酶活性的影响[J]. 植物生理学报, 1990, 16(2): 179-180.
- [16] 毕玉蓉, 梁厚果. 烟草愈伤组织多酚氧化酶研究[J]. 实验生物学报, 1988, 21(3): 257-263.
- [17] 吴少伯. 植物组织中蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳[J]. 植物生理学通讯, 1979, 15(1): 30-33.
- [18] Toyomasu T, Zennyozu A. On the application of isoenzyme electrophoresis to identification of strains in *Leurinus edodes*[J]. Mushroom Sci, 1981, 11: 675-684.
- [19] 唐光辉, 何军, 冯俊涛, 等. 树干注药对柳树害虫的持续性控制研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(5): 117-120.