

树干注药对柳树几种保护酶活性及游离脯氨酸含量的影响

唐光辉^{1,3} 张静^{1,2} 何军^{1,2} 冯俊涛^{1,2} 张兴^{1,2}

(1. 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 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; 3. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要 以垂柳为材料研究 4 种注干药剂(吡虫啉、啶虫脒、吡虫啉+敌敌畏和敌畏·氧乐)树干注药后其叶片内几种保护酶活性及游离脯氨酸含量的变化。结果表明:4 种药剂树干注药后垂柳叶片内超氧化物歧化酶(SOD)活性均呈现上升-下降-上升的过程。敌畏·氧乐对 SOD 影响最明显,药后 1 d 活性上升了 85.01%,6 d 活性下降了 35.99%,20 d 上升了 32.00%。各药剂处理均可提高多酚氧化酶(PPO)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性,抑制过氧化物酶(POD)活性。吡虫啉对 PPO 刺激作用最明显,药后 10 d 活性上升了 21.87%;对 POD 抑制作用最显著,药后 6 d 活性下降了 24.78%。敌畏·氧乐对 PAL 活性影响最显著,药后 6 d 活性上升了 28.97%。各药剂处理均可提高游离脯氨酸的含量,其中敌畏·氧乐的影响最显著,药后 3 d 含量增加了 52.91%。树干注药 30 d 后各处理组 SOD、POD、PPO 和 PAL 活性及游离脯氨酸的含量均逐渐恢复到对照水平。

关键词 树干注药; 杀虫剂; 柳树; 保护酶; 脯氨酸

中图分类号 Q 945

文章编号 1007-4333(2007)03-0032-05

文献标识码 A

Pesticide effects on some protective enzymes and dissociative proline in willow by trunk injection

Tang Guanghui^{1,3}, Zhang Jing^{1,2}, He Jun^{1,2}, Feng Juntao^{1,2}, Zhang Xing^{1,2}

(1. Research and Development Center of Biorational Pesticide, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Shaanxi Research Center of Biopesticide Technology and Engineering, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract The effects of four types of liquid pesticides (imidacloprid, acetamiprid, imidacloprid + DDVP and DDVP + omethoate) on some protective enzymes and dissociative proline in weeping willow (*Salix babylonica* Linn) leaves through trunk injection were reported. The result showed that the activity of SOD experienced a raising-descending-raising process after a trunk injection. Among four pesticides, DDVP + omethoate affected the activity of SOD greatly, the activity was increased 85.01% within one day, reduced 35.99% within six days and increased 32.00% within twenty days after a trunk injection. All of four pesticides caused the increase of PPO and PAL activity and the decrease of POD activity. Imidacloprid seriously affected PPO and POD activities, the activity of PPO was increased 21.87% within ten days after a trunk injection, and the activity of POD was reduced 24.78% within six days after a trunk injection. DDVP + omethoate affected PAL activity greatly; the activity was increased 28.97% within six days after a trunk injection. The content of dissociative proline had also descended after treated by the four pesticides through trunk injection. DDVP + omethoate affected the content of proline greatly; the content was increased 52.91% within three days after a trunk injection. The activity of SOD, POD, PPO, PAL and the content of dissociative proline had come back to the control level within thirty days after a trunk injection.

Key words trunk injection; pesticide; weeping willow; protective enzyme; proline

收稿日期: 2006-12-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371145)

作者简介: 唐光辉, 讲师, 博士研究生, E-mail: huitang621@126.com; 何军, 副研究员, 通讯作者, 主要从事农药学研究与开发, E-mail: Hejun6206@126.com

树干注药技术通过林木树干施药,药剂直接注入树木体内,不与周围环境接触,从而避免了环境污染,是一种理想的、与环境相容的农药使用技术^[1]。树干注药对刺吸式口器害虫、食叶类害虫具有理想的防治效果,尤其对于防治林木蛀干害虫意义重大。目前该技术在森林、公园、城市园林绿化等的害虫防治中得到应用^[2-4]。田间试验结果表明30%敌畏·氧乐、吡虫啉等药剂注干后对危害林木的多种蛀干、食叶、枝梢害虫有较好的防效^[5-7]。

农药使用时常与被保护植物密切接触,因而对被保护植物的影响较大,已引起人们的广泛关注。叶面喷雾对植物生理生化的影响已有相关报道^[8-11]。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)为动植物体内抗氧化物保护酶,在植物抗逆反应中起重要作用^[12-13];多酚氧化酶(PPO)为植物体内酚类物质代谢的参与酶,与植物抗病性相关^[14];苯丙氨酸解氨酶(PAL)是植物体内苯丙烷类代谢途径中的限速酶,调控酚类物质和木质素在植物体内的合成和积累,其活性高低在一定程度上反映植物特定时期次生代谢物质合成的速度^[15]。植物受到一定程度的逆境胁迫后,体内游离脯氨酸含量会增加^[16]。树干注药时药剂直接进入并分布于树体内,在树体内有较长的残留期^[17],因而树干注药对树体的影响较其他施药技术更加直接^[18]。笔者采用4种对林木害虫具有良好防效的注干药剂^[3,7],研究其经树干注药后对垂柳叶片内SOD、POD、PPO和PAL的活性及游离脯氨酸含量变化的影响,旨在深入了解农药使用的负效应,以期为农药的合理使用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 供试药剂

有效成分为4.5%(质量分数;无特殊标注同此)的吡虫啉(imidacloprid)、5%的啮虫脒(acetamiprid)和14%的吡虫啉·敌敌畏(imidacloprid + DDVP)注干液剂(内含4%的吡虫啉和10%的敌敌畏),均由西北农林科技大学无公害农药研究中心提供。除有效成分外,3种注干药剂中均还含有溶剂甲醇、乳化剂OP-10及助溶剂等。30%的敌畏·氧乐(DDVP + omethoate)注干药剂由杨凌农药化工有限公司生产。

1.2 供试树木

垂柳(*Salix babylonica* Linn),在陕西杨凌农业

高新产业示范区公路苗圃柳树幼林地内选择树龄4年、树高4~5 m、胸径5 cm左右、生长良好、树势均一的垂柳供试。

1.3 树干注药及采样

采用自流式树干注药技术施药^[3],注药前将4.5%吡虫啉、5%啮虫脒和14%吡虫啉·敌敌畏注干药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地面20 cm处斜向下45°打一直径0.4 cm、深3~4 cm的小孔。用小刀将自流式注药器尖端削开,用针将盲口捅破后插入孔内,待药液完全进入树体后收回注药器。注药量为8 mL/树,每处理重复3次。

注药时间为2005年4月15日,于注药后于0、1、3、6、10、15、20、30和45 d采样。叶片采集方法:分别在树冠中部的东、南、西、北4个方位采样,将采集的每一处理的样品混合(叶片不少于100片)。用毛刷刷去叶片表面的污物,并用蒸馏水洗净、擦干,保存于-20℃冰箱中备用。

1.4 保护酶活性测定

1.4.1 酶粗提液的制备

1)将1 g样品放入预冷的研钵中,加入4 mL预冷的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.8,含1%聚乙烯吡咯烷酮)及0.2 g石英砂,冰浴中研磨成匀浆,0~4℃下高速冷冻离心机离心15 min(12 000 r/min),取上清液于-20℃低温保存,用于SOD活性测定。

2)将1 g样品放入预冷的研钵中,加入4 mL预冷的蒸馏水及0.2 g石英砂,冰浴中研磨成匀浆,0~4℃下高速冷冻离心机离心20 min(12 000 r/min),取上清液-20℃保存,用于POD、PPO活性的测定。

3)将1 g样品放入预冷的研钵中,加入4 mL预冷的0.05 mol/L硼酸盐缓冲液(pH 8.8,含5 mmol/L巯基乙醇,1%聚乙烯吡咯烷酮)及0.2 g石英砂,冰浴中研磨成匀浆,0~4℃下高速冷冻离心机离心15 min(12 000 r/min),取上清液-20℃保存,用于PAL活性的测定。

1.4.2 酶活性测定 SOD活性测定采用氮蓝四唑(NBT)法^[19],每min内抑制光氧化还原NBT 50%为1个酶活性单位(U),酶活性为每g鲜样的U数, U/g。POD活性测定采用愈创木酚法^[19],酶活性以在470 nm下,每g鲜样每min的光密度变化值

D_{470} 表示。PPO活性测定参照李靖等^[20]方法,酶活性以398 nm下,每g鲜样每min的光密度变化值表示 D_{398} 。PAL活性测定为,测定 D_{290} 值,以 D 值变化0.01为1个酶活力单位^[21]。

1.5 游离脯氨酸含量测定

采用酸性水合茚三酮显色法测定^[22]。

2 结果与分析

2.1 树干注药对柳树叶内超氧化物歧化酶的影响

树干注药后SOD活性呈波动变化,经历了上升-下降-上升的过程(图1(a))。各处理组中,药剂敌畏·氧乐对SOD影响最明显,药后1d与对照相比,酶活性上升了85.01%;随后下降,6d时酶活性最低,下降了35.99%;随后酶活性再次上升,20d时上升了32.00%。吡虫啉、吡虫啉·敌敌畏和啶虫脒

处理引起SOD上升,药后3d时酶活性达到峰值,分别上升了67.15%、44.59%和35.36%;随后酶活性下降,6d时最低,分别下降了14.01%、21.02%和33.17%;然后酶活性再次上升,15d时分别上升了26.53%、15.68%和41.57%。药后30d各处理组SOD活性均逐渐恢复到对照水平。

2.2 树干注药对柳树叶内过氧化物酶的影响

树干注药后药剂对POD活性主要表现为抑制作用(图1(b))。注药后POD活性经短暂上升后下降,几种药剂中吡虫啉处理对POD活性影响最显著,药后1d时对POD活性刺激作用最明显,活性上升了27.03%,药后6d对POD活性抑制作用最强,活性下降了24.78%;敌畏·氧乐处理药后3d POD活性降低了23.33%。药后30d各药剂处理组POD活性均接近对照水平。

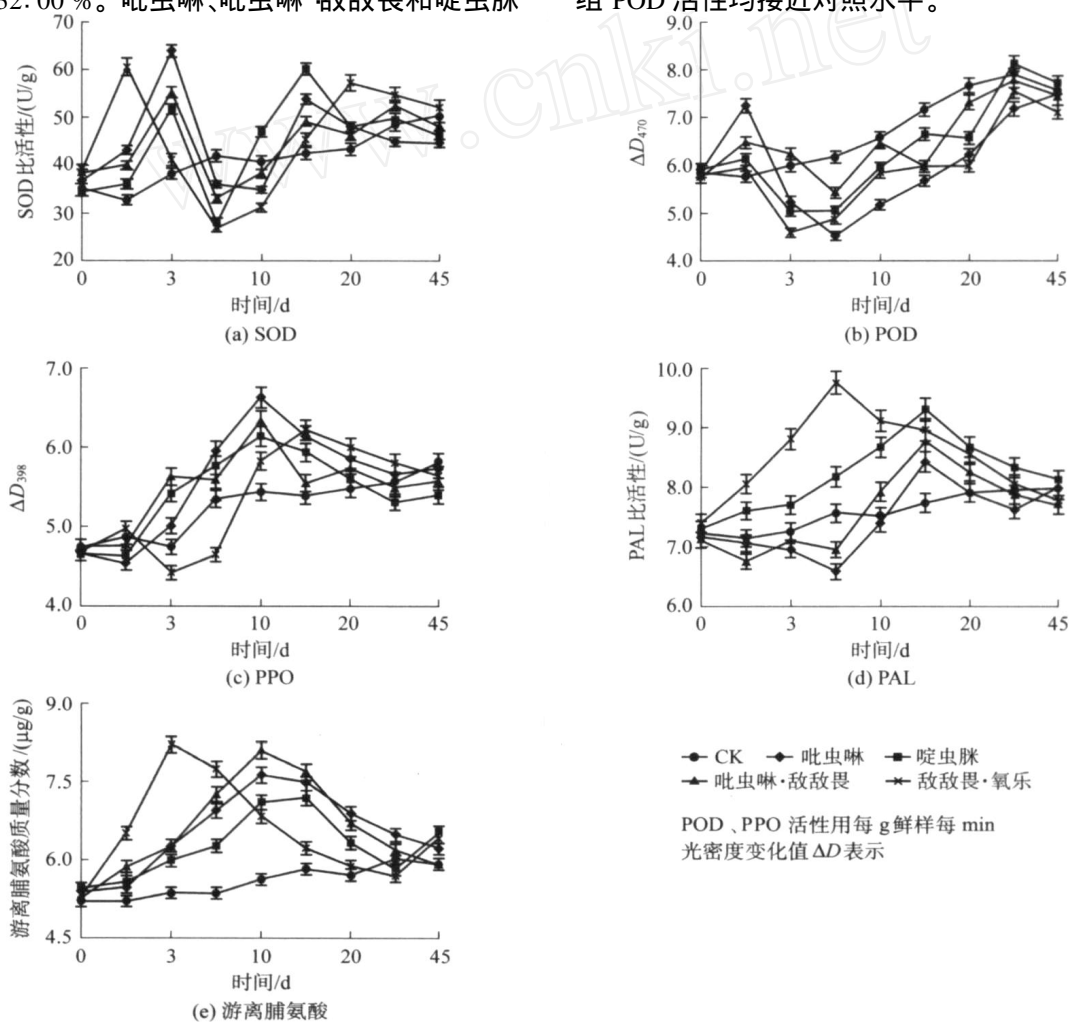


图1 树干注药后柳树叶内SOD、POD、PPO、PAL活性及游离氨基酸含量的变化

Fig. 1 Effect of pesticides on SOD, POD, PPO and PAL activity and Proline content of *S. babylonica* by trunk injection

2.3 树干注药对柳树叶内多酚氧化酶的影响

树干注药后 PPO 活性主要表现为升高(图 1(c))。吡虫啉、吡虫啉-敌敌畏和啶虫脒处理对 PPO 活性影响规律相似,均可刺激 PPO 活性升高;药后 10 d 时活性最高,分别上升了 21.87%、16.54% 和 12.87%。敌畏-氧乐处理前期抑制 PPO 活性,药后 6 d 活性最低,下降了 13.27%;然后活性上升,15 d 时达到峰值,活性上升了 15.39%。各处理组中,吡虫啉对 PPO 刺激作用最明显。药后 30 d 各处理组 PPO 活性逐渐恢复到对照水平。

2.4 树干注药对柳树叶内苯丙氨酸解氨酶的影响

各药剂处理对 PAL 活性影响存在一定差异(图 1(d)),敌畏-氧乐处理对 PAL 活性影响最显著。敌畏-氧乐和啶虫脒处理后刺激提高 PAL 活性,敌畏-氧乐处理药后 6 d 活性上升了 28.97%,啶虫脒处理药后 15 d 活性上升了 20.31%。吡虫啉-敌敌畏和吡虫啉处理后 PAL 活性呈现出先抑制、后上升的变化;药后 6 d 活性分别下降了 12.96%、8.07%,药后 15 d 活性分别上升了 13.45%、8.93%。药后 30 d 各药剂处理组 PAL 活性逐渐恢复到对照水平。

2.5 树干注药对柳树叶内脯氨酸含量的影响

各处理均可提高垂柳叶内游离脯氨酸的含量(图 1(e)),药剂敌畏-氧乐对游离脯氨酸含量影响最显著。敌畏-氧乐处理药后 3 d 游离脯氨酸的含量与对照相比上升了 52.91%,吡虫啉-敌敌畏、吡虫啉和啶虫脒处理药后 10 d 游离脯氨酸含量分别增加了 44.13%、35.58% 和 26.62%。药后 30 d 各处理组游离脯氨酸含量逐渐恢复到对照水平。

3 结论与讨论

本研究结果表明:吡虫啉、啶虫脒、吡虫啉-敌敌畏和敌畏-氧乐树干注药后均可不同程度提高柳树叶片内 SOD、PPO、PAL 的活性,抑制 POD 的活性,提高游离脯氨酸含量,各药剂处理之间对酶活性及游离脯氨酸含量的影响存在一定差异。药剂处理后 SOD 活性呈现出波动变化,经历了上升-下降-再次上升的变化,敌畏-氧乐对 SOD 影响最明显。吡虫啉、吡虫啉-敌敌畏和啶虫脒树干注药后对 PPO 活性影响规律相似,均可直接刺激 PPO 活性升高,敌畏-氧乐处理前期抑制 PPO 活性,后期 PPO 活性上升。各处理组中,药剂吡虫啉对 PPO 的刺激作用最明显。药剂敌畏-氧乐和啶虫脒处理后直接刺激提高 PAL 活性,药剂吡虫啉-敌敌畏和吡虫啉处理后

PAL 活性呈现出先抑制、后上升的变化,药剂敌畏-氧乐处理对 PAL 活性影响最显著。药剂处理抑制 POD 活性,注药后 POD 活性经短暂上升阶段,然后迅速下降,几种药剂中吡虫啉处理对 POD 活性影响最显著。

树干注药可提高游离脯氨酸的含量,提高树体的抗逆性,药剂敌畏-氧乐对游离脯氨酸含量影响最显著。

在药剂胁迫的影响下,树干注药后各处理组柳树叶内 SOD、POD、PAL、POD 的活性和游离脯氨酸含量在经历了各种不同程度的变化后,30 d 时均逐渐恢复到对照水平。笔者在研究中还发现这 4 种注干药剂树干注药后 30 d 内对可溶性总糖、纤维素含量的影响主要表现为抑制作用,对叶绿素、可溶性蛋白、淀粉含量的影响则表现为先抑制后增高^[23]。田间试验表明,树干注药后药剂吡虫啉和啶虫脒在柳树体内持效期可达 100 d 以上,药剂氧化乐果和敌敌畏在柳树体内持效期也超过了 30 d^[7],说明药剂经树干注药后在树体内较长的残留期内,虽然在注药后一定时间内对树体内某些生理生化代谢产生了影响,但药剂所造成的逆境胁迫是树体可忍耐的,随着时间的延长,树体可通过自身的调节作用恢复正常的生理生化代谢水平。

有关树干注药后树体生理生化代谢水平的变化对树木抗逆性能力变化造成的影响,以及树体应对药剂胁迫、自我调节恢复正常生理生化代谢水平的机制,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 胥占义,秦飞,周正标. 树木注射施药机械与使用技术进展[J]. 世界林业研究,1998,11(2):38-43
- [2] Kazuya T, Toshio S, Kazuyoshi K. Distribution and persistence of emamectin benzoate at efficacious concentrations in pine tissues after injection of a liquid formulation [J]. Pest Management Science, 2004, 60(1):42-48
- [3] 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
- [4] Gill S, Jefferson D, Reeser R, et al. Use of soil and trunk injection of systemic insecticides to control lace bug on hawthorn[J]. Journal of Arboriculture, 1999, 25(1):38-42
- [5] Sclar D. Evaluation of new systemic insecticides for elm insect pest control[J]. J Environ Hortc, 1996, 14(1):22-26

- [6] 高瑞桐,冯秀丽,沈波,等. 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
- [7] 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):110-113
- [8] 冯绪猛,罗时石,胡建伟,等. 农药对水稻叶片丙二醛及叶绿素含量的影响[J]. 核农学报,2003,17(6):481-484
- [9] 李钦,魏凤琴,陈纪新,等. 甲胺磷、辛硫磷对坛紫菜叶状体的生理效应[J]. 水产学报,2004,28(2):221-224
- [10] 吴进才,徐俊峰,冯绪猛,等. 稻田常用农药对水稻3个品种生理生化的影响[J]. 中国农业科学,2003,36(5):536-541
- [11] Wu J C, Xu J X, Yuan S Z, et al. Pesticide-induced susceptibility of rice to brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2001,100(1):119-126
- [12] Mehdy M C. Active oxygen species in plant defense against pathogens[J]. *Plant Physiology*, 1994,105(2):467-472
- [13] 王宝山. 生物自由基与植物膜伤害[J]. 植物生理学通讯,1988,24(2):12-16
- [14] 宋风鸣,郑重,葛秀春. 枯萎病菌感染后棉苗体内多酚氧化酶活性的变化[J]. 植物生理学通讯,1997,33(3):175-177
- [15] 欧阳光察,薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及调控[J]. 植物生理学通讯,1988,24(3):9-16
- [16] 汤章城. 逆境条件下植物脯氨酸的积累及其可能意义[J]. 植物生理学通讯,1984,20(1):15-21
- [17] Cowles R, Montgomery M, Cheah C. Activity and residues of imidacloprid applied to soil and tree trunks to control hemlock woolly adelgid (Hemiptera: Adelgidae) in forests[J]. *J Econ Entomol*,2006,99(4):1258-1267
- [18] 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]. 陕西杨陵:西北农林科技大学,2001
- [19] 李合生. 植物生理生化室验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:164-169
- [20] 李靖,利荣干,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
- [21] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 北京:世界图书出版公司,2000:203-204
- [22] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 北京:世界图书出版公司,2000:201-202
- [23] 唐光辉,田鹏鹏,冯俊涛,等. 树干注药对柳树叶片几种生理指标的影响[J]. 农药学报,2006,8(4):383-386