

大(古)松树树干注药残留量检测技术研究



余佳豪^{1,2,3}, 李正洋^{1,2,3}, 唐万江^{1,2,3}, 代川虎^{1,2,3}, 司凤玲^{1,2,3}, 杨世璋⁴, 闫振天^{1,2,3}, 陈斌^{1,2,3,*}

¹重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331

²重庆师范大学昆虫分子生物学研究所, 重庆 401331

³媒介生物控制和利用重庆市重点实验室, 重庆 401331

⁴重庆市森林病虫防治检疫站, 重庆 408099

摘要: 注干施药技术是一种主动预防松材线虫病的技术。研究选取了忠县、巴南、北碚区缙云山国家级自然保护区、武隆、梁平、合川六个区县(单位)的大(古)马尾松(*Pinus massoniana*)为研究对象,采用注干施药方法明确了2.3%甲维盐及5%阿维菌素对松材线虫病的预防效果,采用高效液相色谱测定了注干施药180d和360d后马尾松的甲维盐的残留量。结果表明,甲维盐及阿维菌素注干施药对忠县、巴南、北碚区缙云山国家级自然保护区、武隆、梁平、合川六个区县(单位)的大(古)马尾松林的松材线虫病防治效果显著,连续2a预防效果均达到99%以上;此外,建立了马尾松中甲维盐及阿维菌素残留检测方法,侧枝中甲维盐及阿维菌素的添加回收率都超过80%,甲维盐及阿维菌素分析方法满足残留检测要求;注干后180d,甲维盐及阿维菌素在松树侧枝上的残留浓度最高处分别为 $2.93 \pm 1.63 \text{ mg kg}^{-1}$ 、 $2.93 \pm 0.69 \text{ mg kg}^{-1}$,第二年时,残留浓度降低,注射甲维盐及阿维菌素的松树侧枝内残留浓度最高处分别为 $1.93 \pm 1.4 \text{ mg kg}^{-1}$ 、 $0.71 \pm 0.49 \text{ mg kg}^{-1}$ 以上。

关键词: 松材线虫病; 甲维盐; 阿维菌素; 残留动态

DOI: [10.57237/j.life.2024.02.002](https://doi.org/10.57237/j.life.2024.02.002)

Study on the Detection Technology of Injection Residue in the Trunk of Large (Ancient) Pine

Yu Jia-hao^{1,2,3}, Li Zheng-yang^{1,2,3}, Tang Wan-jiang^{1,2,3}, Dai Chuan-hu^{1,2,3}, Si Feng-ling^{1,2,3}, Yang Shi-zhang⁴, Yan Zhen-tian^{1,2,3}, Chen Bin^{1,2,3,*}

¹College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

²Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

³Chongqing Key Laboratory of Vector Control and Utilization, Chongqing 401331, China

⁴Chongqing Station of Forest Pests Control and Quarantine, Chongqing 408099, China

Abstract: The injection-dry application technique is a proactive technique to prevent Pine wilt disease. The study selected Zhongxian, Banan, Beibei District Jinyun Mountain National Nature Reserve, Wulong, Liangping, Hechuan six

基金项目: 树干注药防控大(古)松树松材线虫病的技术推广与示范(基金号: 渝林推广 [2021-03]).

*通信作者: 陈斌, c_bin@hotmail.com

收稿日期: 2024-03-11; 接受日期: 2024-03-28; 在线出版日期: 2024-04-13

<http://www.lifescitech.org>

districts and counties (units) of the big (ancient) Pine (*Pinus massoniana*) as the research object, the use of injection of dry application method to clarify the prevention of Pine wilt disease by 2.3% Emamectin Benzoate and 5% abamectin, the use of high performance liquid chromatography determination of the injection of dry application of 180d and High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the residue of Emamectin Benzoate in *Pinus sylvestris* after 180d and 360d of dry application. The results showed that Emamectin Benzoate and abamectin injection dry application of six districts and counties (units) of Zhongxian, Banan, Beibei District Jinyun Mountain National Nature Reserve, Wulong, Liangping, Hechuan, large (ancient) Pine wilt disease prevention and control effect is significant, the prevention effect of the consecutive 2a have reached more than 99%; In addition, the establishment of the pony pine in the Emamectin Benzoate and abamectin residue detection method, the side branch in the Emamectin Benzoate and abamectin In addition, a method was established to detect the residues of Emamectin Benzoate and abamectin in *Pinus sylvestris*, and the recoveries of Emamectin Benzoate and abamectin in the lateral branches exceeded 80%, and the analytical methods of Emamectin Benzoate and abamectin met the requirements of residue detection; the highest residue concentrations of Emamectin Benzoate and abamectin in the lateral branches of *Pinus sylvestris* were $2.93 \pm 1.63 \text{ mg kg}^{-1}$ and $2.93 \pm 0.69 \text{ mg kg}^{-1}$, respectively, 180d after injection drying. In the second year, the residue concentrations decreased, and the highest concentrations were more than $1.93 \pm 1.4 \text{ mg kg}^{-1}$ and $0.71 \pm 0.49 \text{ mg kg}^{-1}$ in the lateral branches of pine trees injected with mevinphos and abamectin, respectively.

Keywords: Pine Wilt Disease; Emamectin Benzoate; Abamectin; Residue

1 引言

松材线虫病是由松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 引起的一种国际公认的检疫性疾病, 同时也是一种危险性极高的病原主导性病害[1]。其主要传播途径是通过松墨天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) 等媒介昆虫进行取食和产卵进行自然传播, 其生活史主要在松树和松墨天牛体内完成。由于其传播蔓延速度快, 发病周期短, 防治困难, 目前, 国内外尚未有效的防控手段[2]。国内外学者也称这种病害为松树的“癌症”, 是“无烟的森林火灾” [3]。针对这种病害, 本课题组前期采用 2.5% 甲维盐微乳水乳剂及 5% 阿维菌素乳油剂进行注干施药防治松材线虫病, 效果显著。

甲维盐及阿维菌素在松树体内的含量和残留, 是其发挥功能的重要前提。当前, 甲维盐及阿维菌素在松树体内的分布规律, 尚未有系统研究。本研究测定了甲维盐及阿维菌素注干施药后在马尾松 (*Pinus massoniana*) 体内的残留动态, 分析了注干施药后药剂的分布规律, 旨在为注干施药防治技术的应用提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与药剂

乙腈为色谱纯 (麦克林生化); 甲醇为色谱纯 (麦

克林生化); 甲维盐标准品 (北京索莱宝科技); 阿维菌素标准品 (北京索莱宝科技); 氨水为分析纯; 丙酮溶液 (重庆川东化工); 高效液相色谱仪 (赛默飞世尔科技); 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器); 超声波清洗仪 (昆山洁力美超声仪器); 低速离心机 (四川蜀科仪器); 氮吹仪 (武汉恒信仪器); 烘箱 (北京科伟永兴仪器); 滴定泵 (保定雷弗流体科技); 粉碎机; 固相萃取柱 C18 (泰州市康之达实验器材); 称量纸; 药匙; 牛皮纸托盘; 过滤筛网; 电子天平; $0.45 \mu\text{m}$ 有机滤膜; $0.22 \mu\text{m}$ 有机滤膜; 锥形瓶; 组培封口膜; 电枝剪, 电锯; 斧头; 样品袋; 标签纸; 记号笔; 烧杯; 量筒。

2.2 林间注干施药试验

2.2.1 实验地点

研究地点设置在重庆市忠县、巴南、北碚区缙云山国家级自然保护区、武隆、梁平、合川六个区县(单位)共有大(古)松树 2565 株, 树高平均在 20m 左右, 胸径在 50cm 左右。

2.2.2 注干施药实验

以每瓶 100 毫升 2.3% 甲维盐为标准, 根据树干胸

径按计算施药量:

胸径 (cm)	≤ 30	31-40	41-50	51-60	≥ 61
用药量	1 瓶	2 瓶	4 瓶	6 瓶	≥ 8 瓶

具体使用方法如下:

第一步: 在距离松树基部 40-50cm 处, 用钻孔器斜向下与垂直方向成 45° 角, 钻直径 5-7mm、深 50-100mm 的孔眼。

第二步: 撕开药瓶塑封口, 装上输液嘴, 用刀片斜切注药嘴, 用大头针扎透气盲孔, 再将注药嘴插入打好的孔眼中将已安装在树干上的注干剂用大头针开一孔眼, 保证瓶内液体能缓缓流出。

第三步: 填写好注药标识牌并钉在树干上记录注药地点及经纬度信息及注药时间等。

第四步: 待药剂瓶内药剂完全留完后拔出药剂瓶, 并用橡皮泥堵上其注药孔。

2.3 甲维盐及阿维菌素在松树体内的含量测定

2.3.1 样品采集

1) 取样原则

对已注射 2.5% 甲维盐微乳水乳剂、5% 阿维菌素乳油剂且临近疫点或疫点小班 3 公里范围的大(古)松树进行取样。

2) 取样范围及数量

本次对忠县、巴南、北碚区缙云山国家级自然保护区、武隆、梁平、合川六个区县(单位)的注药大(古)松树开展取样和检测; 样本以株为单位; 对注射甲维盐微乳水乳剂、阿维菌素乳油的大古松树各取 50 株, 每个地区各取一株未注药样本做为对照样本。

3) 取样部位及数量

在样株树冠中上部不同方位使用电锯分别剪取东南西北四个方位, 长 2m 大树枝各一条, 样品为嫩枝梢(带针叶); 用电枝剪截为长度为 15cm 的树段; 每株样品量大于 500 克。通过自然阴干或烘箱烘干备用。

2.3.2 样品提取与净化

使用粉碎机将枝条粉碎过 30 目筛网, 准确称取 10.0g 于 500mL 三角瓶中, 加入 100mL 丙酮/水 (6:4, V/V), 浸泡 1h 后于高频超声波振荡提取 3h, 抽滤, 用 40mL 丙酮/水 (6:4, V/V) 淋洗残渣, 重复淋洗 3

次, 合并滤液转入 500mL 旋转瓶中。利用旋转蒸发仪减压浓缩至干, 用 10mL 甲醇/水 (7:3, V/V) 溶解转出, 0.45μm 滤膜过滤, 待净化。

净化采用 C18-SPE 柱。依次用 5mL 甲醇、水、甲醇/水 (7:3, V/V) 活化和平衡小柱。取 2.5mL 提取液转入柱中上样, 然后用 10mL 甲醇/水 (7:3, V/V) 分数次淋洗, 最后用 5mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液后用氮吹仪浓缩 2.5mL, 供 HPLC 检测。上样和淋洗、洗脱过程中流速不超过 1mL/min。

2.3.3 样品检测

C18 色谱柱 (4.6mm×250mm, 5μm); 检测波长 245nm; 流动相为 V(乙腈):V(甲醇):V(氨水)=50:35:15; 流速: 1mL/min; 进样量 20μL; 柱温 25 °C。

2.3.4 标准曲线的绘制

用甲醇配制 500 mg/L 的甲维盐及阿维菌素标准品母液, 再将其稀释成质量浓度为 2、5、10、25、50mg/L 的一系列标准工作溶液, 按 2.3.3 条件进行测定。以质量浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

2.3.5 添加回收率

在空白木屑中添加一定量的甲维盐标及阿维菌素准品, 添加水平分别为 0.1、1、5、50mg/L, 每个浓度 3 个重复, 按 2.3.2 方法对样品进行提取、净化, 测定回收率。

2.4 统计分析

所有数据采用 SPSS 软件进行统计分析

3 结果

3.1 林间注干施药防治效果

注干施用甲维盐及阿维菌素后, 试验区松材线虫病发生调查结果(见表 1)。由表 1 表明, 甲维盐及阿维菌素注干施药对马尾松松林的松材线虫病防治效果显著。2021 年 10 月, 注干处理区有松树死亡, 预防效果达到 99.81%。2022 年 10 月, 马尾松松林试验区, 注干施药处理预防效果保持 99.5%。2021 年和 2022 年, 松树死亡率分别达到 0.19% 和 0.5%。所有死亡松树体内, 都未分离出松材线虫, 判断为自然死亡松树。

表 1 注干施药对松材线虫病的预防效果

Table 1 Effect of trunk injection on Pine wilt disease

调查时间(年.月)	死亡率/%	预防效果/%
2021.10	0.19%	99.81%
2022.10	0.5%	99.5%

3.2 甲维盐及阿维菌素标准曲线及添加回收率

甲维盐及阿维菌素标准样品检测标准曲线(见图1、图2)。在2~50.0mg L⁻¹浓度范围内,甲维盐及阿维菌素质量浓度与HPLC峰面积呈良好的线性关系,得出回归方程分别为 $y=0.4157x-0.2151$ 、 $y=0.5764x-0.7471$,相关系数R²分别为0.9979、0.9978。采用净化小柱进行纯化后,添加回收试验结果(见表2、表3)。由表2、表3表明,在0.1~50.0mg L⁻¹个添加水平下,甲维盐及阿维菌素在松树枝内的回收率分别在92.66%~100.16%、87.76%~104.45%,相对标准偏差分别在3.92%~7.17%、4.57%~7.79%。方法的准确度和精密度符合农药残留分析检测,说明此方法可用于甲维盐及阿维菌素在松树体内的含量检测。

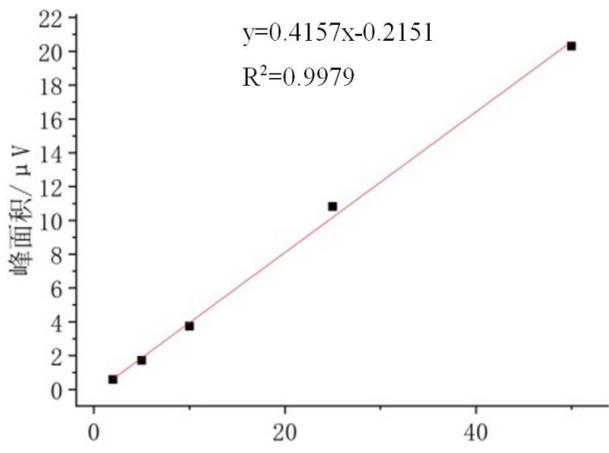


图 1 甲维盐标准曲线

Figure 1 Standard curve of Emamectin Benzoate

表 2 甲维盐添加回收率

Table 2 Recovery rate of Emamectin Benzoate

添加水平/(mg/L ⁻¹)	回收率/%
0.1	92.66±3.92
1	90.24±7.17
5	92.58±5.04
50	100.16±4.16

表 3 阿维菌素添加回收率

Table 3 Recovery rate of abamectin

添加水平/(mg/L ⁻¹)	回收率/%
0.1	87.76±7.79
1	91.69±4.57
5	90.10±5.20
50	104.45±7.04

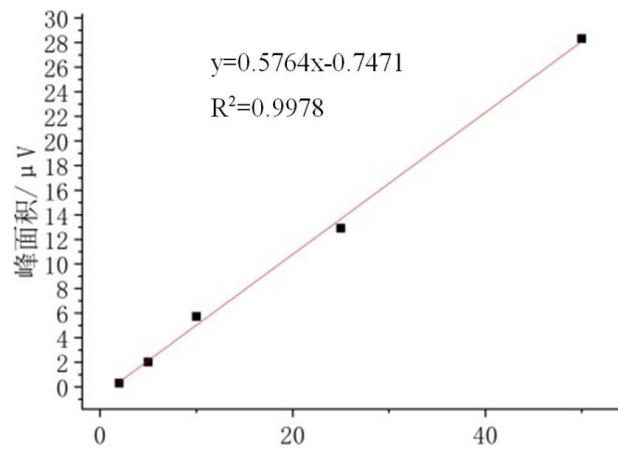


图 2 阿维菌素标准曲线

Figure 2 Standard curve of abamectin

3.3 注干施药后甲维盐及阿维菌素在马尾松体内的分布动态

采用HPLC方法,测定了注药后不同时间甲维盐及阿维菌素在树体内的残留量(见表4),在注干施药半年后,甲维盐及阿维菌素在松树体内维持着较高的残留浓度,忠县 $2.93\pm1.63\text{mg kg}^{-1}$ 、巴南区 $1.2\pm0.46\text{mg kg}^{-1}$ 、北碚区缙云山国家级自然保护区 $1.83\pm1.07\text{mg kg}^{-1}$ 、武隆区 $2.02\pm1.75\text{mg kg}^{-1}$ 、梁平区 $2.04\pm0.7\text{mg kg}^{-1}$ 、合川区 $2.93\pm0.69\text{mg kg}^{-1}$;其中忠县和合川的残留浓度相比其他几个区县松树体内残留浓度较高,最低为巴南区残留浓度。空白对照松树主干、枝和针叶组织内均未检测到甲维盐及阿维菌素残留物。注干施药翌年,松树体内仍有甲维盐及阿维菌素残留,和注药后半年相比,残留浓度均有降低。甲维盐及阿维菌素浓度随着注射时间的延长逐渐下降,忠县 $1.93\pm1.4\text{mg kg}^{-1}$ 、巴南区 $0.42\pm0.3\text{mg kg}^{-1}$ 、北碚区缙云山国家级自然保护区 $0.76\pm0.73\text{mg kg}^{-1}$ 、武隆区 $1.04\pm1.03\text{mg kg}^{-1}$ 、梁平区 $0.71\pm0.49\text{mg kg}^{-1}$ 、合川区 $0.69\pm0.19\text{mg kg}^{-1}$;与注药半年后相比药物残留浓度最低的是梁平区和合川区。

表 4 注干施药后松树体内残留浓度

Table 4 Residual concentration of *Pinus massoniana* after trunk injection

取样地点	处理	取样位置	残留浓度/ (mg/kg ⁻¹)	
			180d	360d
忠县	注干施药	距离分枝处 10m	2.93±1.63	1.93±1.4
巴南区		距离分枝处 10m	1.2±0.46	0.42±0.3
北碚区缙云山国家级自然保护区		距离分枝处 10m	1.83±1.07	0.76±0.73
武隆		距离分枝处 10m	2.02±1.75	1.04±1.03
梁平区		距离分枝处 10m	2.04±0.7	0.71±0.49
合川		距离分枝处 10m	2.93±0.69	0.69±0.19
	空白对照	主干、侧枝、针叶	-	-

4 讨论

注干施药技术在国内外防治松材线虫病中得到了成功地应用[4-9]，但甲维盐及阿维菌素注干施药后的残留分布动态尚未有系统研究。研究结果为甲维盐及阿维菌素注干施药防治松材线虫病提供了理论基础。甲维盐及阿维菌素残留含量测定主要包括样品前处理和含量测定两个环节[11]。农药残留测定，通常采用液相色谱-荧光法、柱前衍生-高效液相色谱法等[12-16]，检测灵敏度均较高。样品的前处理方式往往是影响农药残留含量测定的主要因素。松树为松材线虫易感树种[7]。本研究结果不仅进一步夯实了松材线虫病主动预防与综合防控工作的理论基石，为我们提供了更加明确和有效的防控策略，更通过深入分析揭示了药剂在松树体内的衰退规律及其对生态系统影响的关键线索，为未来的研究和实践提供了宝贵的参考。下一步，我们将进一步针对药剂种类、松树品种以及地理气候条件等因素如何影响药剂的残留分布及防控效果开展研究。

5 结论

本研究以马尾松为研究对象，跟踪测定了甲维盐及阿维菌素注干施药后对松材线虫病的防治效果及在松树体内的残留动态分布。甲维盐及阿维菌素注干施药后马尾松在 2 年内免受松材线虫的侵染，具有显著的防治效果，与潘伟华、孙薇等在松树上的试验效果一致[6, 10]。甲维盐及阿维菌素注干后，在侧枝以及松针组织内检测得到较高浓度的残留，并在 2a 内维持残留药效。本研究在忠县、巴南、北碚区缙云山国家级自然保护区、武隆、梁平、合川六个区县（单位）开

展了注干施药后甲维盐及阿维菌素残留动态的分析，结果发现，在注干施药半年后，甲维盐及阿维菌素在松树体内维持着较高残留浓度，注射阿维菌素的松树残留浓度高于注射甲维盐的松树残留浓度。注干施药后第二年，甲维盐及阿维菌素在枝干中的含量明显下降，但依然维持高于松材线虫致死中浓度[6, 10]，进一步解释了在注干施药第二年，试验区松林的松材线虫预防效果保持 99% 以上。

参考文献

- [1] 赵正萍, 夏永刚, 张敏等. 5% 依维菌素微乳剂注干预防松材线虫病效果评价 [J]. 湖南林业科技, 2023, 50(05): 94-98.
- [2] 王曦苗, 曹业凡, 汪来发等. 松材线虫病发生及防控现状 [J]. 环境昆虫学报, 2018, 40(02): 256-267.
- [3] 刘维志. 植物病原线虫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [4] TAKAI K, SUZUKIT, KAWAZU K. Development and preventative effect against pine wilt disease of a novel liquid formulation of emamectin benzoate [J]. Pest Manag Sci, 2003, 59(3): 365-370.
- [5] 叶建仁. 松材线虫病在中国的流行现状、防治技术与对策分析 [J]. 林业科学, 2019, 55(9): 1-10.
- [6] 潘伟华, 吴继来, 贾进伟, 等. 甲维盐注干施用对松材线虫病的防治效果分析 [J]. 中国森林病虫, 2014, 33(6): 41-44.
- [7] 潘少杰. 松材线虫病生物防治技术研究进展 [J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2023, 47(4): 92-99.
- [8] 王勇军, 唐光辉, 陈祖海等. 树干注药防治松材线虫病研究进展 [J]. 中国森林病虫, 2022, 41(3): 59-63.
- [9] 唐光辉, 陈安良, 冯俊涛等. 树干注药技术研究进展 [J]. 西北林学院学报, 2006, (4): 117-120.

- [10] 孙薇, 张立华, 王勇军等. 注干施药后黄山松体内甲维盐含量检测及残留动态分析 [J]. 浙江林业科技, 2022, 42(4): 83-87.
- [11] 汪志威, 周思齐, 李非里, 等. 实验室农药残留检测的测量不确定度评定——以 GB 23200.8-2016 测定草莓中 4 种农药残留为例 [J]. 农药学学报, 2020, 22(1): 105-114.
- [12] 王圣印, 周仙红, 张安盛, 等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐研究进展 [J]. 江西农业学报, 2012, 24(12): 123-126.
- [13] 赵莉, 谢显传, 占绣萍, 高效液相色谱-荧光法同时检测蔬菜中阿维菌素、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐和伊维菌素的多残留量 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3467-3472.
- [14] 王立君, 杨挺, 赵健, 等. 柱前衍生-高效液相色谱法测定蔬菜中甲氨基阿维菌素的残留[J]. 现代农药, 2007, 6(5): 32-34.
- [15] 王小丽, 王素利, 陈振山, 等. 黄瓜及其栽培土壤中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的残留动态研究 [J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(S1): 307-310.
- [16] R. Fernández-Escobar, Barranco Diego, Manuel Benlloch. Overcoming Iron Chlorosis in Olive and Peach Trees Using a Low-pressure Trunk-injection Method [J]. HortScience. 1993, 28(3): 192-194.