

# 镧素对镰刀菌 *Fusarium solani* 及其致病酶的影响

慕康国<sup>1</sup>, 张文吉<sup>2</sup>, 胡林<sup>1\*</sup>, 张福锁<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学 资源与环境学院, 北京 100094; 2. 中国农业大学 应用化学系, 北京 100094)

**摘要:** 采用琼脂平板生长速率法及液体培养基培养测定了La对镰刀菌 *Fusarium solani* 的抑制作用和毒力, 并测定了其对病菌胞外的果胶酶、蛋白酶和纤维素酶等几种致病酶活性的影响。结果表明, 随着La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>浓度升高, 对病菌菌丝生长的抑制作用增强, 对病菌的EC<sub>50</sub>和EC<sub>95</sub>分别为278.2和552.0 mg/L; 在一定浓度范围内, La提高了单位量菌丝所产生3种致病酶的活性, 但由于菌丝生长受到抑制, 除蛋白酶外, 病菌胞外致病酶果胶酶和纤维素酶的总量或总活性受到了抑制, 降低了病菌的致病力。

**关键词:** 稀土; 氧化镧(La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>); 镰刀菌; 毒力; 致病酶活性

**中图分类号:** S432.26; S432.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2002)04-0056-05

我国从20世纪70年代以来, 通过深入的试验研究与反复的生产实践, 解决了一系列技术关键, 成功地将稀土元素应用于农业, 成为世界上第一个把稀土元素作为一种商业性产品应用于农业生产的国家, 产生了可观的经济与社会效益, 为我国极其丰富的稀土资源的开发利用开拓了一个崭新的领域<sup>[1,2]</sup>。经过几十年的推广发展, 稀土元素在农业上的应用越来越广泛, 涉及粮食作物、蔬菜和畜牧生产。但是, 稀土元素在农业上应用的有关研究主要集中在植物生理活性、生理生化机制及稀土元素的卫生毒理学和环境安全性方面, 对其在防治植物病害方面、对植物病原微生物作用方面的研究较少<sup>[3-7]</sup>。镰刀菌 *Fusarium solani* 是土壤寄生菌, 全世界分布广泛, 寄主范围广, 可导致多种作物的种腐、猝倒和苗腐, 危害很大。因此研究稀土元素对镰刀菌的毒力及其对致病酶活性的影响, 对于进一步研究利用稀土防治其引起的多种土传病害, 拓宽稀土元素农业应用范围等具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试病菌及药剂

镰刀菌 *Fusarium solani* (中国农业大学应用化学系提供)。氧化镧(La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 化学试剂, 纯度99.99% (上海跃龙化工厂)。

### 1.2 10 g/L La 素母液的配制

准确称取纯度为质量分数99.99%的La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>试剂1.0 g于小烧杯中, 加入2 mL浓硝酸(分析纯)溶解, 用去离子水转移至100 mL容量瓶中, 定容即配制成浓度为10 g/L的La素母液(文中La素浓度均以La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>的浓度计)。

### 1.3 培养基的配制

固体培养基: 马铃薯200 g, 琼脂20 g, 葡萄糖20 g, 水1000 mL, 参照方中达的方法<sup>[8]</sup>制

作者简介: 慕康国(1970-), 男, 山东龙口人, 硕士, 讲师, 主要从事植物保护、农药学及农药与肥料相互作用等方面的研究

基金项目: 北京市自然科学基金重点项目(6001001); 中美合作草坪养护管理研究项目(美国俄勒冈种子理事会OSCMAP资助)。

作,分装后在 121 °C 高温高压灭菌 20 min,备用。

液体培养基:除不加琼脂外,制备方法同固体培养基。

#### 1.4 毒力测定方法

将La素母液加灭菌水稀释成系列浓度,各取 1 mL 分别加入灭菌后热熔的 9 mL 固体培养基中,充分摇匀后倒入直径为 8.5 cm 的灭菌培养皿中形成不同浓度的带毒培养基平面,调节经各La素处理的带毒培养基与空白的pH 相同。后挑取新鲜、生长一致的 *Fusarium solani* 菌块(∅= 0.4 cm)接种到固体平板中央,每个处理设 3 次重复,以不加La素溶液为空白对照,25 °C 黑暗条件下培养 4 d,测定菌落直径。按如下公式计算不同浓度的LaO<sub>3</sub> 对病菌生长的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{空白对照的菌落直径}/\text{cm} - \text{药剂处理的菌落直径}/\text{cm}}{\text{空白对照的菌落直径}/\text{cm} - \text{接种菌块直径}/\text{cm}} \times 100\%$$

查机率值换算表<sup>[8]</sup>,将在 10% ~ 90% 范围内的 5 个浓度处理的生长抑制率换算成抑制机率值,以浓度对数为横坐标,抑制机率为纵坐标,用Microsoft 的Excel 软件处理,作回归直线,求出回归方程和有效中浓度 EC<sub>50</sub>及 EC<sub>95</sub>。

#### 1.5 生长量测定方法

挑取新鲜、生长一致的待试菌块(∅= 0.4 cm)接种到 30 mL 的液体培养基中,每个处理设 3 次重复。25 °C 振荡培养 4 d,形成菌落。用滤纸过滤,干燥后测定菌落干重并进行比较。滤液放置于 4 °C 冰箱中保存,进行酶活性的测定。

#### 1.6 致病酶活性的测定

1.6.1 果胶酶活性的测定 参照文献[9~ 11]方法测定。取质量浓度 1% 果胶溶液 10 mL,蒸馏水 5 mL,迅速加入待测滤液 5 mL,50 °C 下恒温培养 2 h。沸水煮沸 3 min,经滴定后,以每毫升滤液在 50 °C 下每小时催化分解果胶生成 1 mmol 半乳糖醛酸的酶量为一个酶活性单位(OD<sub>620</sub>= 0.1)。

1.6.2 蛋白酶活性的测定 按改良 Tseng<sup>[12]</sup>方法,取 0.5 mL 培养液,加入 0.5 mL 质量浓度为 0.5% 的明胶溶液,0.1 mol/L 巴比妥钠-盐酸缓冲液(pH= 8.0);30 °C 下保温 30 min,加入 3.0 mL 10% 的三氯乙酸终止反应,离心后测定上清液的 OD<sub>280</sub> 值。以每分钟增加 0.001 光密度为一个活性单位,换算成单位病菌(OD<sub>620</sub>= 1)的酶活性后进行比较。

1.6.3 纤维素酶活性的测定 参照文献[10]测定。以每分钟增加 0.001 光密度为一个活性单位,换算成病原菌(OD<sub>550</sub>= 0.01)的酶的活性后进行比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 La 对镰刀菌生长的影响

2.1.1 固体培养基上La对镰刀菌的抑制作用及毒力 表1是在 25 °C、黑暗条件下培养 4 d 后所测定镰刀菌菌落的直径大小。经方差分析表明,不同浓度的La处理形成的菌落直径存在着极显著的差异( $F = 105.92 > F_{0.01} = 3.71$ )。从该结果可以看出,La在低浓度下对镰刀菌无抑制作用,相反还有促进作用;浓度超过 150 mg/L 才开始表现出抑制作用,随着LaO<sub>3</sub>浓度的进一步提高,镰刀菌菌落的直径减小,表明抑制作用增强,当LaO<sub>3</sub>浓度在 300 mg/L 以上时,对病菌生长的抑制率开始超过 50%。将表1中La浓度从 200~ 400 mg/L 处理其相应的抑制率换算成机率值,以浓度对数为横坐标,抑制机率值为纵坐标,进行线性回归,并求出回归方程为  $y = 5.5261x - 8.5074 (R^2 = 0.9535)$ ,进一步计算出La对镰刀菌的 EC<sub>50</sub>为 278.2 mg/L,

EC<sub>95</sub>为 552.0 mg/L。

Table 1 Effect of La on the growth of *Fusarium solani* in solid medium

Concentration of La <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /mg · L <sup>-1</sup>	Colony diameter /cm			Average colony diameter/cm	Inhibiting rate (%)
0	3.60	3.60	3.90	3.70 <sup>A</sup>	-
50	3.95	3.75	3.70	3.80 <sup>A</sup>	-2.7
100	4.05	3.40	3.65	3.70 <sup>A</sup>	0
150	3.30	3.25	3.50	3.35 <sup>B</sup>	10.5
200	2.85	2.80	2.85	2.83 <sup>C</sup>	26.4
250	2.60	2.65	2.65	2.63 <sup>C</sup>	32.4
300	1.90	1.55	2.20	1.88 <sup>D</sup>	53.5
350	1.25	1.20	1.30	1.25 <sup>E</sup>	74.2
400	0.75	0.95	1.05	0.92 <sup>F</sup>	81.9

Note: The different letters in column means the difference is significant at  $p < 0.05$ . The same as in the following table.

2.1.2 液体培养基上La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对镰刀菌的抑制作用 表2中所列结果是含不同浓度La的液体培养基中所收获的菌丝量,经方差分析表明,不同浓度的La处理间差异达到显著水平( $F = 18.1 > F_{0.01} = 5.99$ )。在试验所设计浓度范围内,各处理对镰刀菌都有明显的抑制作用,且随着La浓度的升高抑制作用增强。同样,将表2中La浓度从200~350 mg/L处理其相应的生长抑制率换算成机率值,以浓度对数为横坐标,抑制机率值为纵坐标进行线性回归,并求出回归方程为 $y = 4.9365x - 7.1792$  ( $R^2 = 0.9579$ ),进一步计算出La对镰刀菌的EC<sub>50</sub>和EC<sub>95</sub>分别为293.2和631.0 mg/L,其对镰刀菌的抑制作用同固体培养基上的结果是基本一致的。

Table 2 Effect of La on biomass of *Fusarium solani* in liquid culture

Concentration of La <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /mg · L <sup>-1</sup>	Mycelium dry weight /g			Average weight /g	Inhibiting rate (%)
0	0.1590	0.1969	0.2279	0.1946 <sup>A</sup>	-
200	0.1530	0.1239	0.1747	0.1505 <sup>B</sup>	22.7
250	0.1223	0.1201	0.1420	0.1281 <sup>BC</sup>	34.2
300	0.1025	0.1128	0.0924	0.1026 <sup>BC</sup>	47.3
350	0.0626	0.0585	0.0611	0.0607 <sup>C</sup>	68.8

## 2.2 La对镰刀菌致病酶活性的影响

2.2.1 La对镰刀菌果胶酶活性的影响 图1是不同浓度的La处理对镰刀菌胞外果胶酶总酶活性的影响。从中可以看出,在La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>浓度低于200 mg/L时,镰刀菌胞外果胶酶总酶的活性同空白对照略有增加,浓度超过200 mg/L后,果胶酶的总酶活性急剧下降,表现出明显的抑制作用。

图2中的结果表明,La对单位菌丝胞外果胶酶的活性有显著的促进作用,随着浓度的升高,促进作用也增强。结合图2结果可以看出,尽管La对单位菌丝胞外果胶酶的活性促进作用明显,但La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>浓度超过200 mg/L后,由于其对菌丝生长的显著抑制作用,其对果胶酶总酶活性的作用仍是抑制的。

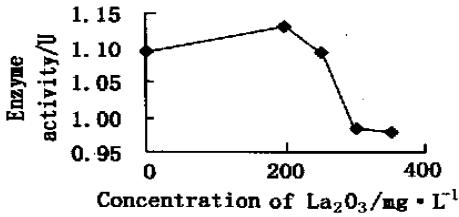


Fig 1 Effect of La on total pectinase activity of *F. solani*

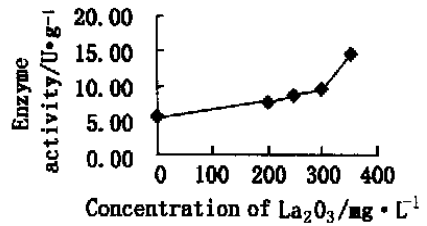


Fig 2 Effect of La on pectinase activity of per gram mycelium of *F. solani*

2.2.2  $La_2O_3$  对镰刀菌胞外蛋白酶活性的影响 从图 3 和图 4 的结果可以看出,  $La_2O_3$  浓度在  $200\text{ mg/L}$  范围内时, 镰刀菌胞外蛋白酶活性无论是总酶的活性还是单位菌丝量所产生酶活性同对照比都有所下降, 其中蛋白酶总酶活性降低明显。当  $La_2O_3$  浓度超过  $200\text{ mg/L}$  后, 其对单位菌丝的胞外蛋白酶活性有明显的促进作用, 随着浓度的升高, 胞外蛋白酶的活性增加; 对蛋白酶总酶活性的作用也表现出同样的趋势。

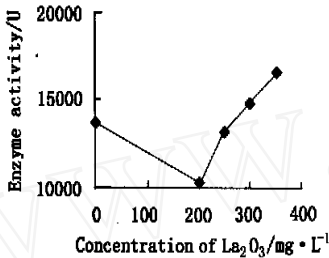


Fig 3 Effect of La on total protease activity of *F. solani*

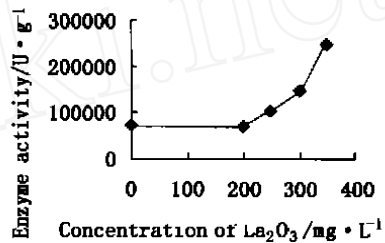


Fig 4 Effect of La on protease activity of per gram mycelium of *F. solani*

2.2.3  $La_2O_3$  对镰刀菌胞外纤维素酶活性的影响 图 5 是不同浓度的  $La_2O_3$  处理对镰刀菌胞外纤维素酶总酶活性的影响。可以看出, 镰刀菌胞外纤维素酶的活性随  $La_2O_3$  浓度的升高而增加, 在  $La_2O_3$  浓度为  $300\text{ mg/L}$  时, 胞外纤维素酶总酶活性达到最大。随后随着浓度进一步增加, 纤维素酶总酶活性逐渐下降, 但仍远高于空白对照。图 6 结果表明,  $La_2O_3$  处理对单位量菌丝所产生的纤维素酶的活性有明显的促进作用, 而且随  $La_2O_3$  浓度的提高, 促进作用增强。

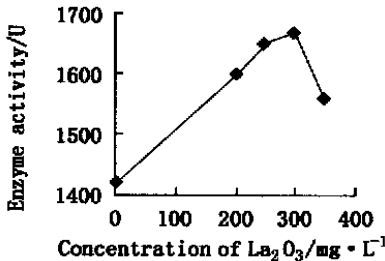


Fig 5 Effect of La on total cellulase activity of *F. solani*

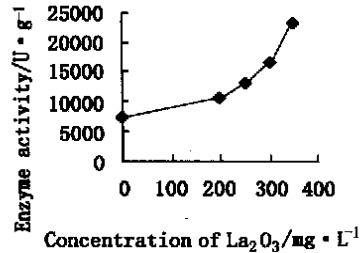


Fig 6 Effect of La on cellulase activity of per gram mycelium of *F. solani*

### 3 结论与讨论

本研究结果表明,  $La_2O_3$  对镰刀菌的生长在低浓度时有促进作用, 而在高浓度时有明显的抑制作用。其对镰刀菌的  $EC_{50}$  和  $EC_{95}$  分别为  $278.2$  和  $552.0\text{ mg/L}$ 。在低浓度时的促进生长作

用,因试验设计的低浓度处理较少还难以看出剂量与生长量的关系,还有待于进一步的研究。

果胶酶、蛋白酶和纤维素酶是病原菌的主要致病酶,其活性的高低直接影响病原菌的致病力。从单位菌丝量所产生3种酶的活性来看,在试验所设计的浓度范围内, $\text{La}_2\text{O}_3$ 均提高了它们的活性;但由于高浓度的 $\text{La}_2\text{O}_3$ 能强烈抑制菌丝的生长,从而影响胞外酶的总产量。从镰刀菌所产生的胞外酶的总酶活性来看, $\text{La}_2\text{O}_3$ 的浓度在超过 $250\text{ mg/L}$ 后,胞外果胶酶的总酶活性是受到抑制的,明显低于空白对照,从而减少了病原菌的致病力。

尽管室内毒力测定结果说明,在 $200\sim 500\text{ mg/L}$ 的浓度范围内, $\text{La}_2\text{O}_3$ 对镰刀菌即有很强的抑制作用,但能否控制其所引起的植物病害,还有待于进一步深入进行盆栽和田间试验。

## 参考文献:

- [1] 熊炳昆,陈蓬. 稀土农林研究与应用 [M]. 北京:冶金工业出版社,2000
- [2] 解惠光. 中国稀土元素在农业上的应用研究进展 [J]. 科学通报,1991,8:561-564
- [3] 章健,刘庆都,承河元,等. 稀土积累对植物病原细菌生长的影响 [J]. 稀土,1997,18(4):50-53
- [4] 章健,刘庆都. 稀土元素对棒形杆菌生长和胞外酶活性的影响 [J]. 安徽农业大学学报,1998,25(1):81-84
- [5] 章健,刘庆都,承河元,等. 镧对青枯假单胞菌生长及若干生化性状的影响 [J]. 稀土,1999,20(1):75-78
- [6] 刘庆都,章健,承河元,等. 镧对软腐欧文氏菌生长及其胞外酶活性的影响 [J]. 中国稀土学报,1998,16(3):262-266
- [7] 章健,承河元. 稀土元素对油菜菌核病生长及其生化性状影响的研究 [J]. 应用生态学报,2000,11(3):382-384
- [8] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京:农业出版社,1998
- [9] 中山大学生物生化微生物学教研室. 生化技术导论 [M]. 广州:中山大学出版社,1978
- [10] 蒋传葵,金承德,吴仁龙,等. 工具酶的活力测定 [M]. 上海:上海科技出版社,1982
- [11] Marcus L, Barash I, Sneha B, et al. Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1986,29:325-336
- [12] Tseng T C, Mount M S. Toxicity of endopolysaccharuronate, phosphatidase and protease to potato and cucumber tissue [J]. *Phytopathol*, 1974,64(2):229

## Toxicity and Effect of Lanthanum on *Fusarium solani*

MU Kang-guo<sup>1</sup>, ZHANG Wen-ji<sup>2</sup>, HU Lin<sup>1\*</sup>, ZHANG Fu-suo<sup>1</sup>

(1. College of Resource and Environment Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China;  
2. Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The inhibition and the toxicity of lanthanum on the growth of *Fusarium solani* were studied, and the effect of lanthanum on three disease-related enzymes were researched too. The results showed that lanthanum inhibit the growth of *Fusarium solani* strongly, its  $\text{EC}_{50}$  and  $\text{EC}_{95}$  were  $278.2$  and  $552.0\text{ mg/L}$  respectively. Lanthanum also gives some effect on the disease-related enzyme of pathogen, it promote the activity of these enzymes such as pectinase, protease and cellulase, but for the strong inhibition of the growth of mycelium, the quantity or the activity of the total enzymes of pectinase was decreased significantly.

**Key words:** rare earth; lanthanum; *Fusarium solani*; toxicity; enzyme activity