



寡雄腐霉发酵液的动物安全性及其对黄瓜的防病促生效应

耿明明, 贾瑞莲, 隋宗明, 黄建国*

西南大学资源环境学院, 重庆 400716

摘要: 【目的】生物农药安全无害, 环境友好。为了评价寡雄腐霉发酵液(*Pythium oligandrum* broth, POB)的动物安全性和防病促生效应, 研制高效、无害的生物农药。【方法】试验利用自主分离的寡雄腐霉生防菌株(*P. oligandrum* CQ2010)制备POB, 通过动物试验、拮抗试验、盆栽和生产试验, 研究了POB的动物毒性, 对黄瓜蔓枯病的防治作用, 以及对黄瓜生长、产量和品质的影响。【结果】用大剂量的POB灌胃给药对小鼠体重增长无显著影响, 其外观和行为均无异常, 组织器官也未见病理改变。POB对甜瓜球腔菌的抑制率为51.95%, 药效介于1:800的百菌清溶液和1:200的甲基托布津溶液之间。在黄瓜幼苗接种甜瓜球腔菌前后喷施POB, 叶片丙二醛含量下降, 过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性增强, 发病率和病情指数均显著降低, 相对防治效果达到54.8%–64.1%, 故POB能减轻病原菌对细胞膜的伤害, 激发防御性生理反应, 增强黄瓜植株的抗病能力。此外, POB处理提高叶绿素含量, 增强根系活力, 增加植株氮、磷、钾吸收量, 促进黄瓜植株生长, 生物量和果实产量分别提高81.10%和11.58%。POB还使黄瓜果实Vc和可溶性糖提高, 硝酸盐含量降低。【结论】寡雄腐霉发酵液对动物安全无毒, 能有效防治黄瓜蔓枯病, 促进黄瓜生长, 提高产量品质。

关键词: 寡雄腐霉, 黄瓜, 蔓枯病, 生长

甜瓜球腔菌(*Mycosphaerella melonis*)属子囊菌亚门, 通过气流和雨水以子囊孢子或分生孢子形式传播, 经伤口或茎节侵入黄瓜植株体内, 引起黄瓜蔓枯病。感病后的黄瓜藤蔓枯死, 病茎干缩, 是一种发病率高, 危害严重的土传病害, 可造成30%以上的产量损失^[1]。目前, 人们主要采用化学农药预防和治疗黄瓜蔓枯病, 但农药残留影

响农产品安全, 危害人体健康, 污染环境^[2]。研究黄瓜蔓枯病生物防治技术有益于提高果实的安全性, 减少化学农药造成的环境风险。

寡雄腐霉(*Pythium oligandrum*)属卵菌门(Heterokontophyta)腐霉科(Pythiaceae)腐霉属(*Pythium*), 其菌丝可寄生于病原菌体内, 干扰寄主的代谢活动, 消耗细胞内的养分, 造成病菌死

基金项目: 重庆市科委重点项目(cstc2013yykfB80011); 四川省凉山州烟草公司科技攻关项目(2012-12)

*通信作者。Tel: +86-23-68251249; Fax: +86-23-68250444; E-mail: huang99@swu.edu.cn

收稿日期: 2015-10-13; 修回日期: 2015-12-04; 网络出版日期: 2015-12-16

亡^[3]。此外,真菌细胞壁的主要成分为多糖,其次为蛋白质和类脂。其中,低等真菌的细胞壁含大量的纤维素,酵母菌以葡聚糖为主,而高等真菌则多为几丁质^[4]。寡雄腐霉能分泌纤维素酶、蛋白酶、几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶等多种酶类,水解真菌细胞壁^[5]。离体培养发现,寡雄腐霉能分泌寡雄蛋白和小分子抗菌物质,抑制病原真菌的生长繁殖,激发植物拮抗病菌的防御性反应,消除病菌破坏产生的游离氧,如诱导合成植保素(phytoalexin)及病程相关性蛋白质(pathogenesis-related proteins),提高过氧化物酶、多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶等抗氧化酶活性^[6]。寡雄腐霉还能合成色胺、色氨酸、吲哚乙酸等生长活性物质,促进植物生理代谢、养分吸收和生长发育^[7]。目前,国外已研制出寡雄腐霉孢子制剂,用于防治作物真菌病害。但是,活体菌剂的生防效果常受温度、光照、湿度、农艺措施等环境和人为因素的影响,稳定性欠佳^[8]。研究表明,寡雄腐霉CQ2010菌株分泌的次生代谢产物能促进烤烟、番茄等作物的生长发育,并能有效防治灰霉病和黑胫病等真菌病害,其效果优于孢子制剂^[9-10]。此外,利用寡雄腐霉CQ2010菌株制备的发酵液对意大利青霉(*Penicillium italicum*)和指状青霉(*Penicillium digitatum*)具有抑制作用,可降低它们引起的柑橘烂果,其防腐保鲜效果也优于寡雄腐霉孢子^[11]。利用寡雄腐霉优良菌株进行工业化液体发酵可方便、经济、大规模生产寡雄腐霉的次生代谢产物,减少人为和环境干扰,提高防效。寡雄腐霉CQ2010菌株具有繁殖生长快,活性较强,易于大规模制备发酵液等优点,并在番茄、烤烟等作物上进行了前期研究。为此,我们以自主分离的寡雄腐霉CQ2010菌株制备发酵液,以捷克进口的“多利维生”寡雄腐霉孢子制剂为对照,通过动物试验、拮抗试验、盆栽和生产试

验,研究了CQ2010发酵液对甜瓜球腔菌的拮抗作用,黄瓜蔓枯病的防治效果,以及对黄瓜植株生长、产量和品质的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物:清洁级昆明小鼠,饲养于重庆市中药研究院实验动物研究所。

1.1.2 供试黄瓜:二早子,购于重庆市北碚区种子分公司。

1.1.3 供试农药:百菌清(Chlorothalonil)和甲基托布津(Thiophanate-methyl)均购于重庆农资农药有限责任公司,按照使用说明分别稀释200和800倍。

1.1.4 供试土壤:灰棕紫泥紫色土,质地中壤,肥力中等,pH 6.92,采集0-20 cm耕作层土壤,拣去杂物,晾干,磨细过2 mm筛,溴甲烷消毒。

1.1.5 病原菌:甜瓜球腔菌(*Mycosphaerella melonis*),由西南大学植物保护学院提供,用PDA固体培养基28 °C培养7-10 d备用于拮抗试验;另用无菌水洗涤孢子,配制成 1×10^4 CFU/mL孢子悬液备用于植株接种试验^[12]。

1.1.6 Bonnet液体培养基:0.6 g KH_2PO_4 、0.7 g KNO_3 、0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.125 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、0.3 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、1 g天冬酰胺、10 g葡萄糖、1.5 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、4 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 mg H_3BO_3 、1 mg泛酸钙、8 mg FeNa-EDTA、1 mg吡哆醇、1 mg烟酸、20 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、10 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、20 mg KI,水1000 mL,pH调至6.0。

1.1.7 寡雄腐霉发酵液(*P. oligandrum* broth, POB):配制Bonnet液体培养基,利用Bailun Bio发酵罐(上海百仑生物科技有限公司制造)制备寡雄腐霉发酵液(发酵菌株: *Pythium oligandrum* CQ2010);温度: $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$;搅拌速率: 150 r/min;

通气量: 10 mL/(L·min); 发酵时间: 120 h; 0.22 mm 滤膜真空抽滤去除菌丝和卵孢子^[13], 内含寡雄蛋白215.4 mg/L。

1.1.8 “多利维生”寡雄腐霉卵孢子菌剂(*P. oligandrum* spore suspension, POS): 由捷克生物制剂有限公司生产, 按使用说明用Bonnet液体培养基代替清水, 按1:1000配制成孢悬液。

1.2 POB对昆明小鼠的急性毒性试验

选择具有药物毒性评价资质的重庆市中药研究院动物研究所, 进行POB的安全性评价试验, 受试小鼠饲养及试验遵循毒理试验的标准程序^[14]。

试验开始前, 小鼠在试验房间内适应3 d。然后, 根据体重随机将小鼠30只分为2组, 试验组20只和对照组10只, 雌雄各半。给药前禁食2 h, 称体重。试验组和对照组小鼠分别灌胃给POB和蒸馏水, 受试物剂量60 mL/kg, 给药容积30 mL/kg, 每日2次, 每次间隔6 h, 连续进行14 d。每天笼旁观察小鼠的外观体征、行为、饮食、对刺激的反应、分泌物、排泄物等情况, 并称体重。试验结束后, 对所有动物进行解剖, 观察动物组织器官的体积、颜色、质地等。

1.3 POB对黄瓜蔓枯病的防治作用

1.3.1 拮抗试验: 用6 mm打孔器, 取甜瓜球腔菌菌落边缘的菌块, 接种于培养皿中的PDA固体培养基中央, 沿菌块边缘分别滴加1 mL 无菌水、POB原液、百菌清和甲基托布津稀释液体, 25 °C培养5 d后, 用十字交叉法测量菌落直径并计算抑制率。

1.3.2 病菌接种试验: 盆栽种植黄瓜幼苗至6片真叶期, 分别设置: (I) 叶面喷洒无菌水(CK)、(II) 喷雾法接种甜瓜球腔菌孢子悬液(接种病菌)、(III) 喷洒POB 24 h后接种病菌(POB+接种病菌)和(IV) 接种病菌24 h后喷洒POB(接种病菌+POB)共4种处理。在接种病菌后, 保湿24 h以利病菌侵

染。液体喷洒量以湿润叶片为度, 重复3次, 每次重复20株苗, 常规管理。用药后第14 d调查植株发病率、病情指数和防治效果, 同步测定叶片丙二醛含量(硫代巴比妥酸法)。

1.4 POB对黄瓜生长及产量品质影响

1.4.1 盆栽试验: 每盆装土1.5 kg, 拌入10 g 20-10-5复合肥, 播种2粒催芽露白的黄瓜种子, 出苗7 d后保留1株均匀健壮的幼苗, 分别设置: (I) 浇灌Bonnet液体培养基(CK)、(II) 浇灌POS和(III) 浇灌POB共3个处理。每盆浇灌10 mL药液, 前后2次(间隔7 d), 重复3次, 每次重复20株幼苗, 常规管理。于出苗后30 d用直尺测定黄瓜株高, 并选取最大展开叶, 用丙酮提取-分光光度法、愈创木酚法, 高锰酸钾滴定法, 氮蓝四唑法分别测定叶绿素含量, 过氧化物酶(peroxidase, POD), 过氧化氢酶(catalase, CAT), 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性。取出新鲜须根, 用TTC法测定其活力。然后, 105 °C杀青后(80±2) °C烘干植株, 常规分析氮、磷、钾含量^[15]。

1.4.2 生产试验: 在盛有灰棕紫泥紫色土渗漏池(长×宽×深=5.0 m×3.0 m×1.5 m)中, 种植30株黄瓜幼苗, 成活15 d后, 分别设置: (I) 浇灌清水(CK)、(II) POS和(III) POB共3种处理。每株浇灌50 mL药液, 前后3次(间隔10 d), 重复3次, 随机区组排列, 按照当地黄瓜高产种植的田间管理模式进行移栽、施肥、除草、采收等。分次收获黄瓜果实, 累计成单株产量, 并于盛果期采集成熟的黄瓜果实, 分别用2,6-二氯酚靛酚滴定法、紫外分光光度法、示波极谱法和蒽酮比色法测定维生素C、硝酸盐、亚硝酸盐和可溶性糖含量。

1.5 数据分析

试验数据用Excel 2003进行基本计算, SPSS 18.0 软件进行统计分析, 差异显著性分析采用最小差异显著法(LSD), 显著水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果和分析

2.1 POB对动物的急性毒性

在灌胃给药POB后的第1、2、3、7和14 d, 试验组与对照组小鼠体重增长无显著差异(表1)。在试验期间, 2组小鼠体重总体呈增加趋势, 对照组的小鼠体重从20.45 g增加至23.38 g, 试验组的小鼠体重从20.19 g增加至25.08 g, 供试小鼠的外观和行为均无异常。此外, 在试验结束后, 对所有小鼠进行了解剖, 动物的心、肝、肾、肠等组

织器官未出现体积、颜色、质地等的改变。

2.2 POB对黄瓜蔓枯病的防治效果

2.2.1 POB对甜瓜球腔菌的抑制作用: 与CK相比, 各药剂对甜瓜球腔菌的菌丝生长均有抑制作用, 抑制率甲基托布津>POB>百菌清, 依次为54.83%、51.95%和40.84%(图1)。

2.2.2 蔓枯病发病率、防治效果和叶片丙二醛含量: 表2可见, 接种病菌之后, 黄瓜蔓枯病的发病率和病情指数最高, 分别为49.2%和32.7%。在接病菌+POB和POB+接病菌的处理中, 黄瓜蔓枯病

表1. POB对小鼠体重的影响(g)

Table 1. The effect of POB on the weight change in mice (g)

Groups	Per-test	1 st day	2 nd day	3 th day	7 th day	14 th day
CK	20.45±1.34 a	22.58±2.78 a	23.39±3.82 a	24.45±3.89 a	22.33±3.32 a	23.38±4.77 a
Test group	20.19±1.31 a	21.90±1.88 a	23.89±2.21 a	25.21±2.49 a	23.70±2.01 a	25.08±4.84 a

Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test and same below unless stated otherwise. CK: control.

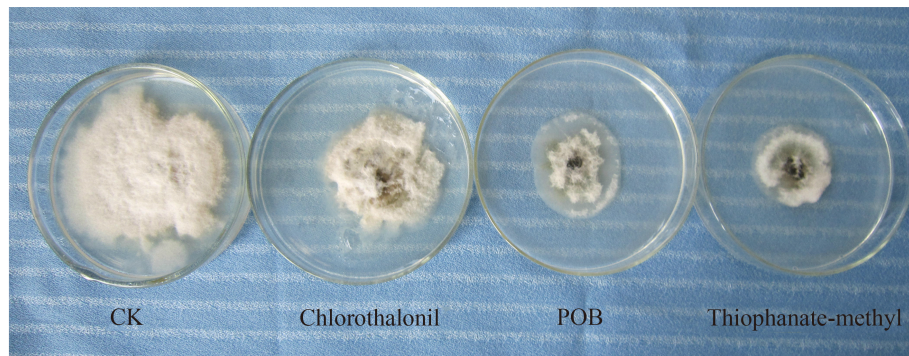


图 1. 化学农药和POB对甜瓜球腔菌的抑制作用

Figure 1. Inhabitation of chemical pesticides and POB against *Mycosphaerella melonis*. POB: *P. oligandrum* broth; CK: control.

表2. POB对黄瓜蔓枯病的防治效果及叶片丙二醛含量

Table 2. Control efficacy of POB against gummy stem blight of cucumber seedlings and malondialdehyde in leaves

Treatments	Incidence/%	Disease index	Control efficacy/%	Malondialdehyde/(nmol/g)
CK	0 c	0 c	–	4.14 c
PI	49.2 a	32.7 a	–	9.21 a
PI+POB	20.3 b	14.7 b	54.8	6.07 b
POB+PI	24.8 b	11.7 b	64.1	6.43 b

*PI: pathogenic inoculation. CK: control.

的发病率和病情指数显著降低, 变化于20.3%–24.8%(发病率)和11.7–14.7(病情指数)之间, 防治效果为54.8%–64.1%。此外, 叶片丙二醛含量接种病菌>POB+接种病菌~接种病菌+POB>对照(不接种病菌), 依次为9.21、6.07、6.43、4.14 nmol/g。

2.3 POB对黄瓜生长和产量品质的影响

2.3.1 幼苗生长、叶绿素含量、根系及抗氧化酶活性: 图2可见, 在盆栽试验中, 施用POB和POS促进黄瓜幼苗生长, 提高叶绿素含量, 增强根系活力, 促增效应POB>POS。与对照相比, POB

处理的株高、生物量、叶绿素和根系活力分别提高了51.31%、81.10%、22.62%和33.37%; 而POS处理仅提高23.74%、55.71%、11.32%和25.01%。

此外, 施用POB和POS显著提高黄瓜幼苗的POD和SOD活性, 分别比对照提高了35.43%–46.94% (POD)和20.39%–26.31% (SOD), 但POB和POS之间无显著差异, 施用POB和POS对CAT活性无显著影响(图3)。

2.3.2 植株养分吸收: 由表3可知, 除含磷量之外, 施用POB和POS均显著提高黄瓜幼苗的氮、

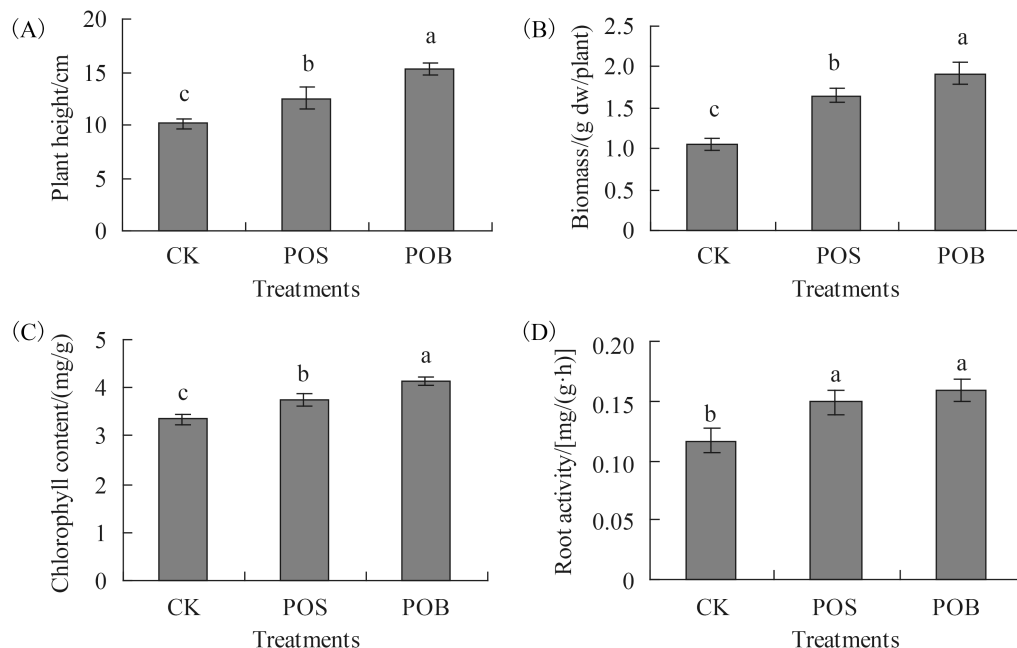


图 2. 黄瓜幼苗株高(A)、生物量(B)、叶绿素含量(C)及根系活力(D)

Figure 2. The height(A), biomass(B), chlorophyll content(C), and root activity(D) of cucumber seedlings. POB: *P. oligandrum* broth; POS: *P. oligandrum* spore suspension; CK: control.

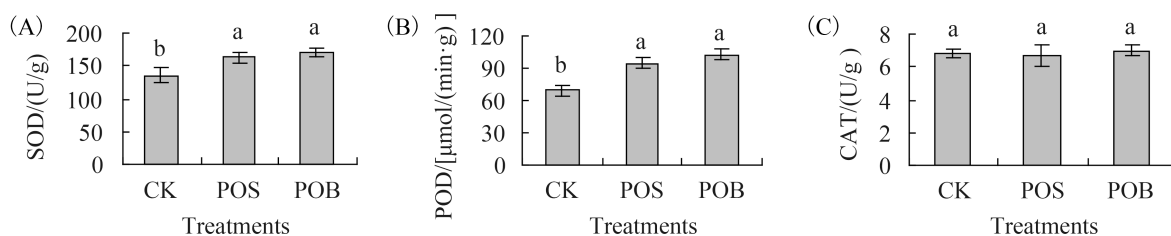


图 3. 黄瓜叶片中的SOD(A)、POD(B)和CAT(C)酶活性

Figure 3. Enzyme activities of SOD(A)、POD(B) and CAT(C) in the leaves of cucumber seedlings. POB: *P. oligandrum* broth; POS: *P. oligandrum* spore suspension; CK: control.

磷、钾含量和吸收量，POB处理的含氮量和氮、钾吸收量显著高于POS。与对照相比，POB处理的氮含量和氮、钾吸收量分别提高30.43%、136.54%和160.60%；POS处理的则增加22.46%、90.78%和120.48%。

2.3.3 黄瓜产量和品质：POS和POB处理的黄瓜

产量分别比对照提高7.03%和11.58%。在品质方面，POB显著增加黄瓜Vc和可溶性糖含量，降低硝酸盐含量，但对亚硝酸盐含量则无显著影响(表4)。在各试验处理中，黄瓜果实均呈粗短棒状，表面瘤稀多黑刺，皮色为绿白色，外观无明显差异。

表3. 黄瓜幼苗养分含量与吸收量

Table 3. The nutrient concentration and absorption of cucumber seedlings

Treatments	Concentration/%			Absorption/(mg/plant)		
	N	P	K	N	P	K
CK	1.38±0.04 c	0.31±0.02 a	2.76±0.30 b	14.64±1.31 c	3.32±0.30 b	29.29±4.22 c
POS	1.69±0.04 b	0.35±0.03 a	3.91±0.19 a	27.93±1.59 b	5.83±0.43 a	64.58±2.09 b
POB	1.80±0.04 a	0.32±0.03 a	3.96±0.24 a	34.63±2.75 a	6.15±0.59 a	76.33±3.46 a

表4. 不同处理黄瓜产量和品质

Table 4. Yield and quality of cucumber by different treatments

Treatments	Yield/(kg/plant)	Nitrate/(mg/kg)	VitaminC/(mg/g)	Soluble sugar/(mg/g)	Nitrite/(mg/kg)
CK	2.70±0.10 b	207.62±7.96 a	18.73±1.75 c	30.59±2.45 b	0.17±0.01 a
POS	2.89±0.09 a	154.67±8.35 b	25.11±1.66 b	36.21±1.14 ab	0.18±0.01 a
POB	3.02±0.11 a	170.24±11.26 b	28.10±3.02 a	39.39±1.56 a	0.17±0.01 a

3 讨论

在动物急性毒性试验中，小鼠一日内灌胃给予POB 60 mL/kg，达到该动物的最大给药量。观察14 d表明，POB对供试动物的外观、行为、体重均无显著影响，心、肝、肾、肠等脏器等的体积、颜色、质地等也未出现改变。因此，POB属于无毒物质，对动物安全无害，类似前人对寡雄腐霉活菌剂的研究结果^[16]。

POB对甜瓜球腔菌的抑制率达到51.95%，药效介于1:800的百菌清溶液和1:200的甲基托布津溶液之间，其原因可能是寡雄腐霉发酵液中含有蟹壳素、寡雄蛋白和小分子抗菌物质等，抑制了病原菌的生长繁殖^[17]。在接种病菌之后，黄瓜叶片中的丙二醛含量增加，POB则降低其增幅，

说明POB有效减轻了甜瓜球腔菌对细胞膜的危害作用^[18]。众所周知，生防菌可以诱导植物产生系统抗病性(induced systemic resistance, ISR)，类似病原菌引起的系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)，但前者在寄主植物上不发生过敏性坏死反应，不出现可见病症^[19]。ISR和SAR的作用机制主要是促进组织木质化，增强细胞机械屏障和产生植保素等，涉及到多种氧化酶和过氧化物酶等催化的生物化学反应^[20]。其中，POD参与木栓素形成、细胞壁交联、抗菌素合成等^[21]。在本研究中，POB显著提高黄瓜幼苗的POD和SOD活性，说明POB能诱导抗病反应，促进合成抗病物质，构成保护性屏障，防止病原菌入侵，提高植物抗病能力。因此，POB显著降低黄瓜蔓枯病的发病率和病情指数。与之类似的是，黄瓜

植株接种哈茨木霉后, 促进MYB、GLU和GST等一系列相关抗性基因表达, 提高对黄瓜尖孢镰刀菌的抗性^[22]。前人研究发现, 施用POS增加黄瓜幼苗对磷的吸收, 提高植株体内的吲哚乙酸(IAA)含量, 促进植株生长^[17]。在本研究中, 施用POB显著促进黄瓜生长, 类似POS对番茄和水稻的促生效应^[10,16]。但是, POB对黄瓜幼苗的防病促生效应优于POS, 克服了卵孢子制剂的生防效果易受环境和人为因素影响等缺点, 进一步证明微生物次级代谢产物优于活菌剂的观点^[23]。此外, 施用POB之后, 黄瓜植株叶绿素含量提高, 根系活力增强。在光合过程中, 叶绿素参与光能吸收, 与光合速率密切相关; 根系活力是根系物质能量代谢的综合体现, 直接影响养分吸收^[24]。叶绿素含量和根系活力提高有益于增强光合作用, 改善植物营养, 促进植物生长^[25]。此外, 寡雄腐霉能合成色胺、色氨酸、生长素和细胞分裂素等生长活性物质^[7], 这也可能是POB促进黄瓜植株生长的另一重要原因。值得注意的是, POB使黄瓜果实增产, 品质改善。其中, 黄瓜果实Vc和可溶性糖增加, 硝酸盐含量降低, 可提高营养价值和安全性^[26]; 可溶性糖含量增加还有益于改善果实口感及风味^[27]。硝酸还原酶是硝酸还原的关键酶, 硝酸盐含量降低意味着硝酸还原酶活性增强, 既提高氮素利用率, 又减少NO₃⁻累积。

综合以上试验结果, POB对动物无毒安全, 能有效防治黄瓜蔓枯病, 促进生长, 提高产量, 改善品质, 防病促生效果优于POS, 持续研究可望获得兼具防病促生作用的生物农药。

参考文献

- [1] Chen ZJ, Zhang F, Zhang SL, Liang YL, Wang Q. Epidemic factors of soil-borne diseases of cucumber and environment-friendly control technique under sunlight greenhouse in loess hilly region. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(S): 697-700. (in Chinese)
陈志杰, 张锋, 张淑莲, 梁银丽, 王琦. 温室黄瓜土传病害流行因素及环境友好型防治技术对策. *农业环境科学学报*, 2006, 25(S): 697-700.
- [2] Cai DJ, Shan ZJ, Zhu ZL, Shi LL, Zhang ZM, Qiu JP. Study on effect of cupric pesticides on eco-environment. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2001, 3(1): 61-68. (in Chinese)
蔡道基, 单正军, 朱忠林, 石利利, 张子明, 邱润平. 铜制剂农药对生态环境影响研究. *农药学报*, 2001, 31(1): 61-68.
- [3] Picard K, Tirilly Y, Benhamou N. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4305-4314.
- [4] Takenaka S, Nishio Z, Nakamura Y. Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathology*, 2003, 93(10): 1228-1232.
- [5] He SS, Zhang BX, Ge QX. On the antagonism by hyperparasite *Pythium oligandrum*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1992, 22(1): 77-82. (in Chinese)
贺水山, 张炳欣, 葛起新. 寡雄腐霉重寄生作用的研究. *植物病理学报*, 1992, 22(1): 77-82.
- [6] Benhamou N, Bélanger RR, Rey P, Tirilly Y. Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium crown and root rot* in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, 39(7/8): 681-696.
- [7] Al-Rawahi AK, Hancock JG. Rhizosphere competence of *Pythium oligandrum*. *Phytopathology*, 1997, 87(9): 951-959.
- [8] Zhu SJ, Gao ZM. Advancement on the *Trichoderma* promotion to plant growth and its mechanism. *Journal of Fungal Research*, 2006, 4(3): 107-111. (in Chinese)
朱双杰, 高智谋. 木霉对植物的促生作用及其机制. *菌物研究*, 2006, 4(3): 107-111.
- [9] Zhao J, Wu YK, Yuan L, Du RW, Yang YH, Huang JG. Effects of the fermentation broth of *Pythium oligandrum* on the growth and black shank control of flue-cured tobacco. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2013, 40(1): 68-72. (in Chinese)
赵建, 吴叶宽, 袁玲, 杜如万, 杨宇虹, 黄建国. 寡雄腐霉发酵液对烤烟生长的影响及对烟草黑胫病的防治作用. *植物保护学报*, 2013, 40(1): 68-72.
- [10] Jia RL, Geng MM, Yuan L. Influence of *Pythium oligandrum* broth on the growth and botrytis control of tomato seedlings in greenhouses. *Journal of Plant Protection*, 2015, 42(5): 827-833. (in Chinese)
贾瑞莲, 耿明明, 袁玲. 寡雄腐霉发酵液对温室番茄生长及灰霉病防治作用的研究. *植物保护学报*, 2015, 42(5): 827-833.

- 霉病的防治作用. *植物保护学报*, 2015, 42(5): 827–833.
- [11] Tan Y, Peng LZ, Yuan L, Wang SB. Toxicity of *Pythium oligandrum* broth to animal and its control effect on rot diseases caused by *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* in orange fruit storage. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(11): 1418–1426. (in Chinese)
谭艳, 彭良志, 袁玲, 王少博. 寡雄腐霉发酵液的动物毒性及其对柑橘果实贮藏期青、绿霉病的防治效果. *微生物学报*, 2015, 55(11): 1418–1426.
- [12] Lin Q, Lü ZH, Huang RZ, Huang QZ, Shi SR, Lei L. Study on screening method for resistance to pepper anthracnose. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2006, 19(6): 1071–1073. (in Chinese).
林清, 吕中华, 黄任中, 黄启中, 史思茹, 雷蕾. 辣椒炭疽病抗性鉴定方法研究. *西南农业学报*, 2006, 19(6): 1071–1073.
- [13] Zhao J, Yuan L, Huang JG. Fermentation parameter optimization of *Pythium oligandrum* and biocontrol effect of the fermentation broth. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(2): 292–299. (in Chinese)
赵建, 袁玲, 黄建国. 寡雄腐霉发酵参数优化及发酵液的生防效应. *中国农业科学*, 2013, 46(2): 292–299.
- [14] Shi DX, Yang F, Yin ZQ, Xu J, Lu Y, Zhang YQ, Chen J. Studies on the acute and accumulative toxicity of Neem oil in mice. *Chinese Veterinary Science*, 2010, 40(3): 317–320. (in Chinese)
石东霞, 杨帆, 殷中琼, 徐娇, 卢杨, 张玉群, 陈娇. 印楝油对小鼠的急性毒性试验和蓄积毒性研究. *中国兽医科学*, 2010, 40(3): 317–320.
- [15] 陈建勋, 王晓峰. *植物生理学实验指导*. 第2版. 广州: 华南理工大学出版社, 2006.
- [16] Ouyang YN, Xia LX, Zhu LF, Yu SM, Jin QY. Effects of polyversum, a product from *Pythium* on growth, disease resistance and yields promotion of rice. *China Rice*, 2007, (6): 48–51. (in Chinese)
欧阳由男, 夏陆欣, 朱练峰, 禹盛苗, 金千瑜. 寡雄腐霉制剂“多利维生”对水稻的促长与防病增产效果. *中国稻米*, 2007, (6): 48–51.
- [17] Brožová J. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science*, 2002, 38(1): 29–35.
- [18] Yang J, Yu ZW, Li ZQ, Jin XZ. Physiological and biochemical changes to salt stress in hydroponically cultured salix *Psammophila* seedlings. *Northern Horticulture*, 2015, (5): 71–78. (in Chinese)
- 杨进, 于振闻, 李紫芹, 靳杏子. 盐胁迫下沙柳幼苗的生理生化变化. *北方园艺*, 2015, (5): 71–78.
- [19] Liu XG, Gao KX, Kang ZS, He BL. Systemic resistance induced by biocontrol agents in plants and its biochemical and cytological mechanisms. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(8): 1861–1868. (in Chinese)
刘晓光, 高克祥, 康振生, 何邦令. 生防菌诱导植物系统抗性及其生化和细胞学机制. *应用生态学报*, 2007, 18(8): 1861–1868.
- [20] Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 4951–4959.
- [21] Meng YY, Fan SL, Song MZ, Pang CY, Yu SX. Advance in research on Class III peroxidases and its function in plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, 31(9): 1908–1916. (in Chinese)
孟艳艳, 范术丽, 宋美珍, 庞朝友, 喻树迅. Class III 过氧化物酶在植物中的作用及其研究进展. *西北植物学报*, 2011, 31(9): 1908–1916.
- [22] Liu AR, Chen SC, Chen K, Lin XM, Wang FH. Antagonism effect of trichoderma harzianum against fusarium oxysporum on cucumber and related genes expression analysis. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2010, 37(3): 249–254. (in Chinese)
刘爱荣, 陈双臣, 陈凯, 林晓民, 王风华. 哈茨木霉对黄瓜尖孢镰刀菌的抑制作用和抗性相关基因表达. *植物保护学报*, 2010, 37(3): 249–254.
- [23] Wen Y, Zhao GZ, Zhou CB, Cao AX. Research progress of microbial agents in ecological engineering. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(20): 6287–6294. (in Chinese)
文娅, 赵国柱, 周传斌, 曹爱欣. 生态工程领域微生物菌剂研究进展. *生态学报*, 2011, 31(20): 6287–6294.
- [24] Zheng J, Hu MJ, Guo YP. Regulation of photosynthesis by light quality and its mechanism in plants. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(7): 1619–1624. (in Chinese)
郑洁, 胡美君, 郭延平. 光质对植物光合作用的调控及其机理. *应用生态学报*, 2008, 19(7): 1619–1624.
- [25] Zhou YT, Ma HQ, Liang LJ, Hong H, Hu LT, Sun M, Wu NB. Photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence in leaves of *Catharanthus roseus* grown under different light intensities. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(11): 3589–3595. (in Chinese)
周忆堂, 马红群, 梁丽娇, 洪鸿, 胡丽涛, 孙敏, 吴能表. 不同光

- 照条件下长春花的光合作用和叶绿素荧光动力学特征. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3589–3595.
- [26] Huang M, Li JJ, Yu C, Yang HZ. Effectiveness of several preconsumption treatment methods in removing nitrate and nitrite from vegetables. *Food Science*, 2011, 32(9): 82–86. (in Chinese)
黄敏, 李静静, 余萃, 杨海舟. 几种食前处理对蔬菜中硝酸盐和亚硝酸盐的去除效果. 食品科学, 2011, 32(9): 82–86.
- [27] Liu Y, Qi HY, Wang B, Zhang DJ, Yi NN. Correlation between sensory analysis and major flavor compounds in melon of five groups. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2009, 18(4): 355–358. (in Chinese)
刘勇, 齐红岩, 王博, 张多娇, 衣宁宁. 不同类群薄皮甜瓜感官检验与主要风味物质的关系. 西北农业学报, 2009, 18(4): 355–358.

Effect of biopesticide *Pythium oligandrum* broth on gummy stem blight in cucumber seedlings, animal health and plant growth

Mingming Geng, Ruilian Jia, Zongming Sui, Jianguo Huang*

College of Resource and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: [Objective] Biopesticides are safe and environment friendly. We evaluated the biocontrol effect of *Pythium oligandrum* broth (POB) and its toxicity to animals and plant growth. [Methods] Animal, antagonist, pot, and field experiments with mice, *Mycosphaerella melonis*, and cucumber seedlings were carried out to study animal toxicity, control of gummy stem blight, plant growth, fruit yield and quality with POB produced from self-isolated *P. oligandrum* CQ2010. [Results] Mouse showed normal weight, appearances, performances and no pathogenic changes in organs and tissues with a large amount of POB supplied by lavage. The inhibition rate of POB against *M. melonis* was 51.95%, similar to thiophanate methy (800 times dilution) but much higher than chlorothalonil (200 times dilution). Malondialdehyde concentration was reduced whereas activities of peroxidase and superoxide dismutase were stimulated in seedling leaves irrespective of POB supplied before and after pathogenic inoculation. POB also decreased the pathogenic incidence and disease index with relative control efficacy from 54.8% to 64.1%. Thus, POB could alleviate cell membrane damage caused by pathogenic microbes, stimulate physiological reactions related to disease defense, and increase disease-resistant abilities of plants. Moreover, POB increased chlorophyll content, root activity, and uptake of nitrogen, phosphorus and potassium, resulting in growth acceleration, fruit yield increment, and quality improvement. [Conclusion] POB is safe to animals and could control gummy stem blight of cucumber seedlings, promote plant growth, increase fruit yield, and improve the qualities.

Keywords: *Pythium oligandrum*, cucumber, gummy stem blight, growth

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Applied and Developed Research of Chongqing Science and Technology Commotion (cstc2013yykfb80011) and by the Scientific Project of Liangshan Tobacco Company, Sichuan Province (2012-12)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68251249; Fax: +86-23-68250444; E-mail: huang99@swu.edu.cn

Received: 13 October 2015; Revised: 4 December 2015; Published online: 16 December 2015