

RSD配施纤维素降解菌BE-91抑制菊花菌核病的微生物机制探究

彭佳丽, 林安琪, 陈 远, 强 薇, 郑乐诗, 吴安娜, 唐彤彤*

滁州学院生物与食品工程学院, 安徽 滁州

收稿日期: 2025年6月17日; 录用日期: 2025年7月19日; 发布日期: 2025年7月28日

摘 要

菊花菌核病是由核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)引起的一种危害严重的真菌性病害。强还原土壤灭菌法(RSD)作为一种环境友好、普适性强的植物病害防治措施,已广泛用于病害防控的土壤前处理中。RSD处理中多采用农产品副产物,以纤维素为主要成分难以被快速降解,纤维素降解菌能够有效提高降解效率。本研究以菊花为研究对象,探究不同有机物料如麦麸、秸秆单独或复配并接种纤维素降解菌BE-91对菊花菌核病的防控效果。研究强还原土壤灭菌处理对菊花生物量、土壤理化性质和土壤酶活的影响,采用Illumina Miseq测序技术解析土壤真菌群落组成、丰度及其土壤环境因子间的相关性。结果显示:麦麸可优先作为RSD处理的物料选择;土壤理化因子中与土壤真菌群落结构相关性最高的是有机碳含量;土壤酶活中与土壤真菌群落结构相关性最高的是蔗糖酶活性;RSD可以改变土壤真菌群落的结构组成,促进有益微生物的繁殖,抑制核盘菌属(*Sclerotinia*)的累积,降低菊花菌核病的发生。

关键词

强还原土壤灭菌法, 核盘菌, 纤维素降解菌, 高通量测序技术, 土壤微生物

Investigation into the Microbial Mechanisms of RSD Combined with Cellulose-Degrading Bacteria BE-91 in Suppressing Sclerotinia Disease in Chrysanthemums

Jiali Peng, Anqi Lin, Yuan Chen, Wei Qiang, Leshi Zheng, Anna Wu, Tongtong Tang*

School of Biological Science and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou Anhui

*通讯作者。

文章引用: 彭佳丽, 林安琪, 陈远, 强薇, 郑乐诗, 吴安娜, 唐彤彤. RSD 配施纤维素降解菌 BE-91 抑制菊花菌核病的微生物机制探究[J]. 林业世界, 2025, 14(3): 480-489. DOI: 10.12677/wjf.2025.143058

Received: Jun. 17th, 2025; accepted: Jul. 19th, 2025; published: Jul. 28th, 2025

Abstract

Chrysanthemum sclerotinia, caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, is a serious fungal disease. The strong reducing soil sterilization (RSD) method, as an environmentally friendly and widely applicable plant disease control measure, has been widely used in soil pretreatment for disease prevention and control. In RSD treatment, agricultural by-products, which are mainly composed of cellulose, are often used, and they are difficult to degrade rapidly. Cellulose-degrading bacteria can effectively improve the degradation efficiency. This study took chrysanthemum as the research object to explore the control effects of different organic materials such as wheat bran and straw, either alone or in combination, and inoculated with cellulose-degrading bacteria strain BE-91 on chrysanthemum sclerotinia rot. The effects of RSD treatment on chrysanthemum biomass, soil physical and chemical properties, and soil enzyme activities were studied. The Illumina Miseq sequencing technology was used to analyze the composition, abundance of soil fungal communities, and their correlations with soil environmental factors. The results showed that wheat bran could be preferred as the material for RSD treatment; the soil organic carbon content was the soil physical and chemical factor most correlated with the soil fungal community structure; soil sucrase activity was the soil enzyme activity most correlated with the soil fungal community structure; RSD could change the structure of soil fungal communities, promote the reproduction of beneficial microorganisms, inhibit the accumulation of *Sclerotinia*, and reduce the occurrence of chrysanthemum sclerotinia rot.

Keywords

Strong Reducing Soil Sterilization, *Sclerotinia*, Cellulose-Degrading Bacteria, High-Throughput Sequencing Technology, Soil Microorganism

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

菊花(*Chrysanthemum morifolium*)是世界四大切花之一, 具有很高观赏价值和经济价值[1]。由核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)引起的菊花菌核病, 使得植株腐烂坏死, 影响菊花的产量和质量, 对经济造成重大损失[2]。菊花栽培过程中主要以农业防治为主、化学药剂防治为辅的综合防治措施, 如土壤熏蒸灭菌法、栽培抗病品种、合理轮作和生物防治等, 均取得了一定的防治效果[3], 但这些方法作用比较单一, 且均有局限性[4]-[7]。

强还原土壤灭菌方法(Reductive Soil Disinfestation, RSD) [8] [9]是将大量易分解的有机物料与发生土传病害的土壤混合, 采取覆膜或淹水的手段创造强厌氧性环境, 达到土壤灭菌目的。该方法对人类和环境没有毒害作用, 也不会遗留农残问题, 被广泛应用于土传病害的防治中[10]-[17]。

纤维素降解菌能将环境中的秸秆、植物残体等的纤维素分解为葡萄糖等小分子物质, 为微生物活动提供碳源, 改善土壤结构能够增加土壤有机质, 提高土壤肥力, 同时减少纤维素类物质的残留[18]-[21]。

本研究通过配施不同类型的有机物料麦麸、玉米秸秆,同时结合纤维素降解菌,采用有机物料 + 覆膜 + 淹水的方法进行土壤灭菌,研究强还原土壤灭菌法对土壤理化性质及土壤酶活性的影响,采用高通量测序技术分析 RSD 处理对土壤真菌、细菌丰度变化及群落结构的影响,同时结合土壤环境因子进行相关性分析,从土壤微生物群落的角度探究 RSD 处理对菊花菌核病的防治机制。本研究可以为强还原土壤灭菌法在菊花菌核病防治过程中的应用提供理论基础和技术支撑,并为菊花产业的可持续性发展提供指导。

2. 材料与方法

2.1. 供试材料

供试土壤为该地区菊花栽培试验所用土壤;菊花品种“金丝皇菊”;麦麸和玉米秸秆;纤维素降解菌(枯草芽孢杆菌 BE-91)。

2.2. 仪器与试剂

仪器:高压蒸汽灭菌锅、pH 计、超净工作台、UV-1900 紫外分光光度计、恒温振荡器等;

试剂:浓硫酸、重铬酸钾、氯化钾酚溶液、二水硝普酸钠溶液、二氯异氰尿酸钠显色剂、盐酸 N-(1-萘基)-乙二胺溶液、氯化铵、硫酸汞、亚硝酸钠、苯酚、甲苯、3,5-二硝基水杨酸试剂、次氯酸钠、苯酚钠、蔗糖等。

2.3. 试验设计

试验设置八组处理:不添加任何有机物料(CK),添加 1%的玉米秸秆(J)(1%为添加秸秆的干重占土壤干重的比例,下同),添加 1%的麦麸(M),添加 1%的玉米秸秆和 1%的麦麸(JM),不添加任何有机物料但添加与有机物料重量体积为 1:1 的纤维素降解菌(ck),添加 1%的玉米秸秆和与玉米秸秆重量体积比为 1:1 的纤维素降解菌悬液(j),添加 1%的麦麸和与麦麸重量体积为 1:1 的纤维素降解菌悬液(m),添加 1%的玉米秸秆和 1%的麦麸和与上述等重量体积的纤维素降解菌悬液(jm)。每组处理 24 kg 土壤,添加物料后淹水超过土面 2 cm,覆膜,于大棚内自然处理 37 d,结束后揭开膜添加纤维素降解菌悬液,分别于第 1、7、14、28 d 采集土壤样品,一部分用于理化性质和土壤酶活性的测定,一部分用于根际土壤微生物多样性分析。土壤风干粉碎后栽种菊花幼苗,并于定植后每隔 7 d 进行一次番茄生物量统计。

2.4. 试验方法

2.4.1. 菊花生物量统计

使用游标卡尺测量茎基部到植株顶端的长度,作为株高。在离地 1 cm 处用游标卡尺测定菊花植株的横茎,作为茎粗;菊花收割时将植株分为地上和地下部分,105℃下杀青 30 min 后将温度调至 65℃烘干至恒重即为干重。

2.4.2. 土壤理化性质测定

土壤氨态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)及亚硝态氮($\text{NO}_2\text{-N}$)采用氯化钾浸提 - 紫外分光光度法测定(HJ63402012);土壤 pH 按照水土比 2.5:1 (v:w)进行测定(HJ962-2018);土壤有机碳采用重铬酸钾氧化 - 分光光度法测定(HJ615-2011)。

2.4.3. 土壤酶活性测定

采用磷酸苯二钠比色法测定土壤磷酸酶(Soil Acid Phosphatase, S-ACP);3,5-二硝基水杨酸比色法测定

土壤蔗糖酶(Soil Sucrase, S-SC); 靛酚蓝比色法测定土壤脲酶(Soil Unease, S-UE)活性。

2.4.4. 土壤根际微生物高通量测序及分析

土壤采集后置于-20℃的冰箱，试剂盒提取土壤 DNA，检测纯度后交由上海美吉生物科技有限公司开展测序工作。

2.5. 数据处理

采用 Excel 2021 软件进行数据整理与统计，使用 SPSS 25.0 对数据进行显著差异性分析，利用 Origin 2021 绘图。

3. 结果与分析

3.1. RSD 处理对番茄生物量的影响

在本研究试验周期内并未观察到 RSD 处理后菊花有明显菌核病发病情况，如图 1 所示，随着时间的变化，在第 7 d、28 d 麦麸组(M、m)株高显著高于对照组(CK、ck)和玉米秸秆组(J、j)($P > 0.05$)；在第 7 d，

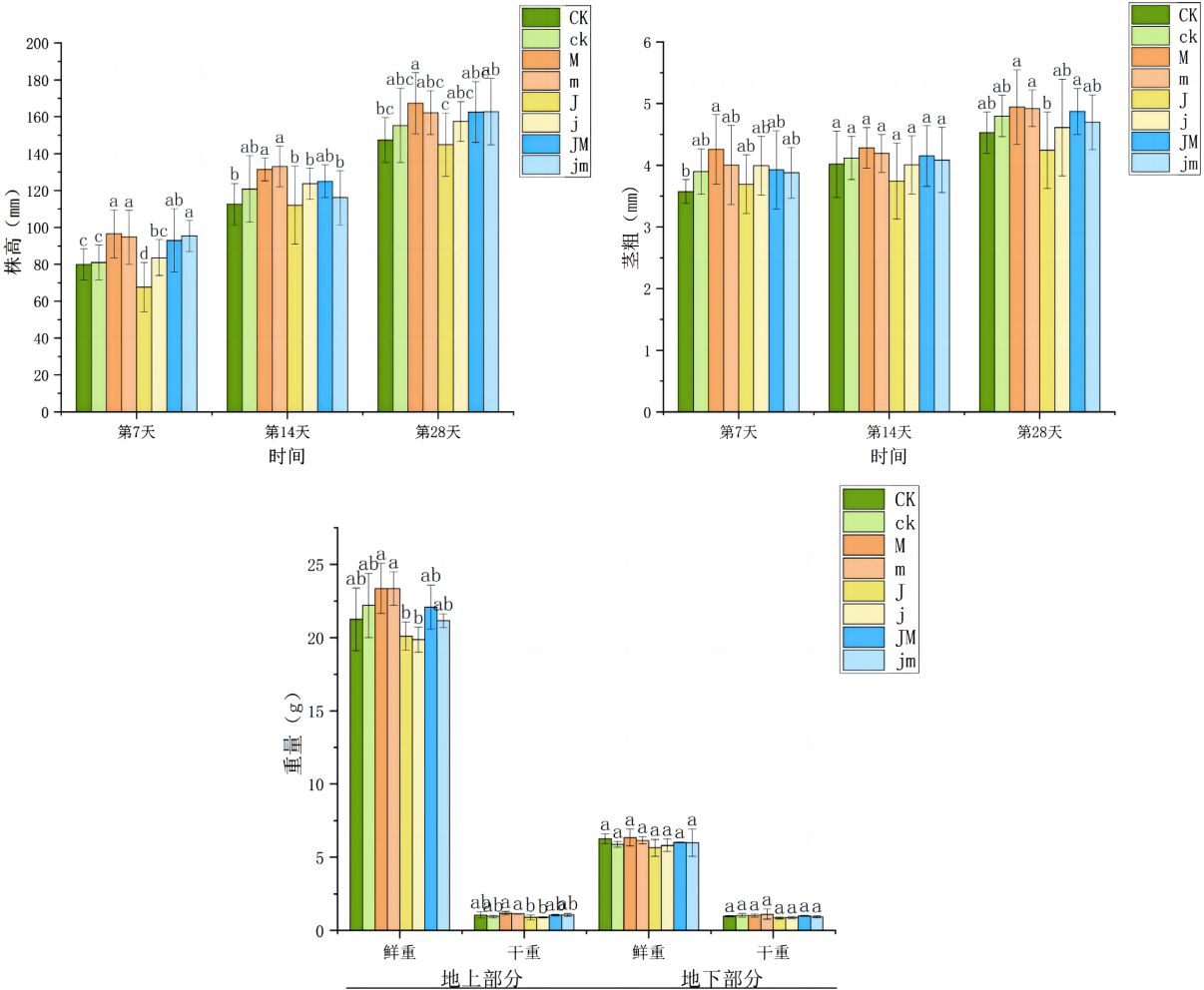


Figure 1. Effects of different treatments on the biomass of tomato (Lowercase letters indicate significant differences among different treatments at the same time ($P < 0.05$))

图 1. 不同处理对番茄生物量的影响(小写字母表示同一时间内不同处理间差异显著($P < 0.05$))

M 各处理组株高、茎粗均呈现增长趋势。整个栽培期间,麦麸组(M、m)株高、茎粗均高于其他处理组,组茎粗显著高于 CK 组,在第 28 d 麦麸组(M、m)茎粗显著高于 J 组($P > 0.05$)。地上部分鲜重与干重麦麸组(M、m)高于其他处理组,其中麦麸组(M、m)显著高于玉米秸秆组(J、j) ($P > 0.05$),地下部分鲜重与干重各处理组之间差异不显著($P > 0.05$)。RSD 处理组相较于 RSD + 枯草芽孢杆菌 BE-91 悬液处理组,在第 7 d, j 组株高显著高于 J 组,其他时期差异并不显著($P > 0.05$)。

3.2. RSD 处理对土壤理化性质的影响

由图 2 可以看出, RSD 处理过后, m 氨氮含量最高达 37.78 mg/kg, 随着时间的变化, 所有处理组氨氮含量呈现先下降后上升最后下降的趋势; 其中, m 组在不同阶段氨氮含量均高于其他处理组。从整体上看, 所有处理组亚硝酸盐氮含量呈现先上升后下降的趋势, 与氨氮变化相反; 在整个取样阶段, 不同处理间亚硝酸盐含量均低于 1 mg/kg。观察整个时期不同处理间有机碳含量变化可以发现, 随着时间的变化, 所有处理组有机碳含量呈现先下降后上升的趋势。其中不同阶段内 M (麦麸)有机碳含量处于最高水平。土壤 pH 在整个时期内并无较大变化。

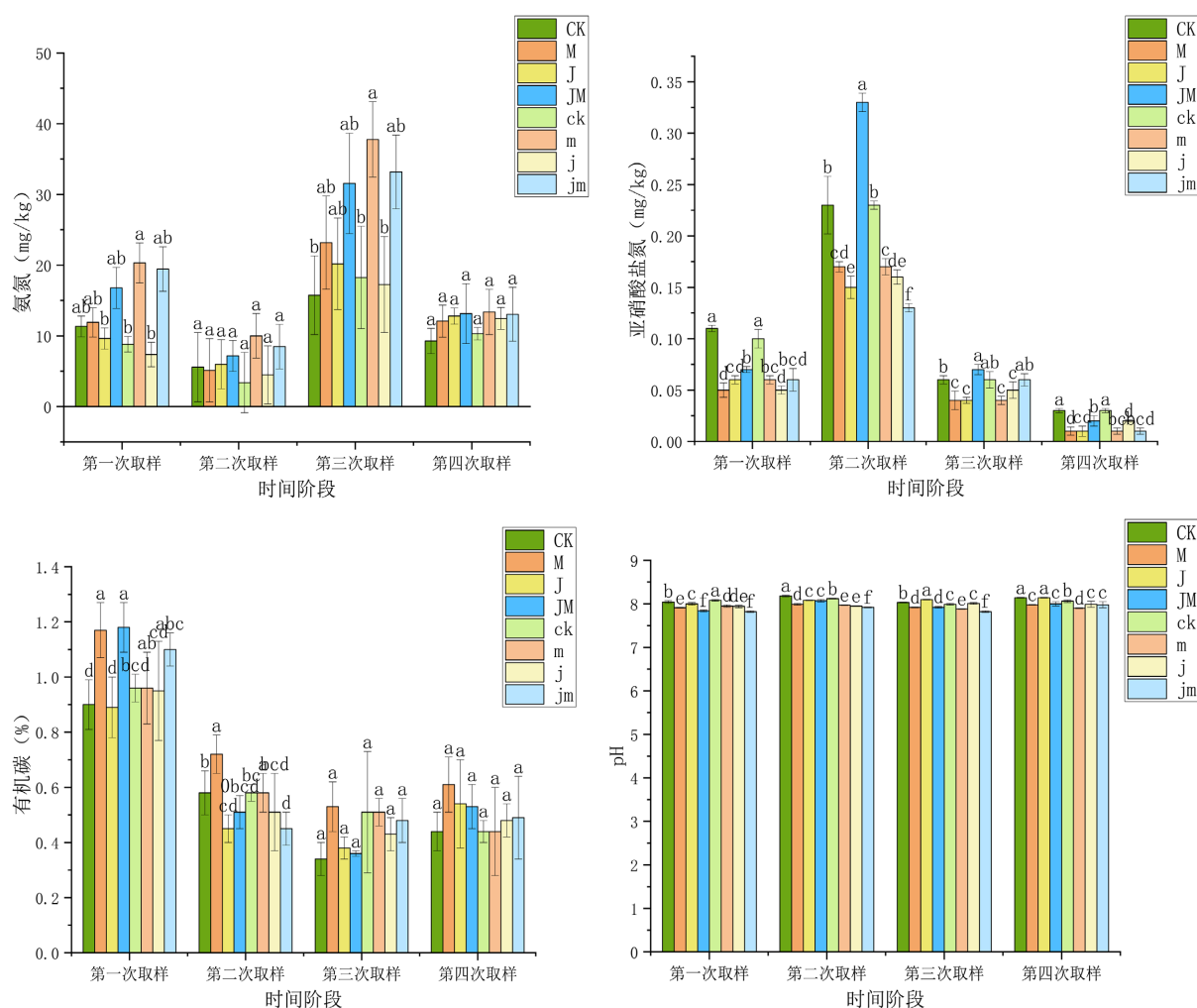


Figure 2. Variations in soil physicochemical properties under different treatments (Lowercase letters indicate significant differences among different treatments at the same time ($P < 0.05$))

图 2. 不同处理下土壤理化性质的变化(小写字母表示同一时间内不同处理间差异显著($P < 0.05$))

3.3. RSD 对土壤酶活的影响

由图 3 可以看出,随着时间的变化,麦麸处理组(M、m)和麦麸 + 玉米秸秆处理组(JM、jm)蔗糖酶活性呈现先降低后升高最后降低的趋势;玉米秸秆处理组(J、j)蔗糖酶活性呈现先升高后降低的趋势;其中麦麸组(M、m)在不同时期蔗糖酶活性均高于其他处理组;在前期,m 组蔗糖酶活性显著高于 M 组,后期 M 组蔗糖酶活性显著高于 m 组。不同处理间土壤脲酶活性变化规律不同,其中以麦麸作为物料的两组处理 M 和 m 在不同时期脲酶活性均高于其他处理组,在不同时期 M 组脲酶活性均高于 m 组。在整个取样阶段,随着时间的推移,额外添加枯草芽孢杆菌 BE-91 悬液处理组与只进行 RSD 处理组的变化趋势一致,均呈现先升高后降低的趋势,都是在第三次取样阶段达到峰值;其中麦麸组(M、m)在不同阶段中性磷酸酶活性均处于最高水平,在中期,m 组中性磷酸酶活性显著高于 M 组。

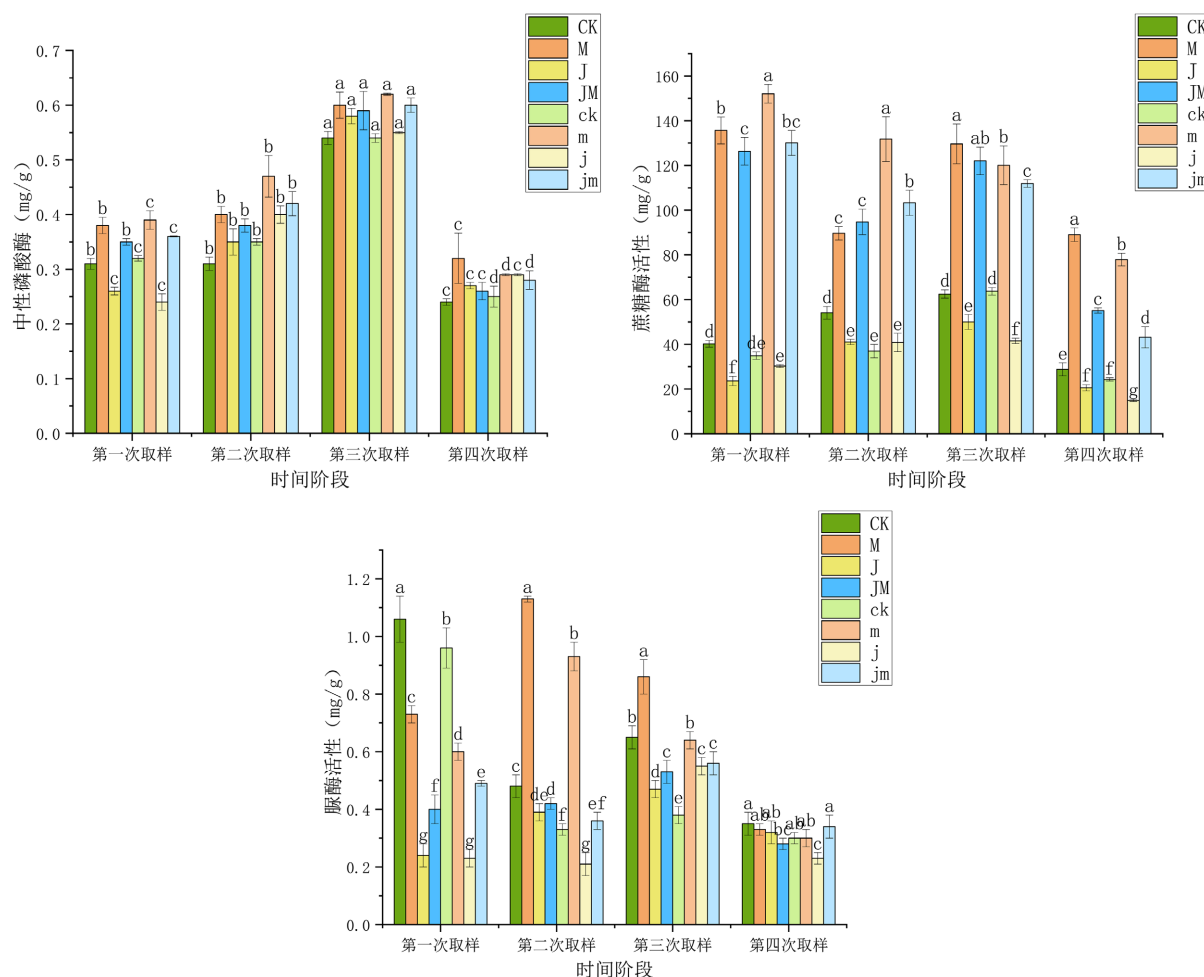


Figure 3. Variations in soil enzyme activity under different treatment conditions (Lowercase letters indicate significant differences among different treatments at the same time ($P < 0.05$))

图 3. 不同处理下土壤酶活的变化(小写字母表示同一时间内不同处理间差异显著($P < 0.05$))

3.4. RSD 对土壤真菌群落的影响

由图 4 可知, RSD 处理后不同处理间的优势菌门主要分布在子囊菌门(*Ascomycota*)、球囊菌门(*Glomeromycota*)、罗兹菌门(*Rozellomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)、被孢霉门(*Mortierellomycota*)、壶菌门

(*Chytridiomycota*)。不同处理间子囊菌门相对丰度有所不同，m 组中子囊菌门占绝对优势，相对丰度高达 97.44%。

在属的水平上，真菌的优势属主要包括 *Pezizales_gen_Incertae_sedis*、篮状菌属(*Talaromyces*)、曲霉属(*Aspergillus*)、核盘菌属(*Sclerotinia*)等。观察整个时期可以发现，第一次取样阶段核盘菌属(*Sclerotinia*)相对丰度较高，到第二次取样阶段核盘菌属(*Sclerotinia*)相对丰度逐渐降低，第四次取样阶段，盘菌属(*Sclerotinia*)达到未检出水平。

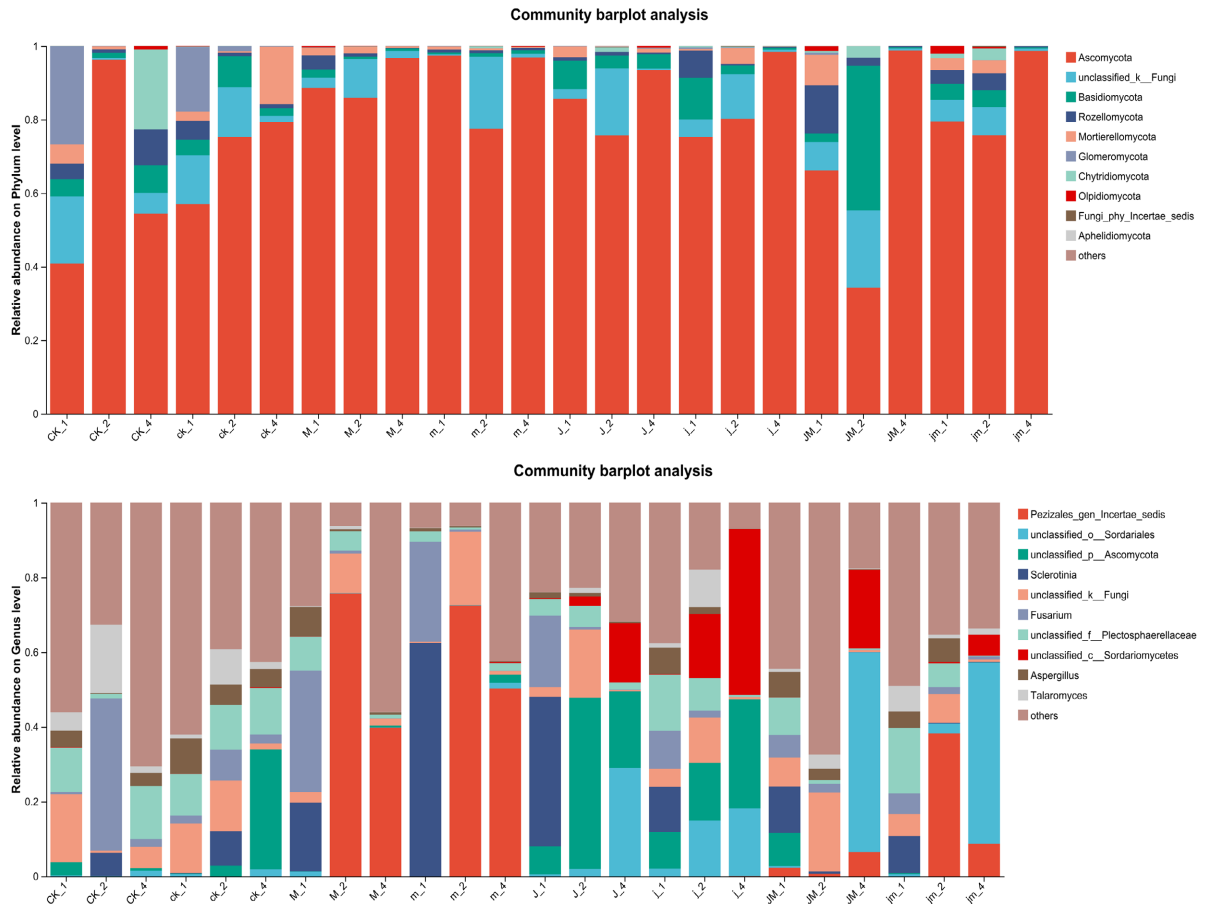


Figure 4. Heatmap illustrating the community structure of soil fungi at the phylum (upper) and genus (lower) taxonomic levels
图 4. 土壤真菌在门(上)和属(下)水平上的群落结构热图

3.5. 土壤理化性质、土壤酶活性与土壤真菌群落结构的相关性分析

RSD 处理后 NO_2^- -N、pH 和脲酶(Uren)与各处理间的相关性更高，且三者互为正相关关系。第二次取样时(图 5(b))有机碳、脲酶(Uren)、蔗糖酶(Urez)、 NH_4^+ -N、中性磷酸酶(Urel)是各处理间相关性最高的，且两两间互为正相关关系， NO_2^- -N、pH 与群落组成间的相关性相较第一次取样阶段有所下降。环境因子会对不同处理间土壤微生物群落结构的组成产生影响，观察整个时期可发现，相关性最高的是有机碳含量，不同处理组样本投影位置远离且分散，说明真菌群落组成受环境因子的影响显著($P < 0.05$)。

如图 6 所示，土壤有机碳含量对真菌群落中核盘菌属(*Sclerotinia*)、镰孢属(*Fusarium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、*GS11_gen_Incertae_sedis*、*Mortierellales_gen_Incertae_sedis* 影响最为显著；亚硝酸盐氮(NO_2^- -N)对篮状菌属(*Talaromyces*)、多球菌属(*Myriococcum*)、迈耶氏酵母属(*Meyerozyma*)影响最为显著；

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (氨态氮)对核盘菌属(*Sclerotinia*)、篮状菌属(*unclassified_k_Fungi*、*Talaromyces*)影响最为显著。本试验周期内菊花菌核病致病菌核盘菌属由一开始的优势属随着时间的推移含量大幅度降低至未检出水平,推测以上有益微生物相互作用,降低病原菌的生态位,抑制其生长繁殖。

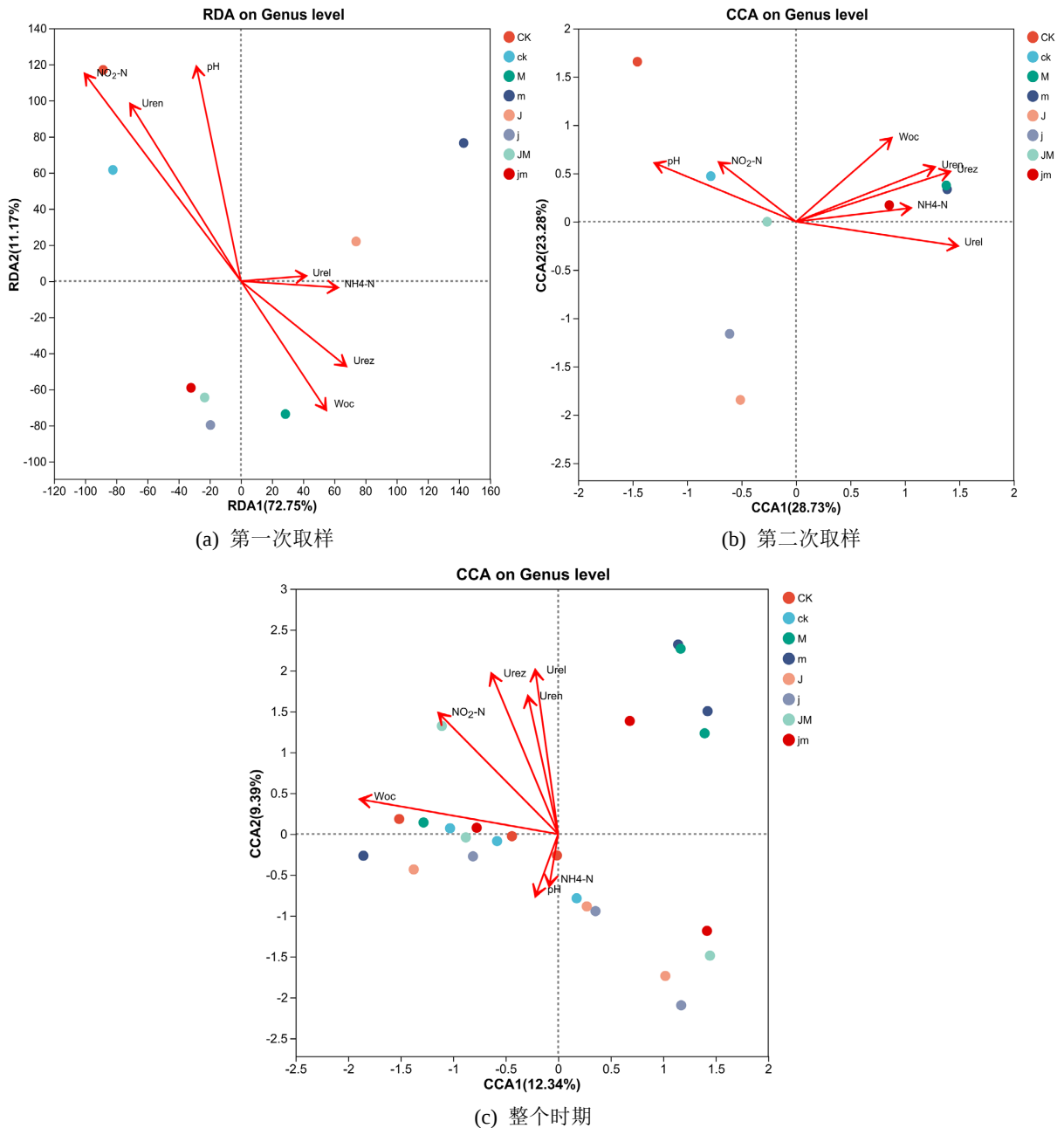


Figure 5. RDA analysis diagram of the correlation between fungi and soil environmental factors (at the genus level) (The data are presented as mean $\pm$ standard deviation. Lowercase letters indicate significant differences among different treatments within the same time period ($P < 0.05$); $\text{NH}_4^+\text{-N}$: ammonia nitrogen; Woc: organic carbon; $\text{NO}_2^-\text{-N}$: nitrite nitrogen; Urez: sucrose enzyme activity; Uren: urease activity; Urel: neutral phosphatase activity)

图 5. 真菌与土壤环境因子相关性 RDA 分析图(属水平) (数据用平均值 $\pm$ 标准差表示, 小写字母表示同一时间内不同处理间差异显著($P < 0.05$); $\text{NH}_4^+\text{-N}$: 氨态氮; Woc: 有机碳; $\text{NO}_2^-\text{-N}$: 亚硝酸盐氮; Urez: 蔗糖酶活性; Uren: 脲酶活性; Urel: 中性磷酸酶活性)

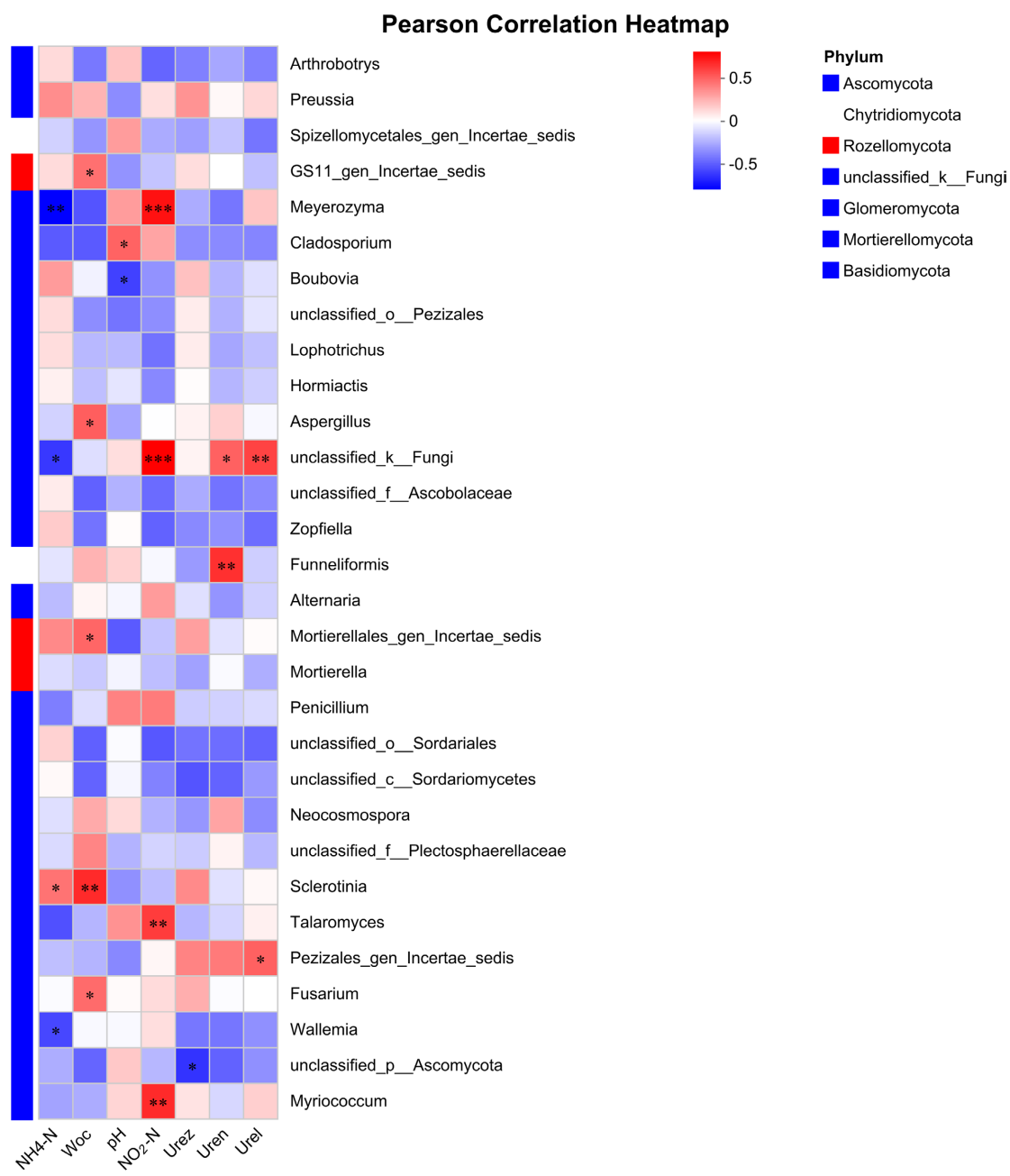


Figure 6. Heatmap of the correlation between environmental factors and fungi (at the genus level) (The X and Y axes represent environmental factors and species respectively. The correlation R values and P values were calculated. The R values are displayed in different colors in the figure. The legend on the right shows the color ranges for different R values: *P < 0.05, **P < 0.01)

图 6. 环境因子与真菌(属水平)相关性热图(X、Y 轴分别为环境因子和物种，计算获得相关性 R 值和 P 值。R 值在图中以不同颜色展示，右侧图例是不同 R 值的颜色区间，*代表 P < 0.05，**代表 P < 0.01)

4. 结论与展望

综上所述，本研究发现，麦麸用于 RSD 处理，能显著增加土壤氨氮、有机碳含量，提高蔗糖酶活性，肥田效果佳，且对菊花生物量促生效果最优，宜作 RSD 首选物料。RSD 可改变土壤真菌群落结构，促进有益微生物繁殖，大幅降低菊花菌核病致病菌核盘属丰度，抑制发病。添加纤维素降解菌在一定程度上

可促进有机物料分解,提升 RSD 效果。但因本研究为短期栽培试验,在揭示 RSD 处理对土壤微生物功能基因表达和代谢途径的影响方面存在局限。后续可设置 RSD 处理温度、延长试验周期,同时结合转录组技术,以更好地探明 RSD 抑制菊花菌核病的具体机制,提升菊花品质。

基金项目

安徽省教育厅重大重点科学研究项目(2022AH051093)、省部级重点实验室开放课题(2024CJZX04)、大学生创新创业训练计划项目(2024CXXL122, 2024CXXL111)。

参考文献

- [1] 李明远, 陈东亮, 李雪梅, 等. 李明远断病手迹(七十九)鉴定菊花菌核病[J]. 农业工程技术, 2017, 37(10): 76-79.
- [2] 陈发棣, 陈素梅, 房伟民, 张飞, 蒋甲福, 滕年军, 管志勇, 王海滨, 宋爱萍. 菊花优异种质资源挖掘与种质创新研究[J]. 中国科学基金, 2016, 30(2): 112-115.
- [3] 叶琪明, 郭方其, 吴超, 等. 浙江菊花菌核病的发生规律及防治研究初报[J]. 绿色科技, 2020(7): 164-165.
- [4] 王杰, 龙世芳, 王正文, 等. 番茄青枯病防治研究进展[J]. 中国蔬菜, 2020(1): 22-30.
- [5] 孙子欣, 蔡柏岩. 连作对土壤微生物菌群影响及修复研究进展[J]. 作物杂志, 2022(6): 7-13.
- [6] 杨顺超. 切花菊种质资源黑斑病和菌核病抗性评价与防治[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [7] 樊子婧. 强还原土壤灭菌法改善黄茛连作土壤及对土壤微生物群落的影响[D]: [硕士学位论文]. 兰州: 西北师范大学, 2022.
- [8] Gullino, M.L., Garibaldi, A., Gamliel, A. and Katan, J. (2022) Soil Disinfestation: From Soil Treatment to Soil and Plant Health. *Plant Disease*, **106**, 1541-1554. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-21-2023-fe>
- [9] 朱同彬, 孟天竹, 张金波, 等. 强还原方法对退化设施蔬菜地土壤的修复[J]. 应用生态学报, 2013, 24(9): 2619-2624.
- [10] 蔡祖聪, 张金波, 黄新琦, 等. 强还原土壤灭菌防控作物土传病的应用研究[J]. 土报, 2015, 52(3): 469-476.
- [11] 闫元元, 周开胜, 张金波, 等. 强还原土壤灭菌处理对连作病土改良效果的影响因素[J]. 土壤, 2022, 54(3): 508-516.
- [12] Gómez-Tenorio, M.A., Tello, J.C., Zanón, M.J. and de Cara, M. (2018) Soil Disinfestation with Dimethyl Disulfide (DMDS) to Control *Meloidogyne* and *Fusarium oxysporum* F. sp. *Radicis-Lycopersici* in a Tomato Greenhouse. *Crop Protection*, **112**, 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.05.023>
- [13] Ueki, A., Kaku, N. and Ueki, K. (2018) Role of Anaerobic Bacteria in Biological Soil Disinfestation for Elimination of Soil-Borne Plant Pathogens in Agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 6309-6318. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9119-x>
- [14] Muramoto, J., Shennan, C., Mazzola, M., Wood, T., Miethke, E., Resultay, E., et al. (2020) Use of a Summer Cover Crop as a Partial Carbon Source for Anaerobic Soil Disinfestation in Coastal California. *Acta Horticulturae*, No. 1270, 37-44. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2020.1270.4>
- [15] 石磊, 赵洪海, 李明亮, 等. 土壤强还原处理对根结线虫数量、番茄生长及土壤性质的影响[J]. 生态学杂志, 2018, 37(6): 1865-1870.
- [16] Ji, C., Ye, R., Yin, Y., Sun, X., Ma, H. and Gao, R. (2022) Reductive Soil Disinfestation with Biochar Amendment Modified Microbial Community Composition in Soils under Plastic Greenhouse Vegetable Production. *Soil and Tillage Research*, **218**, Article ID: 105323. <https://doi.org/10.1016/j.still.2022.105323>
- [17] 郭晨曦, 周桂芳, 陈碧华, 等. 强还原土壤灭菌法(RSD)对大棚连续三茬蔬菜生长、产量和病虫害的影响[J]. 河南农业科学, 2020, 49(11): 98-109.
- [18] 宋涛, 穆德梅, 邹海明, 等. 纤维素降解菌的筛选及其对水稻秸秆降解效果[J/OL]. 安徽科技学院学报: 1-7. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1300.N.20250520.1344.002.html>, 2025-05-30.
- [19] 张晶. 秸秆还田土壤中与纤维素降解相关的微生物的分子生态学研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海交通大学, 2007.
- [20] 张斯童, 兰雪, 李哲, 等. 微生物降解玉米秸秆的研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(5): 517-522.
- [21] 张立霞. 纤维降解菌组合的筛选、优化及对玉米秸秆的降解效果[D]: [硕士学位论文]. 北京: 中国农业科学院, 2014.