泽漆内生菌的分离筛选及其对烟粉虱的毒杀作用

朱素君[1,2] 陈建斌[2] 杜 娇[2] 杜晓华[2] 张松柏[2] 刘 勇[2,3*] 史晓斌[1,2*]

（1. 湖南大学隆平农学院，长沙 410125；2. 湖南省农业科学院植物保护研究所，长沙 410125；
3. 岳麓山实验室，长沙 410125）

摘要：为发掘泽漆 *Euphorbia helioscopia* 内生菌资源并筛选用于生物防治烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的高效菌株，以泽漆茎和叶片为材料，采用组织块分离法与组织匀浆法分离内生菌，采用透明圈法初筛具有产蛋白酶和几丁质酶能力的菌株，利用3，5-二硝基水杨酸法测定初筛菌株的几丁质酶活性，并采用饲喂法测定目标菌株发酵液上清液及其粗酶液对烟粉虱的毒杀作用，结合形态学观察与分子生物学鉴定方法对目标菌株进行鉴定。结果表明：从泽漆茎、叶片中共分离45株菌株，其中4株菌株同时具有产蛋白酶和几丁质酶的能力。在这4株菌株中，菌株J3在蛋白酶检测平板中出现透明圈，同时在几丁质酶检测平板上也生成透明圈，透明圈边缘清晰，透亮均一，清晰度高。随发酵时间延长菌株J3中几丁质酶活性呈规律性动态变化，有较大的产酶潜力。菌株J3发酵液上清液和粗酶液对烟粉虱均有毒杀作用，处理48 h时烟粉虱成虫的死亡率分别达78.00%和96.67%。结合形态学观察和分子生物学鉴定方法将菌株J3鉴定为链霉菌属 *Streptomyces* sp.。表明从泽漆茎、叶中分离纯化获得的菌株J3可作为生物防治烟粉虱的潜在菌种资源。

关键词：烟粉虱；泽漆；内生菌；几丁质酶；杀虫活性

Isolation and screening of endophytes from sun spurge *Euphorbia helioscopia* and their insecticidal effects against tobacco whitefly *Bemisia tabaci*

Zhu Sujun[1,2] Chen Jianbin[2] Du Jiao[2] Du Xiaohua[2] Zhang Songbai[2] Liu Yong[2,3*] Shi Xiaobin[1,2*]

（1. Longping Agricultural College, Hunan University, Changsha 410125, Hunan Province, China; 2. Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, Hunan Province, China;
3. Yuelu Mountain Laboratory, Changsha 410125, Hunan Province, China）

Abstract: To explore endophytic microbial resources from sun spurge *Euphorbia helioscopia* and obtain high-efficiency strains for the biological control of tobacco whitefly *Bemisia tabaci*, endophytes were isolated from the stems and leaves of *E. helioscopia* using tissue segment separation and tissue homogenization techniques. Strains with the ability to produce protease and chitinase were preliminarily screened using the clear zone method. The chitinase activity of the primarily screened strains was determined by the 3, 5-dinitrosalicylic acid method. The toxic effect of the fermentation supernatant and crude enzyme solution of the target strain against *B. tabaci* was evaluated using the feeding method. The target strain was identified with morphological observation and molecular biological methods. The results showed that a total of 45 strains were isolated from the stems and leaves of *E. helioscopia*, and four strains capable of producing both protease and chitinase were obtained from the primary screening. Among these four strains, strain J3 produced clear zones on both protease and chitinase detection plates, with the zones exhibiting clear edges, transparency, uniformity, and high definition. The chitinase activ-

基金项目：国家重点研发计划项目(2022YFD1400700)，国家大宗蔬菜产业技术体系项目(CARS-23-C02)

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：liuyong@hunaas.cn，shixiaobin@hunaas.cn

收稿日期：2026-04-29

ity of strain J3 showed a regular dynamic change over fermentation time, indicating a high enzyme-producing potential. Both the fermentation supernatant and crude enzyme solution of strain J3 exhibited insecticidal activity agains *B. tabaci*, with the mortalities of adult whiteflies reaching 78.00% and 96.67%, respectively, after 48 h of treatment. Strain J3 was identified as *Streptomyces* sp. based on morphological observation and molecular biological identification. These results indicate that strain J3 isolated and purified from the stems and leaves of *E. helioscopia* can serve as a potential microbial resource for the biological control of *B. tabaci*.

Key words: *Bemisia tabaci*; *Euphorbia helioscopia*; endophytic bacteria; chitinase; insecticidal activity

烟粉虱*Bemisia tabaci*属于半翅目粉虱科，是一种在全球范围内造成重大损失的农业害虫，具有广泛的寄主适应性，不仅为害多种蔬菜作物，还会对某些大田作物以及众多园林花卉植物造成危害（代江瑞等，2026；张正炜等，2026）。烟粉虱可以通过刺吸式口器直接取食植物汁液，导致植株衰弱，甚至死亡，其分泌的蜜露诱发煤污病，影响光合作用，同时还传播多种植物病毒，引发病毒病流行，进一步加剧产量损失（张正炜等，2026）。目前，化学防治仍是防控烟粉虱的主要手段，但长期过量使用化学农药不仅导致害虫产生抗性，而且还引发环境污染、农药残留超标和食品安全等一系列问题（杨鑫等，2014；褚栋和张友军，2018）。因此，挖掘对生态环境友好、高效稳定的绿色防控技术和生物防治资源已成为农业病虫害研究的焦点。

植物内生菌是指定殖于健康植物各组织和器官内部、不引起宿主明显病害且与宿主形成互惠共利关系的一类微生物，包括细菌、真菌和放线菌等类群（Nasiruddin et al.，2020）。在长期的协同进化过程中，内生菌与宿主植物形成了紧密的代谢关联，内生菌能产生丰富的次生代谢产物和酶类物质，这些代谢物质能诱导植物产生系统抗性，在促进植物生长、增强植物抗逆性和抵御病虫害等方面发挥着重要作用（杜永新等，2010；张静怡等，2025；张敏等，2025）。药用植物含有大量天然次生代谢物质，内生菌可以利用药用植物特有组分合成结构新颖、特异性显著的生物活性代谢产物（Diab et al.，2023）。因此，挖掘富集于药用植物中的内生菌资源是发掘天然生物活性物质的一种有效途径。泽漆*Euphorbia helioscopia*是大戟科大戟属*Euphorbia*植物，广泛分布于中国各地，是一种传统药用植物，其含有多种活性成分，具有杀虫、杀菌作用，常用于临床治疗（戴传超等，2006；王丽莎，2014）。自泽漆组织中可分离得到多种内生微生物，部分内生菌还具有抗菌、抗病毒活性，根据内生菌可以产生与宿主相同或相似活性成分的理论，推测泽漆内生菌资源多样且功能丰富（谷苏等，2001）。例如，李文华等（2008）从泽漆组织中分离得到的内生放线菌具有明显的抗病毒活性。但关于泽漆内生菌杀虫活性的研究较少。

昆虫的外骨骼、肠道围食膜、卵壳以及肌肉附着位点等结构中富含几丁质和蛋白质，是维持昆虫正常生长发育的关键物质（Beygmoradi et al.，2018；Dikbaş et al.，2021），而蛋白酶和几丁质酶可分别特异性降解蛋白质和几丁质，破坏昆虫体壁结构和肠道功能，最终导致昆虫死亡。因此，靶向害虫体内几丁质和蛋白质进行害虫生物防治，是一种无毒、环境友好且不易引发昆虫抗药性的防治手段（Ezzine et al.，2024；Dikbaş et al.，2025）。几丁质酶可水解病原真菌和昆虫体壁中的几丁质，蛋白酶可降解昆虫体壁蛋白和肠道消化酶，二者协同作用可增强对昆虫的致病力（Fang et al.，2005）。例如，Segura-Vega et al.（2024）研究证实产蛋白酶和几丁质酶的微生物对害虫有较好的杀虫活性，是生防菌株筛选的重要指标。Liu et al.（2023）研究发现在侵染蚜虫过程中蜡蚧菌*Lecanicillium araneicola* HK-1菌株可产生胞外蛋白酶和几丁质酶，该菌株发酵液中的乙酸乙酯粗提物能显著抑制蚜虫羧酸酯酶活性，并诱导谷胱甘肽*S*-转移酶和乙酰胆碱酯酶活性，导致蚜虫因生理紊乱而死亡。目前，关于内生菌对烟粉虱的杀虫研究多集中于昆虫病原真菌，而关于植物内生菌的相关研究相对匮乏，且以泽漆为宿主，以蛋白酶、几丁质酶为靶标筛选内生菌，测定其对烟粉虱毒杀作用的报道更少。

为挖掘泽漆内生菌资源，丰富植物内生菌生防应用体系，本研究以泽漆为研究材料，系统分离其叶片和茎内的内生菌，以蛋白酶和几丁质酶活性为筛选靶标，锁定具有潜在杀虫能力的目标菌株；进一步通过生物测定试验验证目标菌株对烟粉虱的毒杀作用，明确其生防潜力，以期为烟粉虱的绿色防控提供新的菌株资源，同时为泽漆药用植物资源的多元化

利用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫与植物：烟粉虱为湖南省农业科学院植物保护研究所于温室棉花上人工饲养的试验种群，温室的平均温度为(26±2) ℃，相对湿度为(70±5)%，光周期为14 L∶10 D，取成虫供试。泽漆植株采自湖南省农业科学院草地上。

培养基：高氏一号培养基成分为可溶性淀粉20 g、磷酸氢二钾0.5 g、硝酸钾1 g、七水硫酸镁0.5 g、氯化钠0.5 g、七水合硫酸亚铁0.01 g、琼脂粉20 g，蒸馏水定容至1 L；几丁质酶检测培养基成分为2%胶体几丁质400 mL、磷酸二氢钾2 g、硫酸铵3 g、琼脂粉15 g、七水合硫酸镁0.3 g，蒸馏水定容至1 L，30%磷酸氢二钾(称取3 g溶解至10 mL纯水中)缓慢滴加，调节pH至6.5；蛋白酶检测培养基成分为琼脂粉3 g、脱脂奶粉10 g、蒸馏水200 mL，灭菌后晾凉至50 ℃左右后倒制平板；酵母膏-麦芽膏液体培养基成分为麦芽浸膏10 g、酵母浸粉4 g、葡萄糖4 g，蒸馏水定容至1 L，pH 7.0~7.5；几丁质酶发酵培养基成分为磷酸氢二钾0.7 g、磷酸二氢钾0.3 g、七水合硫酸镁0.5 g、七水合硫酸亚铁0.02 g、氯化钠5 g、蛋白胨10 g、2%胶体几丁质500 mL、微量元素溶液1 mL，蒸馏水定容至1 L，pH自然或者调至7.0；胰蛋白胨大豆肉汤(tryptone soy broth，TSB)培养基成分为胰蛋白胨17 g、大豆蛋白胨3 g、氯化钠5 g、磷酸氢二钾2.5 g、葡萄糖2.5 g，蒸馏水定容至1 L，pH 7.0~7.2。以上培养基均于121 ℃高温灭菌20 min。

试剂及仪器：革兰氏染色试剂盒，北京酷来搏科技有限公司；细菌基因组DNA提取试剂盒，北京金百特生物技术有限公司；2×S705 HiFi Master Mix，江苏愚公生物科技有限公司；96孔酶标板，常德比克曼生物科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。Eon全波长微孔板分光光度计，美国伯腾仪器有限公司；FlexCycler PCR基因扩增仪，德国耶拿分析仪器公司；S8AP0体式显微镜，德国徕卡显微系统有限责任公司；Axio Observer倒置显微镜，德国卡尔蔡司股份公司；DYY-6C型水平电泳仪，北京市六一生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 泽漆内生菌的分离纯化

将采集到的泽漆植株用清水洗净，晾干后用无菌镊子、剪刀将健康状态一致的泽漆植株的叶片和茎剪成长1~2 cm的小段。在超净台内用蒸馏水将叶片和茎表面清洗3次以上，用无菌滤纸吸干表面水分；置于75%酒精中消毒1 min，无菌水漂洗3次，每次1 min；再用5%次氯酸钠溶液表面消毒3 min，无菌水漂洗3次，每次1 min；用5%硫代硫酸钠溶液表面消毒5 min，无菌水漂洗5次，每次1 min左右；最后1次换瓶漂洗，无菌滤纸吸干水分，用无菌剪刀将叶和茎裁剪成5 mm×5 mm的小块。无菌镊子夹取叶片和茎的小块均匀摆放在高氏一号培养基中间，每个培养皿上接入4块组织。精确称取1.0 g叶片，消毒步骤同上，将消毒后的叶片转入无菌研钵中，加入10 mL无菌水研磨至无明显组织块的细腻匀浆状，静置沉降，吸取上清液200 μL涂布于高氏一号培养基中。同时用移液枪吸取100 μL消毒流程中最后一次换瓶漂洗所用的无菌水，均匀涂布于高氏一号培养基中，观察是否长出菌落，以验证是否对植物组织进行彻底消毒。将培养皿倒置于28 ℃恒温培养箱中培养7~30 d，每天观察内生菌生长情况，及时用接种环将长出的菌挑出，采用划线法接种到新的培养基中，观察是否染菌，不断进行分离纯化，直至纯化出单一菌株，接种于高氏一号斜面培养基上，于4 ℃保藏。

1.2.2 产酶菌株的初筛和复筛

目前关于几丁质酶防控虫害的研究比较多，所以本研究主要以几丁质酶为主要靶标进行筛选。

产酶菌株的初筛：将分离纯化的菌株于高氏一号平板上划线，倒置于28 ℃恒温培养箱中培养3~5 d；用无菌打孔器在活化平板上打取直径为7 mm的菌饼，接入蛋白酶检测平板中央，于28 ℃下恒温培养，观察是否出现透明圈；如果出现透明圈，说明酪蛋白被降解，产生了蛋白酶，反之则未产生蛋白酶。将分离纯化的菌株于高氏一号平板上划线，倒置于28 ℃恒温培养箱中培养3~5 d，向活化平板中加入10 mL无菌水，用无菌涂布棒进行涂布，制备菌悬液；取10 μL菌悬液滴加至几丁质酶检测平板中央，于28 ℃下恒温培养，观察是否出现透明圈；如果出现透明圈，说明胶体几丁质被降解，产生了几丁质酶，反之则未产生几丁质酶；观察并记录透明圈直径与菌落直径，计算直径比，直径比=透明圈直径/菌落直径。根据直径比和清晰度判断菌株产几丁质酶的能力。

产酶菌株的复筛：配制浓度为0.2 mg/mL的N-乙酰-D-氨基葡萄糖标准溶液，取0.3~0.9 mL加入到5 mL离心管中，加入蒸馏水补足至1 mL。加入1.5 mL 3，5-二硝基水杨酸(3，5-dinitrosalicylic acid，DNS)

试剂，100 ℃沸水浴5 min，立即用流水冷却至室温。取200 μL加入到96孔酶标板中，测定波长540 nm处的吸光度值$OD_{540\,nm}$。以N-乙酰-D-氨基葡萄糖含量为横坐标，以$OD_{540\,nm}$为纵坐标绘制DNS标准曲线。将初筛得到的既产蛋白酶又产几丁质酶的菌株接种至几丁质酶发酵培养基中，于28 ℃、200 r/min条件下振荡培养，每两天取样1次；于4 ℃、6 000 r/min条件下离心10 min，取上清液即为粗酶液。取0.5 mL粗酶液和等体积的1%胶体几丁质以及0.1mol/L磷酸钠缓冲液（pH 7.0）混合，50 ℃水浴30 min，加入1 mL DNS试剂终止反应，于100 ℃沸水浴5 min，冷却后测定$OD_{540\,nm}$。以灭活的粗酶液为对照。根据DNS标准曲线计算几丁质酶活性。每分钟催化几丁质水解生成1 μmol N-乙酰-D-氨基葡萄糖所需要的酶量即为几丁质酶活性。试验重复3次，选择酶活性稳定的目标菌株进行后续试验。

1.2.3 *产酶菌株发酵液及粗酶液杀虫活性的测定*

将1.2.2筛选得到的菌株接种到高氏一号培养基上，28 ℃培养7 d，在超净台中用无菌接种环挑取单菌落接种到装有2 mL酵母膏–麦芽膏液体培养基的5 mL无菌离心管中，于28 ℃、200 r/min条件下振荡培养48 h；转接到装有50 mL酵母膏–麦芽膏液体培养基的250 mL锥形瓶中，于28 ℃、200 r/min条件下振荡培养48 h；按照5%接种量接种到TSB培养基中，于28 ℃、200 r/min条件下在恒温摇床中振荡培养7 d，取TSB发酵液于6 000 r/min条件下离心20 min，取上清液通过孔径为0.22 μm的微孔滤膜过滤，除去菌体，即为发酵液上清液。其他方法同上，仅是将菌株按照5%接种量接种到几丁质酶发酵培养基中，于28 ℃、200 r/min条件下恒温摇床振荡培养7 d，取几丁质酶发酵液于6 000 r/min条件下离心20 min，即获得菌株J3的粗酶液。取菌株J3发酵液上清液与15%蔗糖水溶液各100 μL混合，配制得到发酵液上清液待测饲喂液。取菌株J3粗酶液与15%蔗糖水溶液各100 μL混合，配制得到粗酶液待测饲喂液。

选取两端通透、长6 cm、内径3 cm的玻璃饲养管，其外壁均匀包裹锡箔纸，以避免强光干扰烟粉虱取食行为。饲养管的一端先覆盖一层经4~5倍均匀拉伸的单层封口膜。用移液枪精准吸取200 μL上述上清液和粗酶液待测饲喂液，滴加至底层拉伸的封口膜表面，用一层封口膜覆盖，防止饲喂液挥发及活性成分流失。从饲养管另一端接入生理状态一致的烟粉虱成虫，每管放入100~120头（1个重复），饲养管另一端用透气性良好的海绵封住，既能保证管内通气，又能防止试虫逃逸。取未接种菌株J3的TSB培养基和几丁质酶发酵培养基离心后的上清液各100 μL分别与15%蔗糖水溶液100 μL混合作为对照，每个处理重复3次。将饲养管置于温度（26±2）℃、相对湿度（70±5）%、光周期14 L∶10 D的温室中培养。处理24 h和48 h时观察烟粉虱的死亡情况并记录，计算死亡率。轻敲管壁试虫完全不动且触角、足等附肢无任何反应则判定试虫死亡。死亡率=死亡虫数量/供试总虫数量×100%。处理48 h后每个处理随机选取30头死亡试虫，于体视显微镜下观察试虫的形态特征。

1.2.4 *产酶菌株的鉴定*

形态学特征观察：将分离纯化的目标菌株接种到高氏一号培养基上，于28 ℃培养5 d，观察菌落形态特征。在载玻片中央滴几滴生理盐水，用无菌接种环挑取菌落置于生理盐水中涂布，待自然干燥后经火焰固定，固定温度以载玻片背面接触手背不烫为准。将固定后的涂片分别用革兰氏染色试剂盒和美蓝染色液进行染色，将载玻片置于光学显微镜下观察并记录菌丝形态结构，是否产孢以及孢子的形状。待测菌株制备3张独立平行染色载玻片；每张载玻片随机选取5~10个互不重叠的油镜视野进行观察记录。

分子生物学鉴定：使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取目标菌株的总DNA。以细菌的通用引物27-F（5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′）/1492-R（5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′）为引物进行*16S rRNA*基因扩增，引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成。50 μL PCR反应体系：2×S705 HiFi Master Mix 25 μL、10 μmol/L上下游引物各1 μL、模板DNA 1 μL、ddH_2O 22 μL。PCR扩增条件：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性10 s，55~72 ℃退火15 s，72 ℃延伸1 min，35个循环；72 ℃终延伸5 min。采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。PCR产物委托北京擎科生物科技股份有限公司进行序列测定。将测序后目标菌株的*16S rRNA*提交至NCBI网站进行BLAST序列比对，通过MEGA 7.0软件采用邻接法构建系统发育树，从而确定目标菌株在发育树中的位置和种属关系。系统发育树重复1 000次。

1.3 数据分析

采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析，两者之间采用独立样本*t*检验法进行差异显著性检验，三者及以上使用Tukey法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离纯化

从健康的泽漆植株叶片和茎两个部位共分离获得45株菌株，其中自叶片分离获得40株菌株，编号分别为Y1~Y40；自茎分离获得5株菌株，编号分别为J1~J5（表1）。自叶片中分离的40株菌株中，其中组织块分离法得到13株菌株，组织匀浆法分离得到27株菌株；自茎中分离的5株菌株均采用组织块分离法获得。对照培养2~3周，无菌落生长，表明对植物组织消毒彻底，分离得到的菌株均为泽漆的内生菌。

表1 泽漆内生菌产几丁质酶菌株的初筛

Table 1 Preliminary screening of endophytic strains from *Euphorbia helioscopia* for chitinase production

菌株 Strain	透明圈清晰度 Clarity of the clear zone	直径比 Diameter ratio	菌株 Strain	透明圈清晰度 Clarity of the clear zone	直径比 Diameter ratio
Y1	−	/	Y24	−	/
Y2	−	/	Y25	−	/
Y3	−	/	Y26	−	/
Y4	−	/	Y27	−	/
Y5	−	/	Y28	−	/
Y6	−	/	Y29	−	/
Y7	−	/	Y30	−	/
Y8	−	/	Y31	−	/
Y9	−	/	Y32	−	/
Y10	++	1.117	Y33	−	/
Y11	−	/	Y34	−	/
Y12	−	/	Y35	++	1.458
Y13	++	1.242	Y36	−	/
Y14	++	1.769	Y37	−	/
Y15	−	/	Y38	−	/
Y16	−	/	Y39	−	/
Y17	−	/	Y40	−	/
Y18	−	/	J1	−	/
Y19	−	/	J2	+++	1.137
Y20	−	/	J3	+++	1.599
Y21	−	/	J4	+++	1.282
Y22	−	/	J5	−	/
Y23	−	/			

−：无透明圈；+、++、+++：透明圈清晰度、良好和优异。−：No clear zone; +, ++, +++: clarity of the clear zone is moderate, good, and excellent.

2.2 产酶菌株的初筛结果

在分离获得的45株菌株中，有6株菌株可以产蛋白酶，分别是Y6、Y8、Y13、Y14、J2、J3，有7株菌株可以产几丁质酶，分别是Y10、Y13、Y14、Y35、J2、J3、J4（表1），其中Y13、Y14、J2和J3菌株既能产蛋白酶又能产几丁质酶。产几丁质酶能力由大到小分别为Y14、J3、Y35、J4、Y13、J2和Y10菌株，其直径比分别为1.769、1.599、1.458、1.282、1.242、1.137和1.117（表1）。菌株J3在蛋白酶检测平板中出现透明圈，同时在几丁质酶检测平板上也生成透明圈，透明圈边缘清晰，透亮均匀，清晰度高（图1），因此选择菌株J3进行复筛。

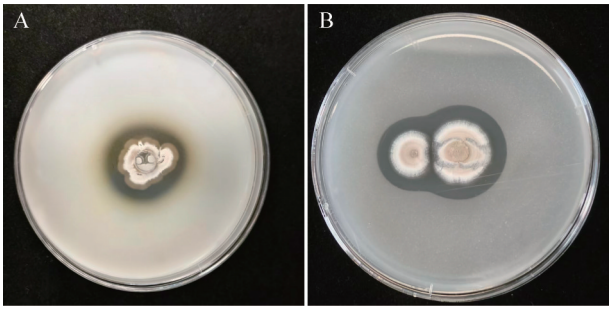


图1 菌株J3在蛋白酶检测平板上（A）和几丁质酶检测平板上（B）产生的透明圈

Fig. 1 Clear zones produced by strain J3 on protease detection plate (A) and chitinase detection plate (B)

2.3 产酶菌株的复筛结果

菌株J3发酵过程中几丁质酶的活性存在显著差异（$P<0.05$）。菌株J3发酵前期，菌体处于快速增殖中，几丁质酶活性较低；随着时间延长菌体进入稳定生长期，受底物诱导开始分泌胞外几丁质酶，几丁质酶活性持续升高，发酵5 d时几丁质酶活性达到峰值，为11.37 U/L；菌株J3发酵后期，营养耗竭、代谢废物积累及菌体衰老，几丁质酶活性逐步下降（图2）。

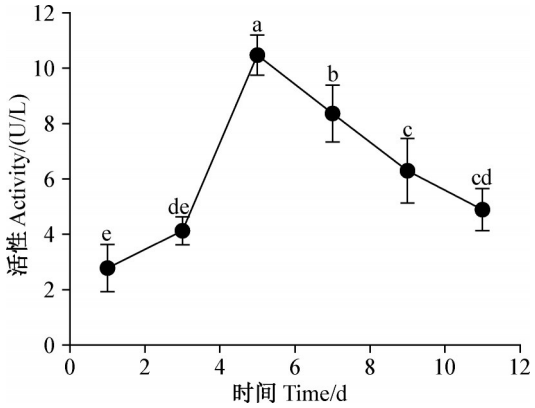


图2 菌株J3发酵过程中几丁质酶的活性变化

Fig. 2 Changes in chitinase activity during fermentation of strain J3

数据为平均数±标准误。不同小写字母经Tukey法检验差异显著（$P<0.05$）。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference according to Tukey's test ($P<0.05$).

2.4 产酶菌株发酵液上清液和粗酶液的杀虫活性

2.4.1 产酶菌株发酵液上清液对烟粉虱的毒杀作用

菌株J3发酵液上清液处理24 h和48 h时，烟粉虱成虫的死亡率分别为14.67%和78.00%，前者与对照差异不显著，后者极显著高于对照（$P<0.001$，图3-A）。表明菌株J3发酵液上清液对烟粉虱成虫有一定的毒杀作用，有开发为生防制剂的潜力。

对照处理后，烟粉虱成虫整体饱满，体色呈均匀亮黄色，蜡质层完整，双翅呈屋脊状合拢的状态（图4-A）；菌株J3发酵液上清液处理后，烟粉虱成虫死亡的形态特征与对照明显不同；烟粉虱成虫腹部明显塌陷皱缩，蜡质层脱落，失去光泽，体色转为浅黄褐色或苍白色，头胸部出现轻微褐变，翅僵硬平展，足和触角僵直，部分个体体壁软化破损，且虫体表面无菌丝或孢子附着（图4-B）。

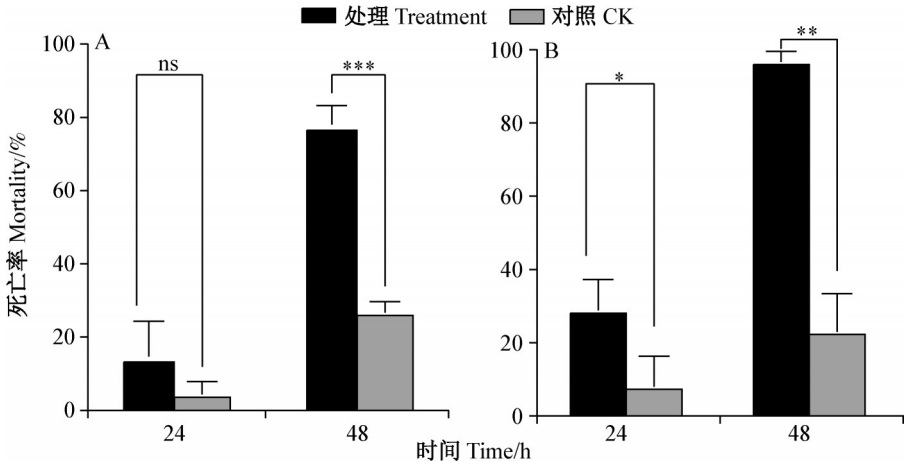


图3 菌株J3发酵液上清液（A）和粗酶液（B）对烟粉虱成虫的死亡率

Fig. 3 Mortalities of fermented liquid supernatant (A) and crude enzyme solution (B) of strain J3 against *Bemisia tabaci* adult

图中数据为平均数±标准误。*、**、***表示处理与对照之间经独立样本*t*检验法检验差异显著（$P<0.05$、$P<0.01$或$P<0.001$）。Data are presented as mean±SE. *, **, *** indicates significant differences between treatment and CK according to the independent samples *t* test ($P<0.05$, $P<0.01$ or $P<0.001$).

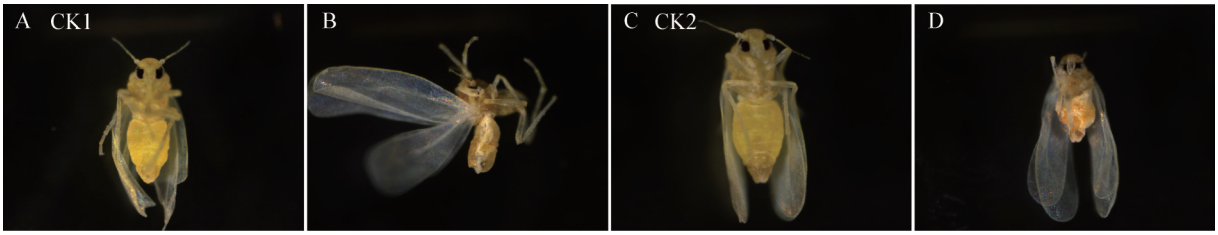


图4 菌株J3发酵液上清液（B）和粗酶液（D）处理48 h时烟粉虱的形态特征

Fig. 4 Morphologies of *Bemisia tabaci* after 48 h of treatment with fermentation supernatant (B) and crude enzyme extract (D) of strain J3

2.4.2 产酶菌株粗酶液对烟粉虱的毒杀作用

菌株J3粗酶液对烟粉虱成虫同样有较好的毒杀作用。菌株J3粗酶液处理24 h和48 h时，烟粉虱成虫的死亡率分别为28.90%和96.67%，前者与对照差异显著（$P<0.05$），后者极显著高于对照（$P<0.01$，图3-B）。菌株J3粗酶液处理后，烟粉虱成虫死亡的形态特征与对照明显不同，烟粉虱成虫腹部塌陷皱缩，蜡质层脱落，失去光泽，体色变浅（图4-C~D）。表明菌株J3发酵液上清液和粗酶液中次生代谢物以及几丁质酶、蛋白酶等活性物质通过破坏体壁屏障导致试虫虫体快速失水，推测这可能是由酶解等生化作用引起的一种失水死亡模式。

2.5 产酶菌株的形态学鉴定

在高氏一号培养基上菌株J3生长良好。气生菌丝呈圆形或不规则形，直径3~8 mm，质地致密干燥，表面为灰白色至乳白色颗粒状，由气生菌丝及孢子构成，边缘羽毛状、具细密褶皱（图5-A）；基内菌丝呈淡黄色至浅黄白色，无水溶性色素，菌落与培养

基结合紧密、质地坚韧(图5-B)。美蓝染液染色后，菌丝形态清晰，呈分枝状(图5-C)；革兰氏染色呈阳性，菌丝及孢子均被染为紫色(图5-D)。根据形态学特征初步将菌株J3鉴定为链霉菌属*Streptomyces* sp.。

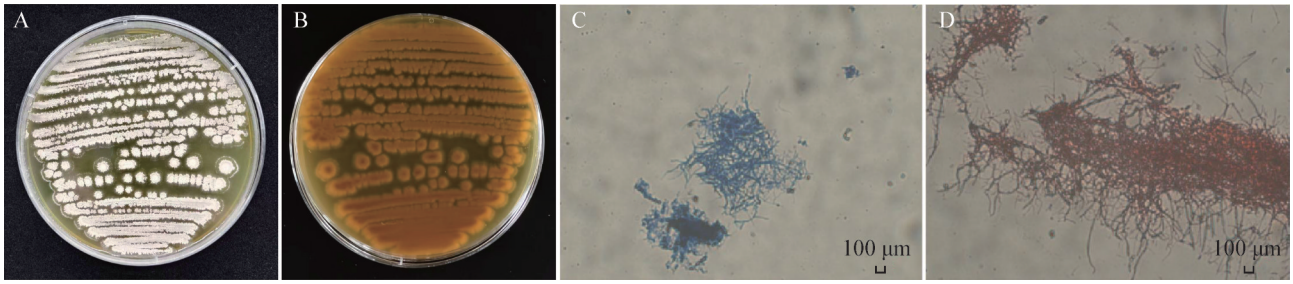


图5 菌株J3的菌落正面(A)、反面(B)、菌体形态特征(C)及革兰氏染色图(D)

Fig. 5 Front (A) , reverse (B) views of colony morphology, mycelial morphological characteristics (C), and Gram staining (D) of strain J3

2.6 产酶菌株的分子生物学鉴定

菌株J3的*16S rRNA*基因序列长度为1 375 bp(图6)。菌株J3的*16S rRNA*基因序列与禾粟链霉菌*S. graminearius*菌株NBRC15420的*16S rRNA*基因序列的同源性最高，相似度达98.91%，与葱绿毛链霉菌*S. prasinopilosus*菌株DSM40098T、鼠灰链霉菌*S. murinus*菌株NBRC14802的*16S rRNA*基因序列的同源性次之，相似性达98.84%。

系统发育分析结果显示，菌株J3与禾粟链霉菌菌株NBRC15420、葱绿毛链霉菌菌株DSM40098T和鼠灰链霉菌菌株NBRC14802聚在同一分支上，亲缘关系最近(图7)。结合形态学鉴定、序列比对及系统发育分析，将菌株J3鉴定为链霉菌属*Streptomyces* sp.。

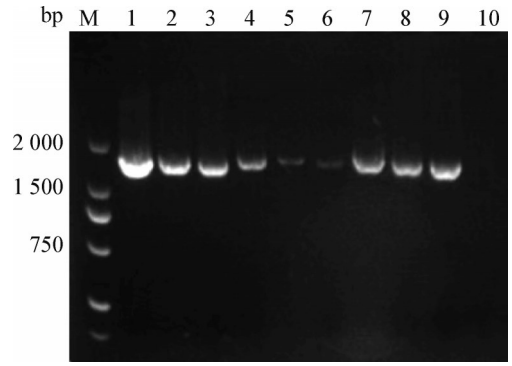


图6 菌株J3 *16S rRNA*基因序列PCR扩增产物电泳图

Fig. 6 Electrophoresis of PCR-amplified products of the *16S rRNA* gene sequence of strain J3

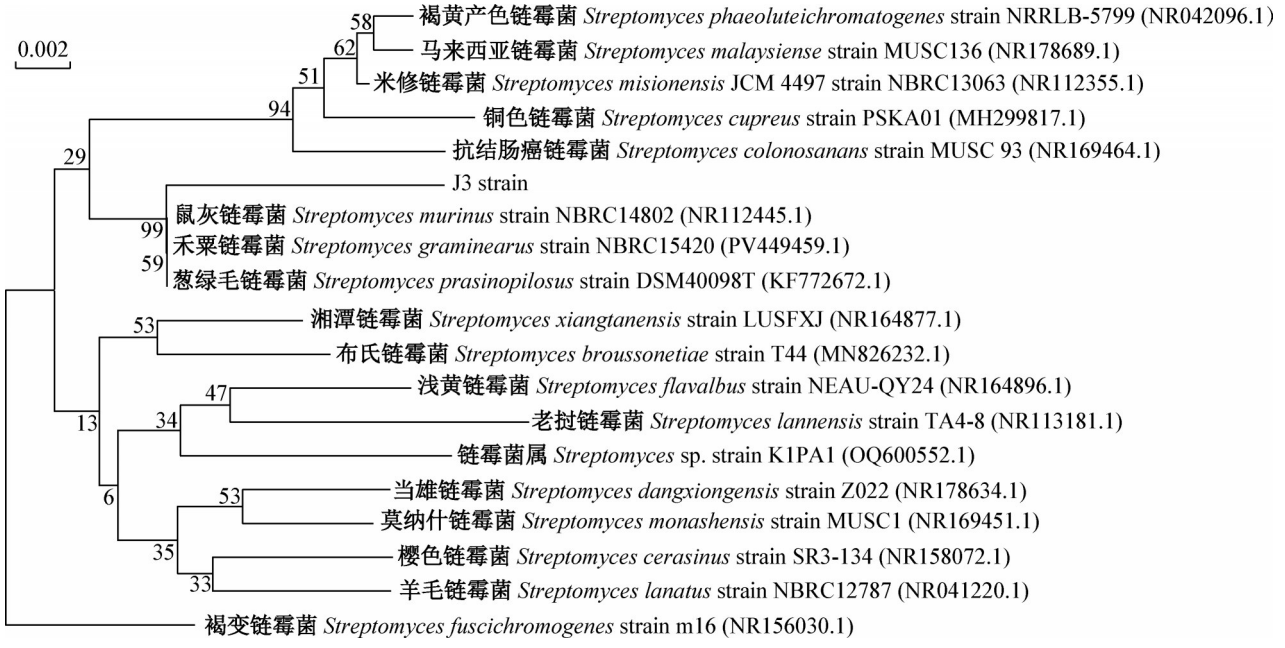


图7 基于*16S rRNA*基因序列采用邻接法构建菌株J3与相关菌株的系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree of strain J3 and related strains constructed based on *16S rRNA* sequence using the neighbor-joining method

3 讨论

泽漆植株体内蕴含丰富的内生微生物。例如，李文华等(2008)从泽漆组织中分离得到具有明显抗病毒活性的内生放线菌；王丽莎等(2014)研究发现泽漆提取物对麦长管蚜 *Sitobion avenae* 有一定的毒杀作用；宋庭宁等(2019)研究发现泽漆叶片中内生菌物种丰富。本研究从泽漆植株茎和叶片中共分离得到45株内生菌菌株，证实了其蕴含丰富的内生微生物。

几丁质酶与蛋白酶可以作为杀虫菌株筛选的核心靶标(da Cruz et al.，2022)。几丁质是昆虫体壁与外骨骼的主要成分，不仅维持虫体刚性与形态，防止昆虫体表水分流失，而且几丁质也是消化道及包裹中肠围食膜的核心成分。几丁质酶能水解昆虫体内的几丁质，破坏其体表屏障，进而导致昆虫死亡(Zhang et al.，2011；Hariprasad，2016；Pesch et al.，2016)。以几丁质酶为分子靶点，通过酶解反应降解靶标生物几丁质，进而实现对植物病虫害的绿色防控(Wu et al.，2025)。本研究采用经典透明圈法初步筛选得到4株既产蛋白酶又产几丁质酶的菌株，在这4株菌株中，菌株J3在几丁质酶检测平板上产生的透明圈界限清晰、透明度高、清晰度高，并且透明圈内透亮均一、无肉眼可辨的胶体颗粒残留。本研究的复筛结果显示，在菌株J3发酵过程中几丁质酶活性呈现先快速上升、达到峰值后逐步下降的动态变化规律，表明其有良好的产酶能力。酶活性表达受发酵条件、诱导底物等诸多因素调控，后续可通过延长发酵周期、优化培养基配方与发酵参数等进一步挖掘其产酶潜力。

尽管菌株J3体外测定的几丁质酶绝对活性水平不是很高，但仍表现出一定的杀虫作用。菌株J3粗酶液处理48 h后对烟粉虱成虫的死亡率高达96.67%，显著优于其发酵液上清的毒杀效果(78.00%)；发酵液上清和粗酶液饲喂48 h后，烟粉虱成虫出现体壁塌陷、蜡质层脱落、体色变浅等形态特征，表明发酵液上清和粗酶液中胞外活性物质可能通过降解体壁成分导致试虫丧失结构完整性和保水能力，最终死亡。推测菌株J3中几丁质酶在毒杀烟粉虱方面扮演着重要角色，与Berini et al.(2024)关于木霉菌 *Trichoderma* 中几丁质酶高效杀虫的报道相一致，进一步证实靶向昆虫围食膜的几丁质酶在害虫生物防治中的巨大潜力。尽管菌株J3在体外测定的几丁质酶绝对活性并非极高，但其在昆虫中肠这一特定微环境中，可能通过与蛋白酶及其他水解酶的协同作用，高效降解围食膜，从而引发致死效应(Fang et al.，2005)。此外，发酵液上清液也表现出一定的杀虫活性，推测菌株J3发酵液上清液中某些次生代谢物对烟粉虱也有一定的毒杀作用。后续研究将通过比较发酵液上清液与粗酶液的蛋白质组成差异明确杀虫活性的关键因子，并进一步探究蛋白酶与几丁质酶的协同作用以及和次生代谢物之间的协同作用。

菌株鉴定是内生菌开发利用的基础。本研究采用形态学观察与分子生物学鉴定相结合的方法将菌株J3鉴定为链霉菌属。后续研究可通过全基因组测序、平均核苷酸一致性分析、DNA-DNA杂交以及形态生理生化特征的多相分类鉴定法进一步明确菌株J3的分类地位。链霉菌属是优质的生物防治菌。Chen et al.(2018)从印楝 A*zadirachta indica* 中分离得到白黄链霉菌 *S. albidoflavus* 菌株G30，该菌株粗提物对桃蚜 *Myzus persicae* 有较高的毒杀作用，可作为研发生物杀虫剂的候选菌株；Zhao et al.(2020)从传统中药直立百部 *Stemona sessilifolia* 的内生链霉菌BS-1菌株中分离鉴定到了内生百部碱A~J，其对棉蚜 *Aphis gossypii* 有较强的毒杀作用；Diab et al.(2023)研究发现蒿属 *Subgen* 植物内生放线菌中的次生代谢物质可导致斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 4龄幼虫即时死亡，或引起迟发性致死效应；胡珍娣等(2006)从链霉菌GAAS7310中分离得到天山菌素，该成分对家蝇 *Musca domestica* 有较强的杀虫活性，LC_{50}低至0.6 μg/mL，因此推测自泽漆分离的链霉菌属菌株也有一定的杀虫活性。

本研究主要是聚焦泽漆内生菌，采用酶活筛选–活性验证–菌株鉴定系统思路筛选出具有杀虫活性的菌株，为烟粉虱生物防治及内生菌资源挖掘提供新思路和新资源。但本研究也有一定的局限，第一，未测定蛋白酶活性及二者协同的杀虫机制，后续需进行相关研究；第二，仅开展室内杀虫活性测定，未进行田间试验，菌株田间应用效果需进一步验证；第三，未对产酶条件进行优化，后续可探索产酶的最适条件；第四，未分离鉴定杀虫活性成分，后续可通过色谱、质谱等技术明确核心杀虫物质。

参 考 文 献（References）

Berini F, Montali A, Liguori R, Venturini G, Bonelli M, Shaltiel-Harpaz L, Reguzzoni M, Siti MR, Marinelli F, Casartelli M, et al. 2024. Production and characterization of *Trichoderma asperellum*

chitinases and their use in synergy with *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran control. Pest Management Science, 80(7): 3401−3411

Beygmoradi A, Homaei A, Hemmati R, Santos-Moriano P, Hormigo D, Fernández-Lucas J. 2018. Marine chitinolytic enzymes, a biotechnological treasure hidden in the ocean? Applied Microbiology and Biotechnology, 102(23): 9937−9948

Chen Y, Shafi J, Li MH, Fu DN, Ji MS. 2018. Insecticidal activity of endophytic actinomycetes isolated from *Azadirachta indica* against *Myzus persicae*. Archives of Biological Sciences, 70(2): 349−357

Chu D, Zhang YJ. 2018. Research progress on the damages and management of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China over the past 10 years. Plant Protection, 44(5): 51−55 (in Chinese) [褚栋, 张友军. 2018. 近10年我国烟粉虱发生为害及防治研究进展. 植物保护, 44(5): 51−55]

da Cruz Silva G, Kitano IT, de Figueiredo Ribeiro IA, Lacava PT. 2022. The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture. Frontiers in Soil Science, 2: 833181

Dai CC, Yu BY, Zhao YT, Jiang JH, Yang QY. 2006. The screening and identification of endophytic fungi from four species of family Euphorbiaceae and the strains' antibacterial activity. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 30(1): 79−83 (in Chinese) [戴传超, 余伯阳, 赵玉婷, 蒋继宏, 杨启银. 2006. 大戟科4种植物内生真菌分离与抑菌研究. 南京林业大学学报(自然科学版), 30(1): 79−83]

Dai JR, Zhu ZC, Luo SD, Yang YN, Zhang GL. 2026. Occurrence, damage and comprehensive prevention and control strategies of *Bemisia tabaci*. Journal of Agricultural Catastrophology, 16(1): 19−21 (in Chinese) [代江瑞, 朱宗财, 罗术东, 杨燕宁, 张国丽. 2026. 烟粉虱的发生危害及综合防控策略. 农业灾害研究, 16(1): 19−21]

Diab MK, Mead HM, Khedr MA, Nafie MS, Abu-Elsaoud AM, Hanora A, El-Shatoury SA. 2023. Endophytic Actinobacteria from wild medicinal plants are a natural source of insecticide to control the African cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*). AMB Express, 13: 47

Dikbaş N, Tülek A, Uçar S, Alım Ş, Servili B, Paçal N, Tozlu G, Ercisli S. 2025. Biocontrol potential of *Vibrio maritimus* chitinase: heterologous expression and insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus*. International Journal of Biological Macromolecules, 313: 144285

Dikbaş N, Uçar S, Tozlu G, Öznülüer Özer T, Kotan R. 2021. Bacterial chitinase biochemical properties, immobilization on zinc oxide (ZnO) nanoparticle and its effect on *Sitophilus zeamais* as a potential insecticide. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 37(10): 173

Du YX, Sheng JP, Shen L. 2010. Research advance on insect resistance among plant endophytes along with corresponding metabolism compounds. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 38(26): 14422−14424 (in Chinese) [杜永新, 生吉萍, 申琳. 2010. 植物内生菌及其代谢产物抗虫活性研究进展. 安徽农业科学, 38(26): 14422−14424]

Ezzine A, Ben Hadj Mohamed S, Bezzine S, Aoudi Y, Hajlaoui MR, Baciou L, Smaali I. 2024. Improved expression of a thermostable GH18 bacterial chitinase in two different *Escherichia coli* strains and its potential use in plant protection and biocontrol of phytopathogenic fungi. Molecular Biotechnology, 66(9): 2635−2647

Fang WG, Leng B, Xiao YH, Jin K, Ma JC, Fan YH, Feng J, Yang XY, Zhang YJ, Pei Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. Applied and Environmental Microbiology, 71(1): 363−370

Gu S, Shao H, Jiang XH, Zhang LQ, Wei RC. 2001. Diversity of endophytic fungi in medicinal plants and potential application value of their active components. Chinese Pharmaceutical Journal, 36(1): 14−15 (in Chinese) [谷苏, 邵华, 蒋晓华, 张玲琪, 魏蓉城. 2001. 药用植物内生真菌多样性及其活性成分的潜在应用价值. 中国药学杂志, 36(1): 14−15]

Hariprasad KV. 2016. Recent advancement in the development of biopesticides by actinomycetes for the control of insect pests//Subramaniam G, Arumugam S, Rajendran V. Plant growth promoting actinobacteria. Singapore: Springer, pp. 47−62

Hu ZD, Lin BR, Xie SD, Xu HH. 2006. Pesticidal activity and fungicidal activity of a new component tianshanmysin. Journal of Plant Protection, 33(1): 73−76 (in Chinese) [胡珍娣, 林壁润, 谢双大, 徐汉虹. 2006. 新农抗天山菌素的杀虫抑菌活性. 植物保护学报, 33(1): 73−76]

Li WH, Li L, Wu YF, Hao XA. 2008. Isolation of entophytes in *Euphorbia helioscopia* and the screening of their anti-virus activity. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 17(2): 285−288 (in Chinese) [李文华, 李乐, 吴云锋, 郝兴安. 2008. 泽漆内生菌的分离及抗病毒活性筛选. 西北农业学报, 17(2): 285−288]

Liu SK, Li JH, Feng Q, Chu LL, Tan ZQ, Ji XC, Jin PF. 2023. Insecticidal effect of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium araneicola* HK-1 in *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae). Insects, 14(11): 860

Nasiruddin N, Chen GY, Yu ZX, Zhao T. 2020. Endophytes of terrestrial plants: a potential source of bioactive secondary metabolites. Journal of Food and Nutrition Research, 8(7): 362−377

Pesch YY, Riedel D, Patil KR, Loch G, Behr M. 2016. Chitinases and imaginal disc growth factors organize the extracellular matrix formation at barrier tissues in insects. Scientific Reports, 6: 18340

Segura-Vega J, González-Herrera A, Molina-Bravo R, Solano-González S. 2024. Computational identification and characterization of chitinase 1 and chitinase 2 from neotropical isolates of *Beauveria bassiana*. Frontiers in Bioinformatics, 4: 1434442

Song TN, Hong ZG, Cao X, Zhu XY, Ma XY, Yuan L. 2019. Analysis of andophytic bacteria diversity in six medicinal plants. Journal of Green Science and Technology, 21(1): 1−4, 8 (in Chinese) [宋庭宁, 洪宗国, 曹夕, 朱薪颖, 麻晓宇, 袁琳. 2019. 6种药用植物的2个组织的内生细菌多样性初步分析. 绿色科技, 21(1): 1−4, 8]

Wang LS. 2014. Study on the insecticidal activities of the extracts from *Euphorbia helioscopia*. Master thesis. Zhengzhou: Henan Agricultural University (in Chinese) [王丽莎. 2014. 泽漆提取物杀虫活

性研究. 硕士学位论文. 郑州: 河南农业大学]

Wang LS, Tian TW, Wang Y, Li WZ, Guo XR. 2014. Biological activity of *Euphorbia helioscopia* extracts on *Sitobion avenae*. Journal of Henan Agricultural Sciences, 43(6): 80−84 (in Chinese) [王丽莎, 田体伟, 王怡, 李为争, 郭线茹. 2014. 泽漆提取物对麦长管蚜的生物活性研究. 河南农业科学, 43(6): 80−84]

Wu W, Chen N, Hu JH, Zhang J, Wu YZ, Yao TS, Wang XF. 2025. Function of chitinase in *Penicillium ochrochloron* Q-3-1 and its insecticidal and antifungal mechanism and biological control against citrus pests and diseases. International Journal of Biological Macromolecules, 307: 141842

Yang X, Xie W, Wang SL, Wu QJ, Xu BY, Zhou XM, Zhang YJ. 2014. Resistance status of the whitefly, *Bemisia tabaci*, in Beijing, Shandong and Hunan areas and relative levels of *CYP4v2* and *CYP6CX1* mRNA expression. Plant Protection, 40(4): 70−75 (in Chinese) [杨鑫, 谢文, 王少丽, 吴青君, 徐宝云, 周小毛, 张友军. 2014. 北京、山东和湖南地区烟粉虱抗药性及 *CYP4v2* 和 *CYP6CX1* mRNA水平表达量分析. 植物保护, 40(4): 70−75]

Zhang JY, Zhao LF, Liu MJ. 2025. Progress in research concerning the diversity, function, and application of plant endophytes. Acta Microbiologica Sinica, 65(4): 1446−1468 (in Chinese) [张静怡, 赵龙飞, 刘梦洁. 2025. 植物内生菌多样性、功能及应用研究进展. 微生物学报, 65(4): 1446−1468]

Zhang M, Zhang LL, Wang HY, Cao SJ, Yao JG, Zhang RQ, Liu AD, Zheng SW, Yin HB, Li T. 2025. Research progress on endophytic bacteria in plants and their roles in the growth and development of tomato. China Cucurbits and Vegetables, 38(7): 10−16 (in Chinese) [张敏, 张丽莉, 王虹云, 曹守军, 姚建刚, 张瑞清, 刘安达, 郑世伟, 尹海波, 李涛. 2025. 植物内生菌及其在番茄生长发育中的作用研究进展. 中国瓜菜, 38(7): 10−16]

Zhang SZ, Xia YX, Kim B, Keyhani NO. 2011. Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. Molecular Microbiology, 80(3): 811−826

Zhang ZW, Peng Z, Chen X, Lu S, He J, Wei Q, Cao Y, Huang BR. 2026. Overview of pesticides for *Bemisia tabaci* control and analysis of scientific application. Pesticide Science and Administration, 47(1): 54−59 (in Chinese) [张正炜, 彭震, 陈秀, 陆爽, 何吉, 卫勤, 曹云, 黄蓓荣. 2026. 防治烟粉虱用农药概览及科学用药浅析. 农药科学与管理, 47(1): 54−59]

Zhao HM, Yang AP, Zhang N, Li SY, Yuan TJ, Ding N, Zhang SW, Bao S, Wang C, Zhang YN, et al. 2020. Insecticidal endostemonines A−J produced by endophytic *Streptomyces* from *Stemona sessilifolia*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(6): 1588−1595

（责任编辑：张俊芳）