

椰子织蛾幼虫肠道细菌的初步分离鉴定及功能分析

涂艳^{1,2}, 吕宝乾^{2,3*}, 章雨璐^{1,2}, 蒋方一丁^{1,2}, 齐可欣^{1,2}

¹海南大学林学院, 海南 儋州 571737; ²中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737;

³农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省南繁生物安全与

分子育种重点实验室, 海南 海口 571101

摘要:【目的】研究椰子织蛾幼虫肠道微生物的种类和功能,以揭示其消化利用寄主老叶的机制。【方法】采用传统微生物分离培养技术分离培养肠道细菌,用16S rRNA基因序列分析的方法鉴定菌株,采用透明圈染色法对所得菌株进行功能性验证。【结果】基因序列检测对比鉴定得到9种可培养细菌菌株,主要属于变形菌门和厚壁菌门以及放线菌门;功能性验证结果表明,伯克霍尔德氏菌、解淀粉芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌菌株具有纤维素降解酶,寒气玫瑰单胞菌、解淀粉芽孢杆菌含木聚糖降解酶。【结论】椰子织蛾肠道中存在可培养的具有降解纤维素及木聚糖能力的细菌,这些细菌可能有助于椰子织蛾取食消化椰子等老叶,研究所获得的肠道微生物菌株也为后续研究该虫与环境的关系及相关菌株应用于农业、能源、环保价值的探索提供帮助。

关键词: 椰子织蛾; 肠道细菌; 分离培养; 菌株鉴定; 降解酶



开放科学标识码
(OSID 码)

Preliminary identification and functional analysis of larval gut bacteria in *Opisina arenosella* Walker

TU Yan^{1,2}, LÜ Baoqian^{2,3*}, ZHANG Yulu^{1,2}, JIANG Fangyiding^{1,2}, QI Kexin^{1,2}

¹College of Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; ²Environment and Plant Protection Research Institute,

Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; ³Key Laboratory of Integrated

Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Hainan Key Laboratory for Biosafety

Monitoring and Molecular Breeding in Off-Season Reproduction Regions, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract:【Aim】The gut microbes of insects have an important influence on host selection. In this paper, the species and functions of gut microorganisms in the larvae of *Opisina arenosella* were studied in order to reveal the digestion mechanism when eating old leaves of coconut.【Method】Traditional microbial isolation and culture technology were used to isolate and culture intestinal bacteria, and then 16S rRNA gene sequence analysis was performed to identify the species, and then transparent circle staining was used to verify the functions of the strains.【Result】Nine culturable bacterial strains were identified by gene sequence detection, mainly Proteobacteria, Phylum Firmicutes and Actinobacteria. The results of functional verification showed that *Burkholderia lata*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis* and *Bacillus cereus* had cellulolytic enzymes. *Roseomonas aerofrigidensis* and *Bacillus amyloliquefaciens* contained xylan-degrading enzymes.【Conclusion】There were culturable bacteria capable of degrading cellulose and xylan in the gut of this insect species. These bacteria may help the moth feed on old leaves such as coconut. The gut microbial strains obtained from the research also provide insights for future studies on the relationship between the insect and its environment, and the application of related strains in agriculture, energy and environmental protection.

Key words: *Opisina arenosella*; gut bacteria; degrading enzymes; strains identification; degrading enzyme

收稿日期(Received): 2020-03-28 接受日期(Accepted): 2020-07-28

基金项目: 海南省自然科学基金创新研究团队项目(2019CXTD409); 农业部国际交流与合作项目(BARTP-08-LBQ); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项(1630042017011); 海南大学大学生创新创业训练计划项目(201910589413)

作者简介: 涂艳, 女。研究方向: 植物保护。E-mail: ty1120ly@163.com

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: lvbaoqian@hotmail.com

椰子织蛾 *Opisina arenosella* Walker 属鳞翅目 Lepidoptera 织蛾科 Oecophoridae, 原产地为印度和斯里兰卡, 现主要分布于东南亚国家和地区, 是一种严重危害椰子等 30 多种棕榈科植物的害虫。2013 年 8 月首次在我国海南发现(吕宝乾等, 2013)。雌蛾产卵于棕榈叶背面, 幼虫主要取食老叶表皮及叶肉, 并在体周构造出丝和粪便的甬道, 用以躲避天敌、不良环境等(陆永跃和王敏, 2013)。其强大的繁殖能力及防治的困难性, 导致在海南等地区省仍属高度危险有害生物(阎伟等, 2013)。

目前, 对于椰子织蛾的研究主要集中在生物学和生态学、生物防治等方面(吕宝乾等, 2018; 吴琦琦等, 2018), 在肠道微生物方面却少有研究。昆虫肠道系统是伴随取食、消化、排泄等活动而多变的环境, 其微生物种类丰富多样。微生物在食物消化、生长发育、免疫及抵御病原菌方面起着重要作用(梅承等, 2018; 王四宝和曲爽, 2017; Maurice & Navodita, 2018; Crotti *et al.*, 2012), 一定意义上影响着昆虫能否在一个地方快速适应、生存并入侵。基于微生态理论, 昆虫缺乏完整的酶系统, 需要肠道微生物为食物消化、营养吸收和生物代谢提供不同种类的酶(Gandotra *et al.*, 2012)。如夏晓峰(2014)对小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 中肠道微生物对纤维素的降解实验发现, 小菜蛾肠道细菌具有完整的纤维素和果胶降解酶基因, 能协助宿主降解植物细胞壁中的纤维素、木聚糖和果胶等难降解物质。纤维素是一种丰富的碳源, 以结晶或无定形的微纤维形式存在于植物的细胞壁中, 不容易被宿主吸收, 而许多植食性昆虫的肠道微生物可以参与纤维素的降解(李丹红等, 2017; 孙博通等, 2017; Chakraborty *et al.*, 2000)。椰树老叶相对新叶含有更多的纤维素, 不容易被昆虫消化利用。椰子织蛾在长期进化过程中, 能够很好地取食利用椰树等老叶, 表明其肠道可能含有降解纤维素的微生物。本文利用传统生物分离纯化培养方法, 研究可培养肠道细菌的种类鉴定及其对纤维素、果胶、木聚糖等降解能力的分析, 以期后续深入研究椰子织蛾肠道微生物与宿主的相互作用及相关微生物资源的开发提供基础。

1 材料与方法

1.1 椰子织蛾的饲养

椰子织蛾(采集于海南省儋州市)置于实验室

人工气候箱(A1000, Conviron, Manitoba, Canada)中, 饲养温度为(25±2)℃, RH 为(75±10)%, 于养虫盒(25 cm×14 cm×7 cm, 盒盖封有 48 μm 纱网)中饲养 2 代。

1.2 椰子织蛾肠道的提取

取健康 5 龄幼虫提前饥饿 24 h, 排空体内食物残渣。于无菌操作台中, 先用无菌水擦拭清洁幼虫体表, 用 75% 酒精浸泡 30 s 做体表消毒后, 用无菌水漂洗 3 次。在无菌条件下, 用解剖针解剖虫体, 取其肠道, 去除其他杂质, 并放入 0.9% 生理盐水中漂洗 3 次, 再加入 1 mL 无菌水研磨成匀浆, 备用。

1.3 椰子织蛾肠道细菌的分离纯化

将上述提取的肠道匀浆在无菌条件下按 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 梯度稀释。各取 0.1 mL 稀释液在 LB 培养基(蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母粉提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NaCl $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH=7)上进行涂布, 再将平板倒置于 30℃ 培养箱中培养 72 h, 每 24 h 观察一次。根据菌落的颜色、大小和形态挑选不同的菌落在新的 LB 平板上用接种环划线纯化培养, 每个菌落在平板上至少纯化 5 次, 得到单克隆菌株, 纯化得到的菌株接种至斜面培养基, 置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.4 椰子织蛾分离细菌 16S rRNA 的扩增

将分离纯化得到的细菌样本送至青岛派森诺基因生物技术有限公司进行 PCR 扩增及 DNA 测序。细菌 PCR 扩增引物为 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')。PCR 反应体系: 基因组 DNA ($20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1.0 \mu\text{L}$ 、 $10\times\text{Buffer}$ (含 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Mg}^{2+}$) $5.0 \mu\text{L}$ 、Taq 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1.0 \mu\text{L}$ 、dNTP ($10 \text{ mg} \cdot \text{mol}^{-1}$) $1.0 \mu\text{L}$ 、27F 引物 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) $1.5 \mu\text{L}$ 、1492R 引物 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) $1.5 \mu\text{L}$ 、ddH₂O $39.0 \mu\text{L}$ 。反应条件为: 95℃, 5 min; 95℃, 30 s; 58℃, 30 s; 72℃, 90 s; 72℃, 7 min, 进行 35 个循环。反应完成后, 取 3 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确认 PCR 扩增片段。取各个菌种纯化后的 PCR 产物, 使用测序仪 ABI3730-XL 进行 DNA 测序。

1.5 椰子织蛾肠道细菌的菌种测定和系统发育分析

用 NCBI Blast 程序将拼接后的序列文件与 NCBI (16s 数据库) 中的数据进行比对, 得到与待测物种序列相似性最大的物种信息, 确定菌种鉴定结

果。并采用革兰氏染色制片的方法于光学显微镜下观察获取其显微形态。

选取单克隆菌株的近缘序列,利用 MEGA7.0 软件以邻位相连算法(neighbor-joining)构建系统进化树。

1.6 椰子织蛾肠道可培养细菌对纤维素、果胶及木聚糖的降解功能分析

(1)将分离纯化得到的菌株分别接到纤维素筛选平板(羧甲基纤维素钠 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,蛋白胨 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.0$)、木聚糖筛选平板(木聚糖 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,酵母粉 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g , K_2HPO_4 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.0$)、果胶素筛选平板(果胶粉 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,酵母粉 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, FeSO_4 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.0$)上。将各平板倒置于恒温箱培养, $30 \text{ }^\circ\text{C}$,培养 72 h 。

(2)将能在上述平板上生长的菌株分别接至纤维素酶鉴定平板(羧甲基纤维素钠 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.0$)、木聚糖酶鉴定平板(木聚糖 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.0$)、果胶酶鉴定平板(果胶粉 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaNO_3 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, FeSO_4 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.0$)上。将各平板置于恒温箱培养, $30 \text{ }^\circ\text{C}$,培养 7 d ,采用透明圈法对相关酶的产生菌进行鉴定。

纤维素酶产生菌的鉴定:在长出菌落的纤维素酶鉴定平板上,加入适量的 0.1% 刚果红溶液染色 10 min 后,以 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 脱色 5 min ,观察菌落周围是否产生透明圈(背景为红色);木聚糖酶产生菌的鉴定:在长出菌落的木聚糖酶鉴定平板上,加入适量的卢戈碘液染色 5 min 后,观察菌落周围是否产生透明圈(背景为紫色)。果胶酶产生菌的鉴定:在长出菌落的果胶酶鉴定平板上,加入适量的 0.1% 溴酚蓝染色 5 min 后,观察菌落周围是否产

生黄色透明圈(背景为褐色)。

2 结果与分析

2.1 肠道细菌分离纯化及基因测序

将椰子织蛾的肠道内容物按一定浓度涂布在 LB 培养基上,获得肠道原始菌株。分别从上述培养基中挑选形态、大小、颜色不一的菌落进行分离纯化,共得到待测的细菌菌落。将所得菌落进行 DNA 提取,以提取的基因为模版扩增并进行测序,用 NCBI Blast 程序将拼接后的序列文件与 NCBI 16S 数据库中的数据进行比对。结果显示,分离后的可培养菌株主要为高雄假黄单胞菌 *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis* (NR_043070.1) (99.71%)、伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia lata* (NR_102890.1) (99.74%)、蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* (NR_115714.1) (99.73%)、沙福芽孢杆菌 *Bacillus safensis* (NR_113945.1) (100%)、解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (NR_116022.1) (100.00%)、贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* (NR_075005.2) (98.44%)、山羊葡萄球菌 *Staphylococcus caprae* (NR_119252.1) (99.93%)、寒气玫瑰单胞菌 *Roseomonas aerofrigidensis* (NR_158137.1) (98.84%)、微杆菌 *Microbacterium esteraromaticum* (NR_026468.1) (99.20%) 9 种菌株。

2.2 菌株的显微形态

对以上菌株采用革兰氏染色制片,在显微镜下观察并获得其显微形态(图 1),高雄假黄单胞菌、伯克霍尔德氏菌、寒气玫瑰单胞菌革兰氏染色呈红色,为革兰氏阴性菌株,其余均为紫色革兰氏阳性菌株;显微形态下可知,除山羊葡萄球菌为球状结构外,其余均为杆状结构,其中高雄假黄单胞菌呈微弯曲杆状,微杆菌在培养后期呈杆状球状相间。

2.3 椰心叶甲、椰子织蛾肠道微生物组间丰度差异显著性检验

将测序比对得到的上述菌株的 16S rDNA 序列进行系统进化分析(图 2),结果显示,椰子织蛾肠道可分离培养细菌在进化树上形成不同分支。其中,高雄假黄单胞菌、伯克霍尔德氏菌属于变形菌门 Proteobacteria 分支,假黄单胞菌为 γ -变形菌纲,伯克霍尔德氏菌属于 β -变形菌纲。蜡样芽孢杆菌、沙福芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌、山羊葡萄球菌则组成了厚壁菌门 Phylum Firmicutes 的分支。微杆菌则属于放线菌门 Actinobacteria。

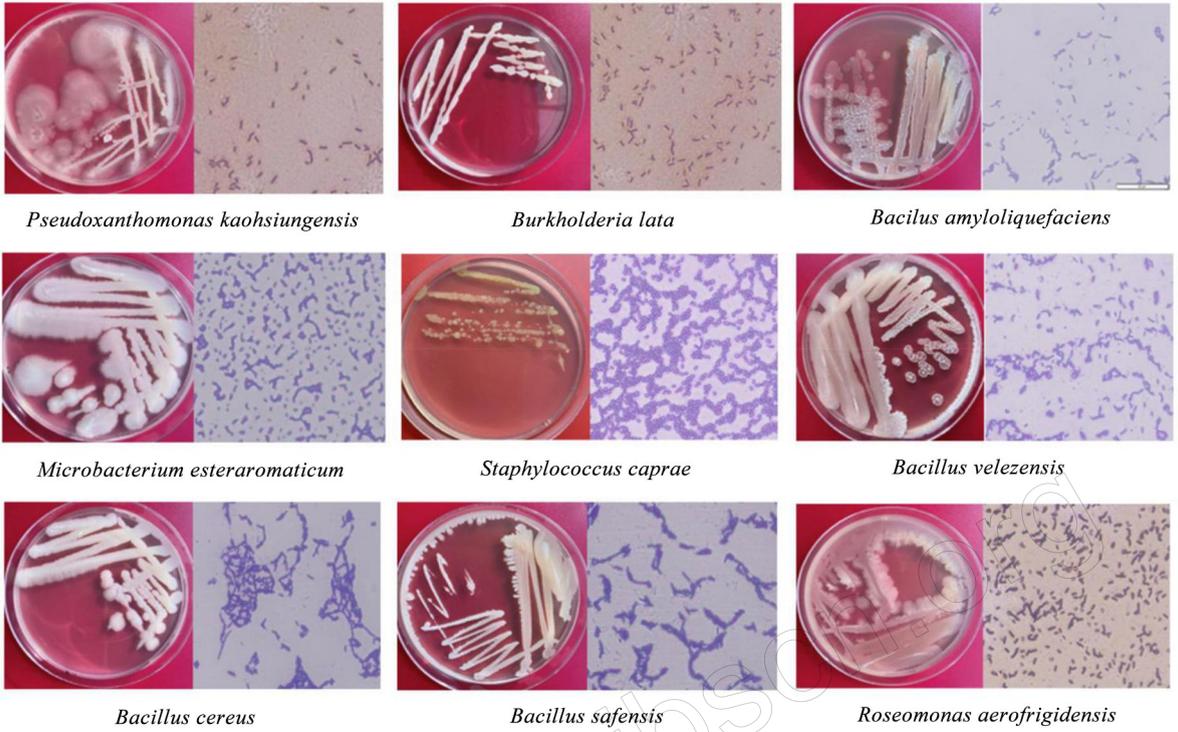


图 1 菌株的显微形态

Fig.1 The micro-morphology of the 9 strains



图 2 椰子织蛾幼虫肠道可培养细菌 16S rDNA 系统发育分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of intestinal culturable bacteria 16S rDNA in larva of *O. arenosella*

2.4 椰子织蛾肠道细菌功能分析结果

实验结果表明,有 4 种菌株对纤维素具有降解能力,分别为伯克霍尔德氏菌、解淀粉芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌(图 3)。各菌株都不具备降解果胶的能力或暂未在可培养菌株中发

现。有 2 种菌株具有降解木聚糖的能力,分别为寒 气玫瑰单胞菌和解淀粉芽孢杆菌(图 4)。其中,解 淀粉芽孢杆菌既具有降解纤维素的能力也有降解 木聚糖的能力。

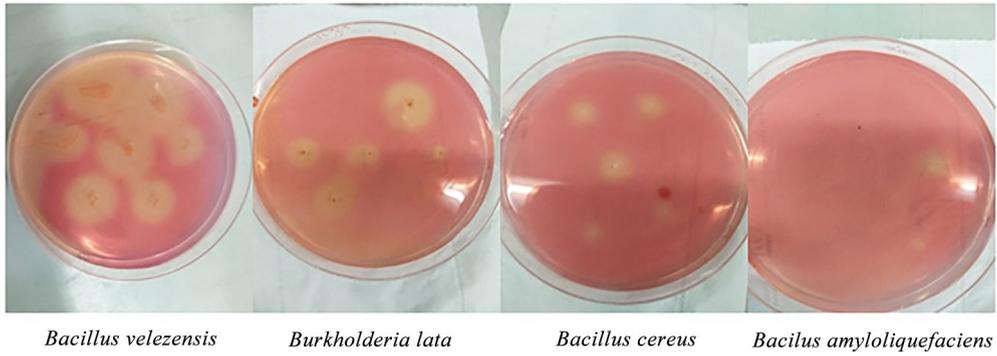


图 3 椰子织蛾肠道细菌菌株对纤维素降解能力

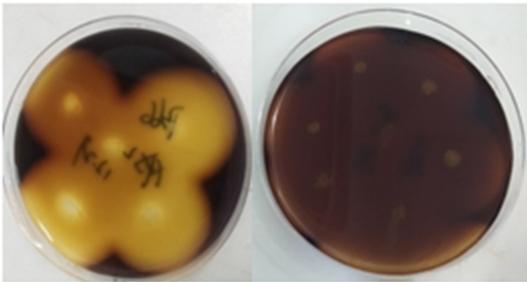
Fig.3 Degradation of cellulose by intestinal bacterial strains of *O. areosella**Bacillus amyloliquefaciens* *Roseomonas aerofrigidensis*

图 4 椰子织蛾肠道细菌菌株对木聚糖降解能力

Fig.4 Degradation of xylan by intestinal bacterial strains of *O. areosella*

3 讨论

本文分离培养鉴定得到的 9 株细菌与近年来研究所得可分离培养的昆虫肠道微生物细菌大致一致,分别属于常见的厚壁菌门(6 种)、变形菌门(2 种)和放线菌门(1 种),也正表明厚壁菌门和变形菌门为许多昆虫肠道微生物中的优势种(蓝波妙,2016;刘小改等,2016;杨焯,2012)。

前人研究表明,昆虫肠道微生物对昆虫取食消化、营养利用等方面的影响较大,如木食性白蚁和蟑螂后肠的共生微生物帮助宿主固氮、转化含氮废弃物尿酸为可利用的氮源,参与纤维素的降解等(Brune,2014)。纤维素、半纤维素等高产高效降解菌株的寻找与研究一直是科研的热点,纤维素降解菌株在农业、能源、环保等多个领域发挥着巨大的作用。昆虫已经进化出内源性和共生酶,以有效利用木质纤维素材料作为代谢葡萄糖的来源(Willis *et al.*,2010)。纤维素是世界上丰富的可再生资源,但对其利用及能源转化一直未能得到很好解决,纤维素降解酶的活性低及成本高等问题限制着其工业生产。刘松等(2017)通过对竹虫 *Omphisa fuscidentalis* Hampson 肠道微生物代谢通路分析及对纤

维素降解酶菌株的分离来创造更多的纤维素分解生物资源,张科等(2020)从蟋蟀后肠中分离出多株纤维素降解细菌。本文所研究的椰子织蛾主要取食棕榈科植物老叶,其叶片中纤维素、木聚糖等难降解物质占比高,而肠道微生物则一定程度上与降解这些物质相关。因而本实验从椰子织蛾肠道中分离培养出多株具有降解纤维素或木聚糖能力的菌株,表明肠道细菌在昆虫取食消化上的作用。

实验结果可知,不同菌株降解透明圈有一定差异,采用基础的透明圈与菌株菌落直径比较的方法来判断降解能力,其中,贝莱斯芽孢杆菌降解纤维素的能力显著较强,解淀粉芽孢杆菌对木聚糖的降解情况良好并且同时能降解纤维素,这与郭天凯(2019)等从柞蚕 *Antheraea pernyi* Guerin-Meneville 肠道菌中筛选鉴定出产纤维素酶活性较高的菌株属于解淀粉酶芽孢杆菌属相符。本实验中所得到的具纤维素降解酶菌株的大量生产及降解活性的测定则希望能通过后续实验解决。

本文利用传统微生物培养与分离的方法对椰子织蛾幼虫肠道细菌进行培养和分离。微生物能做到传统分离培养,但传统的培养方法和技术在一定意义上无法满足微生物在自然生态条件下对环境因子、营养要素和物种间相互作用等方面的要求(袁志辉等,2014),尤其是对与动植物之间具有复杂共生关系的微生物则更加困难(West *et al.*,2007)。由于对大多数微生物与椰子织蛾肠道之间的共生机制的认识不足,无法模拟其共生环境的自然因素,导致很多微生物没有被分离培养出来。通过对比可发现,目前的可培养菌株仅是其肠道内微生物的极小部分,后续研究可通过继续寻找、优化培养方法来发现其更多的可培养菌株,也可通过宏基因组分析等方法获得更全面的肠道微生物组成。

参考文献

- 郭天凯, 杜占军, 陈凤林, 姜欣雨, 于艳, 2019. 产纤维素酶柞蚕肠道菌的筛选鉴定及酶学特性研究. *蚕业科学*, 45(3): 407-414.
- 蓝波妙, 2016. 斜纹夜蛾肠道细菌多样性及其功能研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.
- 李丹红, 王誉, 杨红, 2017. 高效降解木质纤维素的白蚁肠道微生物组. *微生物学报*, 57(6): 876-884.
- 刘松, 2017. 竹虫 (*Omphisa fuscidentalis*) 肠道微生物多样性及纤维素酶学特性研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.
- 刘小改, 杨亚军, 廖秋菊, 徐红星, 刘映红, 吕仲贤, 2016. 稻纵卷叶螟肠道细菌群落结构与多样性分析. *昆虫学报*, 59(9): 965-976.
- 陆永跃, 王敏, 2013. 椰子织蛾的形态特征识别. *环境昆虫学报*, 35(6): 838-842.
- 吕宝乾, 严珍, 金启安, 温海波, 符悦冠, 李伟东, 彭正强, 2013. 警惕椰子织蛾 *Opisina arenosella* Walker (鳞翅目: 织蛾科) 传入中国. *生物安全学报*, 22(1): 17-22.
- 吕宝乾, 陈俊吕, 彭正强, 金启安, 温海波, 蔡波, 阎伟, 何杏, 2018. 新入侵害虫椰子织蛾的3种本地寄生蜂. *生物安全学报*, 27(1): 35-40.
- 梅承, 范硕, 杨红, 2018. 昆虫肠道微生物分离培养策略及研究进展. *微生物学报*, 58(6): 985-994.
- 孙博通, 蓝波妙, 王倩, 夏晓峰, 尤民生, 2017. 斜纹夜蛾幼虫肠道细菌分离鉴定及其功能初步分析. *氨基酸和生物资源*, 39(4): 264-271.
- 王四宝, 曲爽, 2017. 昆虫共生菌及其在病虫害防控中的应用前景. *中国科学院院刊*, 32(8): 863-872.
- 吴琦琦, 吕宝乾, 曹凤勤, 彭正强, 卢辉, 唐继洪, 吴晓霜, 2018. 椰子织蛾幼虫寄生蜂——麦蛾柔茧蜂的生物学特性初步研究. *环境昆虫学报*, 40(6): 1364-1369.
- 夏晓峰, 2014. 小菜蛾中肠微生物多样性及其功能研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.
- 杨焯, 2012. 四种鳞翅目害虫肠道细菌多样性分析. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.
- 阎伟, 吕宝乾, 李洪, 李朝绪, 刘丽, 覃伟权, 彭正强, 骆有庆, 2013. 椰子织蛾传入中国及其海南省的风险性分析. *生物安全学报*, 22(3): 163-168.
- 袁志辉, 王健, 杨文蛟, 吴永尧, 2014. 土壤微生物分离新技术的研究进展. *土壤学报*, 51(6): 1183-1191.
- 张科, 苏智鹏, 许阳, 李清利, 王瑜, 刘丽, 李冰洁, 周云霞, 夏西超, 2020. 蟋蟀后肠纤维素降解细菌的分离与鉴定. *生物资源*, 42(2): 228-233.
- BRUNE A, 2014. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3): 168-180.
- CHAKRABORTY N, SARKAR G M, LAHIRI S C, 2000. Cellulose degrading capabilities of cellulolytic bacteria isolated from the intestinal fluids of the silver cricket. *The Environmentalist*, 20: 9-11.
- CROTTI E, BALLOI A, HAMDI C, SANSONNO L, MARZORATI M, GONELLA E, FAVIA G, CHERIF A, BANDI C, ALMA A, DAFFONCHIO D, 2012. Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems. *Microbial Biotechnology*, 5(3): 307-317.
- GANDOTRA S, BHUYAN P M, GOGOI D K, KUMAR A, SUBRAMANIAN S, 2018. Screening of nutritionally important gut bacteria from the Lepidopteran insects through qualitative enzyme assays. *India Section B: Biological Sciences*, 88: 329-337.
- MASONA C J, RAYA S, SHIKANO A L, EIFFERA M, JONES A G, LUTHEB D S, HOOVERA K, FELTONA G W, 2019. Plant defenses interact with insect enteric bacteria by initiating a leaky gut syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116: 15991-15996.
- MAURICE N, ERDEI L, 2018. Termite gut microbiome // KHAN M A, AHNAD W. *Termites and Sustainable Management*. Cham: Springer: 69-99.
- WEST S A, DIGGLE S P, BUCKLING A, GARDNER A, GRIFFIN A S, 2007. The social lives of microbes. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 38: 53-77.
- WILLIS J D, OPPERT C, JURAT-FUENTES J L, 2010. Methods for discovery and characterization of cellulolytic enzymes from insects. *Insect Science*, 17: 184-198.

(责任编辑: 郭莹)