

罗 曼,熊忠平,熊 智,等. 思茅松毛虫 3 龄幼虫肠道可培养细菌的多样性[J]. 江苏农业科学,2021,49(21):128-133.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.21.019

# 思茅松毛虫 3 龄幼虫肠道可培养细菌的多样性

罗 曼<sup>1</sup>,熊忠平<sup>2</sup>,熊 智<sup>3</sup>,李选文<sup>3</sup>,李雕益<sup>3</sup>,包书军<sup>3</sup>

(1. 西南林业大学林学院,云南昆明 650224; 2. 西南林业大学生物多样性学院,云南昆明 650224;

3. 西南林业大学继续教育学院,云南昆明 650224)

**摘要:**采用纯培养法对采集自云南地区的思茅松毛虫(*Dendrolimu kikuchii*)3 龄幼虫进行肠道细菌多样性的研究,这些研究资料与菌种数据为后研究思茅松毛虫发育奠定基础。对采自安宁市的 150 头思茅松毛虫 3 龄幼虫的肠道细菌进行分离与纯化,并且对所培养菌株的进行形态特征观察及生理生化指标测定,通过这种方法对菌株进行初步的鉴定,再结合 16S rDNA 分子鉴定技术进行分析,判定细菌多样性。结果显示,从 3 龄幼虫肠道中共分离到 152 株细菌,初步鉴定隶属于 6 个属 9 个类群,分别为 62 株芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.) (3 个类群)、35 株微球菌属(*Micrococcus* sp.) (2 个类群)、23 株葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.) (1 个类群)、11 株链霉菌属(*Streptomyces* sp.) (1 个类群)、12 株不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) (1 个类群)、9 株泛菌属(*Pantoea* sp.) (1 个类群)。其中,芽孢杆菌属具有最高的相对分离率为 40.78%,为优势菌群。思茅松毛虫 3 龄幼虫肠道细菌的多样性丰富,通过分析细菌种类及各水平之间的相关性,为更深入研究细菌与思茅松毛虫的关系和为思茅松毛虫的防治奠定基础。

**关键词:**思茅松毛虫;肠道细菌;多样性;16S rDNA;分离

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)21-0128-06

思茅松毛虫(*Dendrolimu kikuchii*)又名赭色松毛虫,属于鳞翅目(Lepidoptera)枯叶蛾科(Lasiocampidae)松毛虫属(*Dendrolimus*)<sup>[1]</sup>。其以松针为食,体形大,幼虫龄期长,且取食量较大,是我国南方松树的重要害虫之一,主要分布在云南、广西、四川、湖南等省(区)<sup>[2]</sup>。在云南滇中地区,思茅松毛虫 1 年发生 1~2 代,幼虫共 7 龄,其 4 龄幼虫开始越冬,主要危害思茅松等针叶树,且存在明显的寄生专化性<sup>[2]</sup>。

昆虫与微生物的关系十分复杂,微生物参与到昆虫生活的很多方面,而肠道微生物与宿主共生,相互合作<sup>[3]</sup>。体内的共生微生物对昆虫具有重要的生理功能,可通过消化代谢和营养与昆虫建立共生关系<sup>[4-7]</sup>。因此,研究思茅松毛虫与其肠道微生物之间的关系,可进一步研究共生菌种类与宿主的关系,最终筛选出培育防治思茅松毛虫的有效方法<sup>[8-9]</sup>。

目前,国内外有关昆虫肠道微生物多样性的研究已经发展到一定阶段。其中,刘小改通过高通测序技术研究稻纵卷叶螟幼虫肠道细菌微生物的多样性,发现稻纵卷叶螟幼虫期肠道微生物的物种丰富度较高,而卵期微生物的多样性较高<sup>[10]</sup>。陈金华等利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)和限制性片段长度多态性(RFLP)方法研究桑粒肩天牛幼虫肠道微生物多样性,发现桑粒肩天牛肠道微生物在丰富度和频度 2 个方面都显示出复杂的多样性<sup>[11]</sup>。而王娇莉采用 DGGE 及高通量测序检测核桃举肢蛾和桃蛀螟幼虫肠道细菌群落优势类群及丰度,发现核桃举肢蛾幼虫肠道多样性稍高于桃蛀螟幼虫肠道多样性,但差异不显著<sup>[12]</sup>。除此之外,前人研究的昆虫肠道微生物多样性还有豆天蛾<sup>[13]</sup>、日本龟蜡蚧<sup>[14]</sup>、华山松大小蠹<sup>[15]</sup>等。

现阶段针对肠道微生物的研究主要集中在白蚁<sup>[16-18]</sup>、蜜蜂<sup>[19-20]</sup>等与生活关联更大的昆虫中,而针对林业危害严重的昆虫肠道研究则较少见。试验采用纯培养技术和形态学对 3 龄幼虫肠道细菌进行初步的分离鉴定,再利用 16S rDNA 序列测定幼虫肠道的细菌种类,鉴定出幼虫肠道细菌的关键种群。在了解思茅松毛虫幼虫肠道细菌多样性及群落组成的基础上,弄清其中的关键共生菌种类,为进

收稿日期:2021-03-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660029)。

作者简介:罗 曼(1997—),女,河南信阳人,硕士研究生,主要从事肠道微生物研究。E-mail:819683586@qq.com。

通信作者:熊忠平,高级实验师,主要从事森林病虫害研究。E-mail:76250630@qq.com。

一步研究这些共生菌对宿主昆虫的生理功能,调节关键性的共生菌控制思茅松毛虫提供理论基础<sup>[21]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验时间和地点 2018 年 10 月至 2019 年 5 月在云南省安宁市草铺镇森林(24°31′~25°6′ N, 102°8′~102°37′ E)进行试验。

1.1.2 试验材料的采集和处理 试验材料选用思茅松毛虫 3 龄幼虫,根据试验地点具体情况,在方圆 2 km 范围内随机挑选 30 个样品点,每个样品点采集 6 头健康的 3 龄思茅松毛虫幼虫及树枝并带回实验室饲养,为后续试验做准备。具体操作时再选取 150 头健康幼虫进行试验。

### 1.2 分离培养基与试剂、仪器

牛肉膏蛋白胨培养基(NA):牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 15~20 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 值 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 20 min<sup>[22]</sup>。

培养基及生理生化鉴定所用分析纯、化学试剂,均购自西陇化工股份有限公司;Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;PCR 扩增体系试剂,购自硕擎生物科技有限公司。

### 1.3 肠道细菌的分离纯化

选取 150 头健康的 3 龄幼虫,在恒温 22~24 °C、恒湿 80%~85% 条件下,用无菌水喂养幼虫,40 h 后待其排空体内食物残渣后进行试验<sup>[23]</sup>。将思茅松毛虫幼虫置于冰上 3~5 min,待其昏迷;采用 70% 乙醇擦拭虫体表面 30 s,0.25% 次氯酸钠冲泡 1 min,无菌水冲洗 3 次;将体表消毒好的虫子固定于无菌蜡盘上,在无菌环境下操作,使用灭菌后的细尖钳将昆虫腹部剖开,取出整个肠道,并立即用 0.9% 无菌 NaCl 溶液冲洗表面 2 次,然后将肠道取出后置于无菌离心管中,向离心管中加入 1 mL PBS 缓冲液研磨成匀浆,备用<sup>[22]</sup>。

将上述肠道匀浆吸取 1 mL 置于 9 mL PBS 缓冲液中,稀释成  $10^{-1}$ ,按照 10 的倍数梯度稀释,制成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  的稀释液,吸取每个浓度稀释液 100  $\mu$ L 分别涂布于 NA 培养基中,每个梯度涂 3 个平板,作为试验组。取最后一次清洗的无菌水 100  $\mu$ L 涂布于 NA 培养基上,作为空白对照。涂板均匀后将培养平板倒置于 37 °C 培养箱中培养,3 d 后观察空白对照是否有菌落形成,若无菌落长出,

则选择单菌落数在 30~300 个的培养皿,根据涂有肠道内容物悬液培养皿上的单菌落的不同特征,挑取单菌落至新的 NA 培养基平板上,采用分区划线法进行纯化,直至菌株形态基本一致,得到纯菌株。将得到的菌种保藏于 NA 斜面培养基中,4 °C 保存备用<sup>[22]</sup>。

### 1.4 3 龄幼虫肠道可培养菌株的形态观察

将经分离纯化得到的纯菌株用平板划线法接种于新的 NA 平板上,在 37 °C 下培养 24~48 h,待菌落长成后,参考文献[23]对菌落进行染色,并在显微镜下观察菌株的形态,依据文献[24]对其特征进行描述鉴定。

### 1.5 3 龄幼虫肠道可培养菌株的生理生化鉴定

按照朱旭芬等的微生物生理生化鉴定方法<sup>[25-26]</sup>,对 3 龄幼虫肠道细菌进行生理生化鉴定。

### 1.6 3 龄幼虫肠道细菌 16S rDNA 分子鉴定

#### 1.6.1 肠道细菌基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

将 1 mL 过夜培养的细菌菌液按照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 3 龄幼虫肠道细菌基因组 DNA。提取出的细菌基因组 DNA 用 1.0% 琼脂糖凝胶检测,得到的片段符合细菌基因组 DNA 大小后,将检测合格的 DNA 产物作为 16S rDNA 序列扩增模板。选择的扩增引物为:正向引物 27F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和反向引物 1492R(5′-GGTACCTTGTTACGACTT-3′)<sup>[12]</sup>。PCR 扩增体系为:25.0  $\mu$ L 的 2 × Taq PCR MasterMix;3.0  $\mu$ L 的模板 DNA;10.0  $\mu$ mol/L 正向引物 27 F 和反向引物 1 492 R 各 1.0  $\mu$ L;双蒸水补充至 50.0  $\mu$ L。PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,56 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,30 个循环;72 °C 终延伸 5 min,-20 °C 保存。取 4.0  $\mu$ L PCR 扩增后的产物用 1% 琼脂糖凝胶进行检测,将检测合格的 PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.6.2 3 龄幼虫肠道细菌系统发育树构建 测得的序列通过 DNA MAN 6.0 软件进行矫正及拼接,拼接完成后的 16S rDNA 序列在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 中与 GenBank 数据库中的序列进行 BLAST 同源性比对,选出与菌株相似度最高的序列,运用软件 MEGA 7.0 构建 Neighbor-Joining 系统发育树,判定其分类学关系<sup>[22]</sup>。

多样性指数<sup>[28]</sup>的计算公式如下:

$$\text{Shannon 指数: } H' = -\sum_{i=1}^k (p_i \ln p_i);$$

Simpson 优势度指: $D_j = - \sum_{i=1}^k p_i^2$ ;

Margalef 丰富度指数: $Ma = (S - 1) / \ln N$ 。

式中: $S$  表示某个 3 龄幼虫肠道细菌的种类数; $N$  表示某个 3 龄幼虫肠道细菌的总量; $p_i$  表示某种 3 龄幼虫肠道细菌的相对分离率。

2 结果与分析

2.1 3 龄幼虫肠道细菌的分离结果

从 150 头 3 龄幼虫肠道中共分离得到 152 株细

菌,根据菌落的形态特征共有 9 个类群,整理编号为 N301 ~ N309。对分离得到的 9 株细菌的菌落特征进行分析,由表 1 可知,9 株菌株中多数菌株的革兰氏染色结果呈阳性,仅有 3 株呈阴性。其菌株的形状多样化,有球状、杆状、椭圆状等,其中球状居多,而 N305、N307、N308 为椭圆状,N306、N309 为杆状;颜色多样化,有灰白色、黄色、紫色等,其中灰白色和黄色占大部分,只有 N309 颜色为灰白色;大部分菌株边缘整齐,但 N305、N307、N308 边缘不整齐,呈锯齿状;所有菌株都是不透明或者半透明的。

表 1 3 龄幼虫肠道细菌的菌落形态特征

菌株编号	菌体特征	形状	颜色	边缘	透明度	其他特征	数目 (株)	相对分离率 (%)
N301	G <sup>+</sup> ,球状	圆形凸起	黄色	整齐	不透明	表面光滑湿润	23	15.13
N302	G <sup>+</sup> ,球状	圆形微凸起	黄色	整齐	不透明	表面光滑湿润	21	11.18
N303	G <sup>-</sup> ,球杆状	圆形凸起	灰白色	整齐	半透明	表面光滑湿润	12	7.89
N304	G <sup>+</sup> ,球状	圆形微凸起	黄色	整齐	不透明	表面光滑湿润	14	9.21
N305	G <sup>+</sup> ,椭圆状	椭圆形扁平	灰白色	不整齐	不透明	表面粗糙,有褶皱	18	11.84
N306	G <sup>-</sup> ,杆状	圆形微凸起	黄色	整齐	半透明	表面光滑湿润	9	5.92
N307	G <sup>+</sup> ,椭圆状	椭圆形扁平	灰白色	不整齐	不透明	表面粗糙,有褶皱	21	13.81
N308	G <sup>+</sup> ,椭圆状	椭圆形扁平	灰白色	不整齐	不透明	表面粗糙,有褶皱	23	15.13
N309	G <sup>-</sup> ,杆状	圆形凸起	淡紫色	整齐	不透明	表面光滑湿润	11	7.23

注:G<sup>+</sup>、G<sup>-</sup> 分别表示革兰氏阳性、革兰氏阴性。

从思茅松毛虫 3 龄幼虫肠道细菌的相对分离比率(表 1)可知,152 株 3 龄幼虫肠道细菌中,思茅松毛虫 3 龄幼虫肠道细菌的 Shannon 多样性指数、Simpson 优势度指数为、Margalef 丰富度指数分别为 2.1 486、0.8 785、1.5 924,说明思茅松毛虫 3 龄幼虫肠道细菌具有丰富的多样性。而 N305、N307 和 N308 的菌群相对分离率为 40.78%,是思茅松毛虫 3 龄幼虫肠道细菌的优势菌群。

2.2 3 龄幼虫肠道细菌生理生化鉴定及多样性分析 采用细菌生化试验对 9 种细菌群落进行淀粉水解等 18 种反应,发现有明显差异(表 2)。经过对生理生化指标的聚类分析可知,9 个细菌类群可划分为 2 个遗传聚类组,N301 自成一遗传聚类组,其他 8 个细菌类群为一聚类组,其中 N302、N307 属于一类,N309、N306 分别各属于一类,N303、N308、N304、N305 属于一类(图 1)。结合细菌的形态特征(表 1)、生理生化特征(表 2)、生理生化聚类(图 1),查询细菌鉴定手册后,将分离到的 9 种细菌形态分析对比,初步鉴定结果:N305、N307、N308 属于芽孢杆菌属的 *Bacillus* sp. 1、*Bacillus* sp. 2、*Bacillus* sp. 3,

N301 为葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.),N309 为链霉菌属(*streptomyces* sp.),N302、N304 为微球菌属(*Micrococcus* sp. 1、*Micrococcus* sp. 2),N303 为不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.),N306 为泛菌属(*Pantoea* sp.)。其中 N305、N307 和 N308 的芽孢杆菌属相对分离率为 40.78%,是思茅松毛虫 3 龄幼虫肠道细菌的优势菌群。部分菌株因菌种形态过于相似,需进一步进行后续分子生物学鉴定。

2.3 3 龄幼虫肠道可培养细菌 16S rDNA PCR 扩增及 16S rDNA 分析结果

由图 2 可知,安宁市 3 龄幼虫分离纯化的肠道细菌基因组 DNA,检测合格后,通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,通过观察凝胶成像后,PCR 扩增条带均在 1 500 bp 左右,条带清晰。

将所获 9 种细菌形态 3 龄幼虫肠道细菌 16S rDNA 序列在 NCBI 中比对,分离到的 3 龄幼虫肠道细菌与相应菌株的 16S rDNA 序列相似度在 95% ~ 100% 之间。其中,N301、N302、N304、N306、N308 序列相似度为 99%;N303、N305 序列相似度为 98%;N309 序列相似度为 97%;N307 序列相似

表 2 3 龄幼虫肠道可培养细菌的生理生化特征

生理生化试验	N301	N302	N303	N304	N305	N306	N307	N308	N309
淀粉水解	-	-	-	+	+	-	+	+	+
蛋白水解	-	+	+	+	+	+	+	+	+
油脂利用	+	-	+	+	+	+	-	-	+
纤维素分解	-	-	-	-	-	-	-	-	-
耐盐性(5% NaCl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
明胶水解	-	-	-	+	+	+	-	-	+
甲基红试验(M-R)	+	+	-	-	-	-	+	+	-
伏-普二氏试验(V-P)	+	+	+	+	-	+	+	+	-
氧化酶	-	-	-	-	+	+	-	-	-
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+
石蕊牛奶	-	-	-	-	-	+	-	+	-
柠檬酸盐	+	-	+	+	+	+	+	+	-
产酸葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	-
乳糖	+	-	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖	+	-	-	+	+	+	+	-	-
甘露醇	+	+	-	+	-	-	+	+	-
甘露糖	-	+	+	+	+	+	+	+	-
鼠李糖	-	-	-	-	-	-	+	-	-
麦芽糖	-	+	+	-	-	+	-	-	-
肌醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-
纤维二糖	-	-	-	-	-	+	+	-	-
果糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
木糖	+	-	+	-	-	-	+	-	-
山梨醇	+	+	-	-	-	-	+	-	-
半乳糖	-	+	-	-	-	-	+	-	-
产气葡萄糖	-	-	-	+	-	+	+	-	-
乳糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖	-	-	-	+	-	+	+	-	-
甘露醇	-	+	-	-	-	-	+	-	-
甘露糖	-	+	-	+	+	+	-	+	-
鼠李糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-
麦芽糖	-	+	+	-	-	-	-	-	-
肌醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-
纤维二糖	-	-	-	-	-	-	+	-	-
果糖	-	+	-	-	+	+	+	+	-
山梨醇	-	+	-	-	-	-	+	-	-
半乳糖	-	+	-	-	-	-	+	-	-
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	+	+	+
亚硝酸盐	-	-	-	-	+	-	-	-	-
苯丙氨酸	+	-	-	-	-	-	-	-	-
脲酶	+	-	+	-	+	+	+	+	+
卵磷脂酶	+	-	+	-	+	+	+	+	-
吡啶	-	-	-	-	+	-	-	-	-
在强酸(pH 值 = 3)环境下生长情况	-	-	-	-	-	-	-	-	-
在强碱(pH 值 = 12)环境下生长情况	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-酮基乳糖	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	+	+	-	-	+	-

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

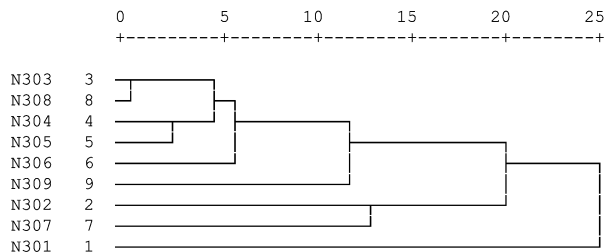


图1 菌株生理生化聚类

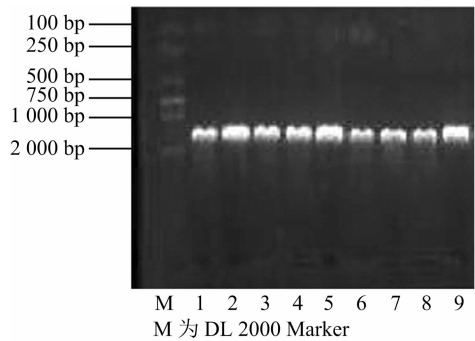


图2 3 龄幼虫肠道可培养细菌 16S rDNA PCR 电泳图

度为 96%。这 152 株细菌隶属于 6 个属 9 个类群。

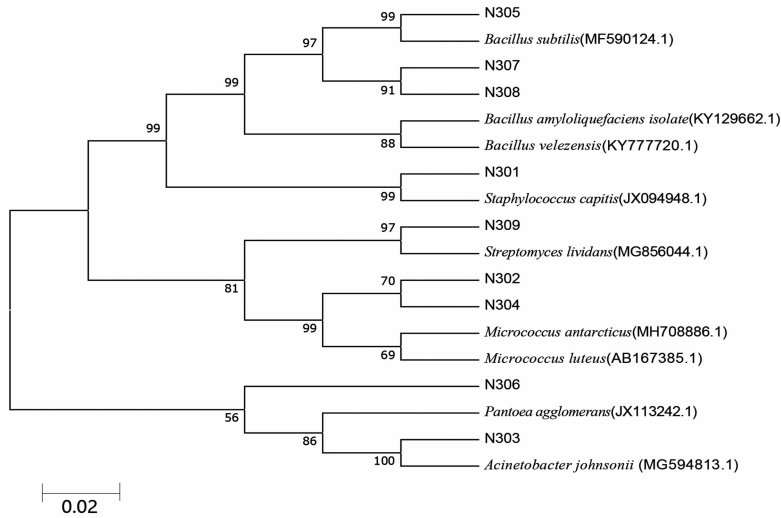


图3 基于 16S rDNA 序列构建 3 龄幼虫肠道细菌的系统发育树(邻接法)

3 结论与讨论

昆虫肠道微生物与宿主互惠共生,相互依存<sup>[5]</sup>。本研究以思茅松毛虫 3 龄幼虫为材料,通过对肠道可培养细菌进行一系列的菌落观察、生理生化试验和 16S rDNA 同源性分析,共分离得到 152 株肠道可培养细菌,经测定隶属于 6 个属 9 个类群。进一步对其多样性做深入的分析,可知思茅松毛虫肠道可培养细菌具有丰富的多样性。

初步鉴定结果显示,N301 为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus capitis*), N302 为南极微球菌 (*Micrococcus antarcticus*), N303 为约翰逊不动杆菌 (*Acinetobacter johnsonii*), N304 为黄褐微球菌 (*M. luteus*), N305 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), N306 为成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*), N307 为解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*), N308 为贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*), N309 为淡紫色链霉菌 (*Streptomyces lividans*)。

2.4 系统发育树

将 3 龄幼虫肠道细菌的 16S rDNA 序列进行系统发育进化分析,构建系统发育树(图 3)。由图 3 可知,思茅松毛虫 3 龄幼虫肠道可培养细菌归属于 3 个大类:第一大类为放线菌门,包括微球菌属 (*Micrococcus* sp.)、链霉菌属 (*Streptomyces* sp.);第二大类为变形菌门,包括不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.)、泛菌属 (*Pantoea* sp.);第三大类为厚壁菌门,包括芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.)。

笔者所在课题组之前研究过 3 龄思茅松毛虫肠道好氧细菌的多样性,得到好氧细菌 11 株,经 ARDRA 聚类分析,在 70% 遗传相似度水平上归属 4 个类群,说明 3 龄松毛虫肠道内好氧细菌的多样性水平偏低<sup>[27]</sup>。而采自安宁地区的 3 龄幼虫分离得到 152 株肠道细菌,隶属于 6 个属、9 个类群。2 个试验有相似的结果,说明 3 龄思茅虫毛虫肠道微生物多样性确实偏低。可能是因为思茅松毛虫的草食性生活习性建立了肠道特定的营养环境,肠道微

生物也通过复杂的调控过程。

枯草芽孢杆菌属于芽孢杆菌属,可在动物肠道或环境中分泌消化酶、维生素或抗菌物质,形成具有一定稳定性的微生物群系,影响动物肠道的微生物平衡<sup>[29-30]</sup>。本试验对 3 龄思茅松毛虫肠道微生物的多样性进行研究,发现枯草芽孢杆菌含量丰富。而解淀粉芽胞杆菌是一种与枯草芽孢杆菌亲缘关系很近的革兰阳性细菌,能生产纤溶酶等重要的专一性蛋白酶,因此推测解淀粉芽胞杆菌与思茅松毛虫肠道纤维素的消化相关<sup>[31-32]</sup>,该特性在研究解淀粉芽胞杆菌与食纤维素类昆虫消化的关系方面具有重要意义。枯草芽孢杆菌和解淀粉芽胞杆菌都属于芽孢杆菌属,本研究中芽孢杆菌属的相对分离率最高,为 40.78%,是 3 龄幼虫肠道细菌的优势菌属。经分析,芽孢杆菌属对思茅松毛虫生长发育都有很大影响,对研究芽孢杆菌属其他菌种与微生物肠道多样性的关系提供了研究基础。

思茅松毛虫是林业重要的害虫,对其肠道微生物的研究,可以补充昆虫肠道微生物资源库,也为其他相近种昆虫肠道微生物多样性研究提供参考。并进一步分析得出影响昆虫生长发育的肠道细菌种类,为思茅松毛虫的生物防治提供依据。

#### 参考文献:

- [1]侯陶谦. 中国松毛虫[M]. 北京:科学出版社,1987:32-34.
- [2]萧刚柔. 中国森林昆虫[M]. 2 版. 北京:中国林业出版社,1992:946-947.
- [3]黄云,詹先进,蓝家祥,等. 昆虫肠道微生物的研究进展[J]. 湖北农业科学,2009,48(11):2888-2890.
- [4]张珊,熊忠平,张俊,等. 思茅松毛虫肠道真菌分离鉴定及水解酶活性初步研究[J]. 环境昆虫学报,2019,41(2):413-419.
- [5]刘绍雄,王金华,熊智,等. 青蒿乙醇提取物对 5 龄思茅松毛虫肠道细菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学,2012,40(4):141-142.
- [6]梅承,范硕,杨红. 昆虫肠道微生物分离培养策略及研究进展[J]. 微生物学报,2018,58(6):985-994.
- [7]张振宇,圣平,黄胜威,等. 昆虫肠道微生物的多样性、功能及应用[J]. 生物资源,2017,39(4):231-239.
- [8]陈勃生,鲁兴萌,邵勇奇. 鳞翅目昆虫肠道微生物的多样性及其与宿主的相互作用[J]. 昆虫学报,2017,60(6):710-722.
- [9]相辉,黄勇平. 肠道微生物与昆虫的共生关系[J]. 昆虫知识,2008,45(5):687-693.
- [10]刘小改. 稻纵卷叶螟肠道细菌群落组成与多样性分析[D]. 重庆:西南大学,2017:11-29.
- [11]陈金华,王中康,贺闽,等. DGGE 和 RFLP 方法分析桑粒肩天牛幼虫肠道微生物多样性[J]. 生物技术通报,2008(6):115-119,123.
- [12]王娇莉. 核桃举肢蛾 *Atrijuglans hetaohei* 和桃蛀螟 *Dichocrocis punctiferalis* 幼虫肠道细菌组成及多样性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2016:39-42.
- [13]吕飞. 豆天蛾肠道细菌的初步研究[D]. 泰安:山东农业大学,2008:48-49.
- [14]郝文英. 日本龟蜡蚧肠道微生物多样性分析及单宁降解菌筛选[D]. 太原:山西大学,2020:42-46.
- [15]胡霞. 华山松大小蠹肠道微生物群落多样性与幼虫肠道纤维素降解菌的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014:25-32.
- [16]孙新新,宁娜,谭慧军,等. 白蚁肠道微生物多样性和作用研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2017,23(4):764-770.
- [17]Kundu P, Manna B, Majumder S, et al. Species - wide metabolic interaction network for understanding natural lignocellulose digestion in termite gut microbiota [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1):16329.
- [18]Poulsen M. Towards an integrated understanding of the consequences of fungus domestication on the fungus - growing termite gut microbiota [J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(8):2562-2572.
- [19]张晴晴,欧阳芳,戈峰. 蜜蜂肠道微生物的多样性及功能研究进展[J]. 应用昆虫学报,2020,57(5):1064-1075.
- [20]Motta E, Na M R. Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: Effects of intensity, duration, and timing of exposure [J]. mSystems, 2020, 5(4):268-320.
- [21]黄胜威. 暗黑鳃金龟幼虫肠道微生物分子多态性及纤维素降解菌多样性研究[D]. 武汉:华中农业大学,2012:61-63.
- [22]孙佑赫,熊智,王金华,等. 思茅松毛虫四龄幼虫肠道好氧细菌的 ARDRA 分析及鉴定[J]. 应用昆虫学报,2012,49(6):1618-1622.
- [23]黄秀梨,辛明秀. 微生物学实验指导[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,2008:48-50.
- [24]东秀珠,蔡妙英. 常用细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:364-397.
- [25]朱旭芬. 现代微生物学实验技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,2011:269-275.
- [26]周德庆,徐德强. 微生物学实验教程[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2013:350-352.
- [27]康柳,王金华,孙佑赫,等. 3 龄思茅松毛虫幼虫肠道好氧细菌的分离及 ARDRA 多态性分析[J]. 湖北农业科学,2012,51(7):1481-1483.
- [28]丁雅迪,刘绍雄,毛德昌,等. 思茅松菌根内生真菌多样性研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):369-373.
- [29]吴孔阳,姜亚芳,杨同香,等. 枯草芽孢杆菌功能及相关机制研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,2020(23):55-58.
- [30]王琦,谢晓佩,吴庆侠,等. 牦牛源枯草芽孢杆菌的益生作用研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(11):157-165.
- [31]闫晓妮,马天有,杜仁佳,等. 解淀粉芽胞杆菌胞外抑菌活性物质研究现状[J]. 中国微生态学杂志,2018,30(2):229-234,249.
- [32]何深宏,程方俊,罗干,等. 解淀粉芽胞杆菌高产纤维素酶菌株的筛选与鉴定[J]. 福建农业学报,2020,35(7):781-787.