

包书军,熊智,李雕益,等.思茅松毛虫 2 龄幼虫肠道可培养细菌的多样性[J].江苏农业科学,2022,50(1):97-102.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.01.018

思茅松毛虫 2 龄幼虫肠道可培养细菌的多样性

包书军¹,熊智²,李雕益¹,李选文¹,熊忠平³,罗曼⁴

(1.西南林业大学生命科学学院,云南昆明 650224;2.西南林业大学继续教育学院,云南昆明 650224;

3.西南林业大学生物多样性学院,云南昆明 650224;4.西南林业大学林学院,云南昆明 650224)

摘要:以云南安宁地区思茅松毛虫(*Dendrolimu kikuchii*)2 龄幼虫为研究对象,研究其肠道细菌多样性,以期对思茅松(*Pinus kesiya* var. *langbianensis*)等植物保护奠定基础,并为思茅松毛虫的生物防治提供数据。试验采用纯培养法对思茅松毛虫 2 龄幼虫肠道细菌进行分离纯化,通过对菌株形态特征观察和生理生化测定进行初步鉴定,然后结合 16S rDNA 分子鉴定技术判定细菌的分类学地位。结果显示,从 2 龄幼虫肠道中分离得到 115 株细菌,隶属于 4 个属,8 个类群,分别为 *Enterobacter* sp.、*Staphylococcus* sp.、*Bacillus* sp.、*Corynebacterium* sp.,其中 23 株肠杆菌属分为 2 个类群,55 株葡萄球菌属分为 3 个类群,27 株芽孢杆菌属分为 2 个类群,10 株棒状杆菌属有 1 个类群。优势菌群葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.)相对分离率最高(48.00%),2 龄幼虫肠道细菌的 Shannon 多样性指数、Simpson 优势度指数、Margalef 丰富度指数分别为 2.052 6、0.868 2、1.475 3,说明思茅松毛虫 2 龄幼虫肠道细菌具有丰富的多样性。

关键词:思茅松毛虫;肠道细菌;16S rDNA;多样性

中图分类号:S433.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)01-0097-06

我国松毛虫可分为 7 个属 82 种,分别是松毛虫属(*Dendrolimus*)、云毛虫属、大毛虫属、小毛虫属、丫毛虫属、杂毛虫属、栎毛虫属,而思茅松毛虫属于松毛虫属(*Dendrolimus*)^[1],因最早在云南思茅地区发现而被命名为思茅松毛虫^[2],主要分布在我国四川、云南、广东、江西、台湾、安徽等省份^[3],一年发生 1~2 代,以幼虫危害最大,是我国南方重要松树害虫,主要危害松树有思茅松、云南松、海南松、云南油杉、马尾松和短叶松等^[4],严重时可能造成毁灭性灾害^[5]。

思茅松毛虫的防治方法主要包括:生物防治、物理防治、化学防治等^[6]。生物防治是近年常用效果较好的方法,主要是利用微生物、激素等方法进行防治^[7];万鹰等利用白僵菌粉喷洒于有思茅松毛虫的树上,研究白僵菌对思茅松毛虫的防治效果,结果显示,白僵菌的防治效果相对于其他 3 种药剂要慢,但防治效果持久^[8]。物理防治是利用灯光诱

集成虫使其接触高压电而死亡,或利用人工摘茧除卵等的方法^[6]。化学防治是指利用化学药剂杀灭害虫的方法,通常使用的化学药剂有 50% 马拉硫磷乳剂、杀螟松乳剂等,每年的 4—6 月在大面积防治中使用浓度为 20% 杀灭菊酯较为适用^[9]。

微生物研究一直是人们研究的热点,其中,昆虫肠道微生物也是人们的研究焦点之一,且随着测序技术的不断提升和发展,对于微生物的识别更加迅速和准确^[10]。昆虫肠道微生物的数量和种类均非常多,且肠道微生物对机体的发育、生理、营养吸收等均有巨大影响^[11]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验时间:2018 年 10 月至 2019 年 5 月。
地点:云南省安宁市草铺镇森林地区(24°31'~25°6' N,102°8'~102°37' E),平均海拔 1 968 m。

试验样本为思茅松毛虫 2 龄幼虫,根据安宁市森林的情况在采集地方圆 1 km² 范围内随机挑选 10 个样品点,每个样品点采集 10 头健康的 2 龄幼虫,总计 100 头,采集样本的同时将样本所在的树枝带回实验室,用于 2 龄幼虫饲养,为后续研究做准备。

1.2 分离培养基与试剂、仪器

分离培养基:牛肉膏蛋白胨培养基(NA);牛肉

收稿日期:2021-04-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:3166010405);云南省重大科技专项(编号:202002AA10007)。

作者简介:包书军(1994—),男,甘肃漳县人,硕士研究生,主要从事肠道微生物研究。E-mail:1070879926@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。

膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 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。

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

主要仪器: YXQ - LS 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、AL204 电子天平(Mettler - Toledo Group)、SW - CI 超净工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、HHB11 电热恒温培养箱(上海跃进科技仪器厂)、Haier 冷藏柜、HH - 2 数显电子恒温水浴锅(金坛市丹瑞电器厂)、DHG - 9053A 型、电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)、ZHWY - 200B 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司)、Galanz 微波炉、Midea 电磁炉、70 型离子交换纯水器(上海南华医疗器械厂)、SZ - 96 自动纯水器(上海亚荣生化仪器厂)、FM130 制冰机(GRANT)、微量移液器(2.5、10.0、50.0、200.0、1 000 μ L)(芬兰 Finn timer)、HBA - 1960 PCR 扩增仪(MJ RESEARCH)、DYY - 8C 电泳仪及电泳槽(北京市六一仪器厂)、凝胶成像分析仪(美国 Bio - Rad 公司, Gel - Doc XR+)。

1.3 肠道细菌的分离纯化

选取 100 头健康的 2 龄幼虫, 试验前饥饿处理 40 h 即在恒温 22 ~ 24 °C、恒湿 80% ~ 85% 条件下, 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。将试验幼虫置于冰上 3 ~ 5 min, 待其昏迷; 采用 70% 乙醇擦拭幼虫体表 30 s, 无菌水冲洗 2 ~ 3 遍, 0.1% HgCl₂ 棉球擦拭幼虫体表 10 s, 无菌水冲洗 4 ~ 5 次, 在超净工作台中将体表消毒好的幼虫固定于无菌蜡盘上, 使用灭菌后的细尖钳将幼虫腹部剖开, 取出整个肠道, 并立即用 0.9% 无菌 NaCl 溶液冲洗表面 2 次, 然后将肠道取出放入无菌离心管中, 并向离心管中加入 1 mL PBS 缓冲液研磨成匀浆, 备用。

吸取上述肠道匀浆 1 mL 置于 9 mL PBS 缓冲液中, 稀释成 10⁻¹, 按照 10 倍梯度稀释至 10⁻⁵, 吸取每个浓度稀释液 100 μ 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 μ L 涂布于 NA 培养基上, 作为试验空白对照组。将涂布均匀的培养平板倒置于 37 °C

培养箱内, 培养 72 h 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 的培养皿, 根据涂有肠道内容物悬液培养皿上单菌落的不同形态特征, 挑选单菌落移至新的 NA 培养基平板上, 采用分三区的划线法进行菌株纯化, 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。

1.4 2 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, 对菌落进行染色^[12]并参考《常见细菌系统鉴定手册》^[13]对菌落特征进行描述。

1.5 2 龄幼虫肠道可培养菌株的生理生化鉴定

按照《现代微生物学实验技术》^[14]、《微生物学实验教程》^[15]等微生物生理生化鉴定的方法, 对 2 龄幼虫肠道细菌进行生理生化鉴定。

1.6 2 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
在 NA 培养基上活化分离得到的纯菌株, 然后接种至液体培养基扩大培养、离心、收集菌体, 利用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 2 龄幼虫肠道细菌基因组 DNA。用 1.0% 的琼脂糖凝胶检测提取出的细菌基因组 DNA, 得到的片段大小符合细菌基因组 DNA 后, 再将检测合格的 DNA 产物作为 16S rDNA 序列扩增模板。扩增引物选择: 正向引物 27F(5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') 和反向引物 1492R(5' - GGTACCTTGTACGACTT - 3')。PCR 扩增体系为: 25.0 μ L 的 2 × Taq PCR MasterMix; 3.0 μ L 的模板 DNA; 10.0 μ mol/L 正向引物 27F 和反向引物 1492R 各 1.0 μ L; 双蒸水补充至 50.0 μ 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 μ L PCR 扩增后的产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 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 2 龄幼虫肠道细菌系统发育树构建
通过 DNA MAN6.0 软件进行矫正及拼接测得的序列, 然后将拼接完成的 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。

1.7 分离率与群落结构多样性分析

(1)分离率与相对分离率,分别衡量的是 2 龄幼虫肠道细菌丰富度和某种 2 龄幼虫肠道细菌的优势度。分离率指从样品中分离纯化得到的菌株数与全部样本虫数的比值;相对分离率指分离到的某种 2 龄幼虫肠道细菌株数占分离到的总菌株数的百分率。

(2)群落结构多样性分析

多样性指数^[25]的计算公式如下:

①Shannon 指数: $H' = - \sum_{i=1}^k P_i \ln P_i$;

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

③Margalef 丰富度指数: $Ma = (S - 1) / \ln N$;

上述 3 个公式中,S 表示某个 2 龄幼虫肠道细菌的种类数,N 表示某个 2 龄幼虫肠道细菌的总量,

P_i 表示某种 2 龄幼虫肠道细菌的相对分离率。

2 结果与分析

2.1 2 龄幼虫肠道细菌的分离结果

从 100 头 2 龄幼虫肠道中共分离得到 115 株细菌,分离率达 115.00%。根据菌落的形态特征共有 8 个类群,整理编号得:N201 ~ N208。

2.2 2 龄幼虫肠道细菌形态特征

对分离得到的 8 株细菌的菌落特征与革兰氏染色结果进行观察,结果(表 1)表明,8 株菌株中多数菌株的革兰氏染色结果呈阳性,仅有 1 株呈阴性。且大部分菌株为杆状,仅有 N207、N208 为球状,N202 为拟球状;大部分菌株边缘整齐且不透明,只有 N206、N207 半透明;多数菌株表面光滑湿润。

表 1 2 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 (%)
N201	G ⁻ ,杆状	圆形微凸起	灰白色	整齐	不透明	表面光滑湿润	12	10.43
N202	G ⁺ ,拟球状	圆形微凸起	乳白色	整齐	不透明	较干燥无光泽	18	15.65
N203	G ⁺ ,杆状	圆形凸起	乳白色或微黄色	不整齐	不透明	表面褶皱无光泽	14	12.17
N204	G ⁺ ,杆状	圆形凸起	黄色	整齐	不透明	表面光滑湿润	10	8.70
N205	G ⁺ ,杆状	圆形平坦	微黄色	整齐	不透明	表面光滑湿润	13	11.30
N206	G ⁺ ,杆状	圆形凸起	白色	整齐	半透明	表面光滑湿润	11	9.57
N207	G ⁺ ,球状	圆形凸起	乳白色	整齐	半透明	表面光滑湿润	20	17.39
N208	G ⁺ ,球状	圆形凸起	白色或柠檬色	整齐	不透明	表面光滑	17	14.78

2.3 2 龄幼虫肠道细菌生理生化鉴定及多样性分析

经过对生理生化指标(表 2)的聚类分析可知,在欧氏距离 4.8 左右处,可将 8 个细菌类群划分为 2 个遗传聚类组,N204 自成一类,其他 7 个细菌类群为一类,其中,N201、N206 属于一类,N202、N203、N205、N207、N208 属于另一类(图 1)。

结合生理生化指标、细菌的形态特征、菌落及显微形态特征,查询细菌鉴定手册后,将分离到的 8 种细菌形态,初步鉴定为,N201、N206 均属于肠杆菌属 *Enterobacter* sp.,N202、N207、N208 为葡萄球菌属 *Staphylococcus* sp.,N203、N203 为芽孢杆菌属 *Bacillus* sp.,N204 为棒状杆菌属 *Corynebacterium* sp.,部分菌株因为菌种形态过于相似,需进一步进行后续分子生物学鉴定。

由表 1 可知,115 株 2 龄幼虫肠道细菌中,葡萄球菌属 *Staphylococcus* sp.(N202、N207 和 N208)相

对分离率为 48.00%,是思茅松毛虫 2 龄幼虫肠道细菌的优势菌群。另外,思茅松毛虫 2 龄幼虫肠道细菌的 Shannon 多样性指数、Simpson 优势度指数、Margalef 丰富度指数分别为 2.052 6、0.868 2、1.475 3,说明思茅松毛虫 2 龄幼虫肠道细菌具有丰富的多样性。

2.4 2 龄幼虫肠道可培养细菌 16S rDNA 分析结果

将所获 8 种细菌形态 2 龄幼虫肠道细菌 16S rDNA 序列在 GenBank 中注册,获得 GenBank 登录号。由表 3 可知,分离到的 2 龄幼虫肠道细菌与相应菌株的 16S rDNA 序列相似度在 97% ~ 99%。115 株细菌隶属于 4 个属、8 个类群,初步鉴定为,N201 为阿氏肠杆菌 *Enterobacter asburiae*,N202 为木糖葡萄球菌 *Staphylococcus xylosus*,N203 为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*,N204 为嗜甘氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glyciniphilum*,N205 为阿氏芽孢杆菌 *Bacillus aryabhattai*,N206 为肠杆菌属 *Enterobacter*

表 2 2 龄幼虫肠道可培养细菌的生理生化特征

菌株编号	N201	N202	N203	N204	N205	N206	N207	N208
淀粉水解	-	+	+	-	+	-	-	-
蛋白水解	-	+	+	-	+	-	+	+
油脂利用	+	+	+	+	+	+	-	+
纤维素分解	-	-	-	-	-	-	-	-
耐盐性 5%	-	-	-	-	-	-	-	-
明胶水解	-	+	+	-	+	+	-	-
M-R	+	-	-	+	-	-	-	+
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	+	+	+	+	+	-	-	-
木糖	-	-	-	+	-	-	-	-
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	+	+	+	-	+	-	+	+
吡啉	-	-	+	-	-	-	-	-
pH 值 3	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 值 12	-	-	-	-	-	-	-	-
3-酮基乳糖	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	+	-	-	-	-	-

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

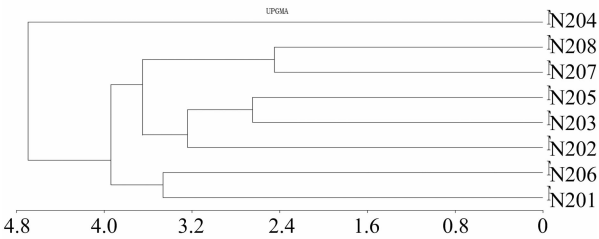


图1 菌株生理生化聚类

sp, N207 为科氏葡萄球菌 *Staphylococcus cohnii*, N208 为表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis*, 这些思茅松毛虫 2 龄幼虫肠道细菌均不能确定其真正的种属地位, 需要做进一步研究以鉴定其分类学地位。

2.5 系统发育树

将 2 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。由图 2 可知, 思茅松毛虫 2 龄幼虫肠道可培养细菌归属于 3 个大类, 第一大类为厚壁菌门, 分别为: 芽孢杆菌属 *Bacillus* sp.、葡萄球菌属 *Staphylococcus* sp.; 第二大类为变形菌门, 为肠杆菌属 *Enterobacter* sp.; 第三大类为放线菌门, 为棒状杆菌属 *Corynebacterium* sp.。

3 结论与讨论

思茅松毛虫对思茅松等松科植物有严重危害, 由于对松科植物的危害而对林业造成巨大的损失, 对生态环境和人类生产生活造成巨大影响。本研究以思茅松毛虫 2 龄幼虫为研究材料, 通过对 2 龄幼虫肠道中的可培养细菌进行菌落观察、生理生化实验和 16S rDNA 同源性分析, 共分离得到 115 株肠道可培养细菌, 初步推测隶属于 4 个属、8 个类群。通过对肠道细菌的相对分离率进行分析, 葡萄球菌属的相对分离率最高, 为 48.00%, 是 2 龄幼虫肠道细菌的优势菌属。通过对其多样性做一步分析, 得到肠道可培养细菌具有丰富的多样性。

不同地域的思茅松毛虫肠道细菌种类存在一定差异。本次试验样品 2 龄思茅松毛虫幼虫采集地为云南安宁地区, 结果显示 2 龄思茅松毛虫肠道可培养细菌有 115 株, 属于 *Enterobacter* sp.、*Staphylococcus* sp.、*Bacillus* sp.、*Corynebacterium* sp.; 张武先等利用传统培养法从采自云南思茅地区的思茅松毛虫 2 龄幼虫肠道内分离出了 5 株好氧细菌属于 *Enterobacter* sp.^[16]。

同一区域不同龄期思茅松毛虫肠道微生物种类不尽相同。李选文等从云南安宁采集的思茅松毛虫 6 龄幼虫, 从肠道内分离出 104 株菌, 隶属于芽

表 3 2 龄幼虫肠道细菌 GenBank 登录号及最大相似菌株

菌株编号	GenBank 登录号	最大相似菌株	相似度 (%)
N201	MK629786.1	<i>Enterobacter asburiae</i> (KC568144.1)	97
N202	MK629787.1	<i>Staphylococcus xylosus</i> (KT339332.1)	97
N203	MK629788.1	<i>Bacillus subtilis</i> (KT588643.1)	97
N204	MK629789.1	<i>Corynebacterium glyciniphilum</i> (MG198681.1)	99
N205	MK629790.1	<i>Bacillus aryabhattai</i> (KX230137.1)	99
N206	MK629791.1	<i>Enterobacter</i> sp (EU196755.1)	99
N207	MK629792.1	<i>Staphylococcus cohnii</i> (KT261250.1)	96
N208	MK629793.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (EU834244.1)	96

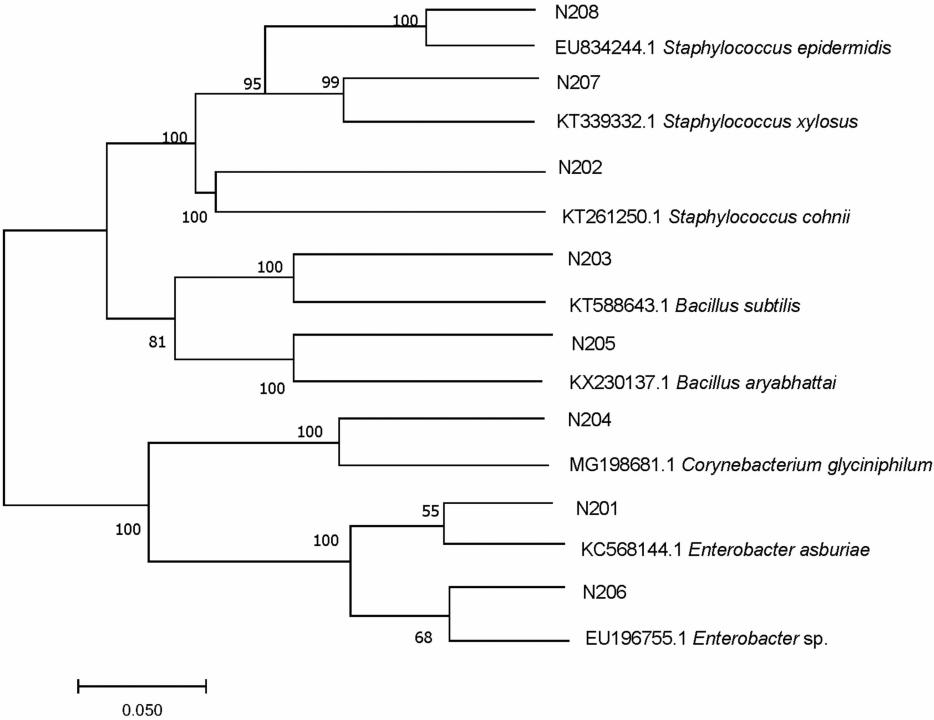


图2 基于 16S rDNA 序列构建 2 龄幼虫肠道细菌的系统发育树(邻接法)

孢杆菌属、类芽孢杆菌属、苍白杆菌属、短芽孢杆菌属、微球菌属、莫拉菌属、栖水菌属、土壤芽孢杆菌属、葡萄球菌属、普罗威登斯菌属^[17]。康柳等从云南昆明采集健康的松毛虫,实验室人工饲养至 3 龄然后在其肠道内分离出 11 株细菌,分别属于 *Bacillus* sp.、*Staphylococcus* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Klebsiella* sp.、*Escherichia* sp.^[18]。孙佑赫等从采自普洱地区的 4 龄幼虫肠道内分离出 11 株细菌,分别属于 *Klebsiella* sp.、*Bacillus* sp.、*Brevibacillus* sp.、*Lysinibacillus* sp.、*Raoultella* sp.、*Proteobacterium* sp.^[19]。王金华等从采自普洱的 5 龄幼虫肠道内分离出 10 株细菌,分别属于 *Yokenlla* sp.、*Klebsiella*

sp.、*Bacillus* sp.、*Citrobacter* sp.^[20]。孙佑赫等从采自普洱市的 6 龄幼虫肠道内分离出 6 株细菌,分别属于 *Bacillus* sp.、*Klebsiella* sp.^[21]。马艳芳等从采自普洱市的 7 龄幼虫肠道内分离出 14 株细菌,分别属于 *Leclercia* sp.、*Corynebacterium* sp.、*Yokenella* sp.、*Enterobacter* sp.^[22]。昆虫通常通过环境和食物获取各类微生物^[23],所以不同的生长环境及食物使幼虫摄入体内的细菌不同,从而影响幼虫肠道细菌的种类。研究发现极端碱性条件不利于绝大多数细菌的生长^[24],也有些细菌能在极端碱性条件下生活,如肠球菌能在 pH 值却高达 11~12 的鳞翅目幼虫中肠里生活^[25],说

明肠球菌可能以某种方式缓冲肠道极端 pH 值。本研究通过对 2 龄幼虫的肠道细菌分离得到了包含球菌在内的 8 个类群细菌,这为防治思茅松毛虫提供了依据。

随着分子生物学技术的发展,可以通过宏基因组学技术直接提取肠道细菌的总 DNA,进而分析出整个肠道的细菌种类,使得对昆虫的肠道微生物的研究更加方便。本次试验通过纯培养技术分离得到的 2 龄幼虫肠道细菌只是肠道细菌中很少的一部分,需要结合宏基因组技术,才能得到较为全面的细菌类群。

思茅松毛虫是林业重要的害虫,尤其是对松科植物危害十分严重,对其肠道微生物进行研究,不仅可以补充昆虫肠道微生物资源库,还可以据此进一步分析肠道细菌对昆虫生长发育的影响,最终得到防治思茅松毛虫的生物制剂,从而减少林业害虫的危害。

参考文献:

- [1]侯陶谦. 中国松毛虫防治研究进展[J]. 中国森林病虫,1993(2):40-42.
- [2]侯陶谦. 中国松毛虫[M]. 北京:科学出版社,1987:32-34.
- [3]陈明树,孙松柏,汤显春. 思茅松毛虫核型多角体病毒的初步研究[J]. 中国森林病虫,1985(4):5-6.
- [4]北京林学院昆虫教研组. 思茅松毛虫的研究[J]. 北京林业学院学报,1981(1):25-35.
- [5]卢 斌,卜良高,舒卫奇. 思茅松毛虫的发生与防治[J]. 安徽林业科技,2003(1):29.
- [6]卢 斌. 思茅松毛虫生物学特性及防治方法[J]. 安徽农学通报,2008(3):98.
- [7]程克华. 思茅松毛虫的发生及综合防治[J]. 现代农业科技,2018(9):159.
- [8]万 鹰,刘德波,徐晓丽,等. 四种杀虫剂林间防治思茅松毛虫试验[J]. 中国森林病虫,2018,37(2):46-48.
- [9]张荣超. 思茅松毛虫的生物学特性及防治技术[J]. 现代园艺,2015(6):63.
- [10]周 帆,庞志倡,余小强,等. 昆虫肠道微生物的研究进展和应用前景[J]. 应用昆虫学报,2020(3):600-607.
- [11]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.
- [12]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.
- [13]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.
- [14]朱旭芬. 现代微生物学实验技术[M]. 浙江:浙江大学出版社,2011:269-275.
- [15]周德庆,徐德强. 微生物学实验教程[M]. 北京:高等教育出版社,2013:350-352.
- [16]张武先,王金华,熊 智,等. 思茅松毛虫 2 龄幼虫肠道好氧细菌的筛选及毒力测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(28):17288-17290.
- [17]李选文,熊 智,黄雨云,等. 安宁思茅松毛虫 6 龄幼虫肠道可培养细菌的多样性研究[J]. 西部林业科学,2021,50(2):40-47,77.
- [18]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.
- [19]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.
- [20]王金华,李 彪,张武先,等. 五龄思茅松毛虫幼虫的肠道好氧细菌多样性分析[J]. 应用昆虫学报,2013,50(1):230-234.
- [21]佑 赫,熊 智,王金华,等. 思茅松毛虫 6 龄幼虫肠道细菌的 ARDRA 分析与鉴定[J]. 湖北农业科学,2012,51(8):1684-1686.
- [22]马艳芳,陈升富,王金华,等. 思茅松毛虫 7 龄幼虫肠道好氧细菌的筛选及毒力测定[J]. 中国森林病虫,2012,31(1):1-4.
- [23]迎 新,刘彦群,李 群,等. 昆虫肠道微生物多样性研究进展[J]. 河南农业科学,2016,45(11):1-7.
- [24]Engel P,Moran N A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function[J]. FEMS Microbiology Reviews,2013,37(5):699-735.
- [25]蓝波妙. 斜纹夜蛾肠道细菌多样性及其功能研究[D]. 福州:福建农林大学,2016:1-4.