



昆虫共生菌对宿主功能研究的方法体系*

王争艳** 苗世远 何梦婷 王文芳 鲁玉杰

(河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要 共生菌可参与昆虫的生理生化过程, 影响昆虫的营养、生长发育、解毒作用、天敌防御和免疫能力等。在共生菌对宿主功能的研究中, 核心问题是如何从组成复杂的共生菌组中筛选出具有特定功能的共生菌。共生菌对宿主功能的研究模式通常包括: 通过共生菌多样性分析, 提出差异共生菌对宿主功能的假设; 分析并验证特定共生菌在宿主体内的功能。本文围绕共生菌对宿主功能的研究模式, 系统地总结和比较昆虫共生菌功能研究的方法和技术, 构建昆虫对宿主功能研究的方法体系, 以期推进共生菌-宿主联系的研究。
关键词 昆虫; 细菌; 共生; 多样性分析; 功能分析; 方法体系

Review of the methodology used in the functional analysis of insect-microbial symbioses

WANG Zheng-Yan** MIAO Shi-Yuan HE Meng-Ting WANG Wen-Fang LU Yu-Jie

(School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract Microbial symbionts play an important part in the physiological and biochemical processes of insects, and can affect the nutrition, development, insecticide resistance, predator defense and immunity of their hosts. The key question in research on the function of insect-microbial symbioses is how to isolate symbiotic microbes with specific functions from the complex symbiotic microbiome. Identifying the function of insect-microbial symbioses typically involves proposing hypotheses for the function of certain symbionts based on a diversity analysis of microbiomes from different host phenotypes, then analyzing and verifying the function of certain symbionts. This review systematically summarizes and compares various technologies used in function analysis of insect-microbial symbioses, and constructs a general methodology for this kind of research to accelerate the study of interactions between insects and their microbial symbionts.

Key words insect; microbiota; symbiosis; diversity analysis; function analysis; methodological system

共生菌与昆虫有着密切的联系, 可参与昆虫的生理生化过程, 影响昆虫的营养、生长发育、解毒作用、天敌防御和免疫能力等 (Engel and Moran, 2013)。共生菌影响宿主功能的机制有 2 种: 一是共生菌在宿主体内直接发挥功能, 如产生解毒酶影响昆虫抗药性 (Ramya *et al.*, 2016) 和碳水化合物水解酶影响昆虫的营养功能 (Anand *et al.*, 2010) 等; 二是共生菌通过影响宿主的代谢过程间接影响宿主的功能, 如调控宿

主的免疫系统 (Hernandez-Martinez *et al.*, 2010) 和解毒酶基因的表达来提高昆虫的抗逆性 (张云骅等, 2019)。研究共生菌对宿主的功能及其机制对于害虫治理和经济昆虫利用具有重要的意义。

在共生菌对宿主功能的研究中, 核心问题是如何从组成复杂的共生菌组中筛选出具有特定功能的共生菌。其研究模式通常包括: (1) 以昆虫的不同表现型为出发点, 明确昆虫表现型间共生菌多样性的差异, 将研究对象聚焦到丰度有差

*资助项目 Supported projects: 河南省科技公关项目 (202102110059); 国家自然科学基金项目 (31601890); 国家留学基金 (201908410090)

**通讯作者 Correspondence author, E-mail: zywangedu@163.com

收稿日期 Received: 2020-02-16; 接受日期 Accepted: 2020-03-25

异的共生菌, 并提出差异共生菌对宿主功能如解毒、营养、化学通讯等的假设; (2) 分析并验证特定共生菌对宿主的功能。其研究技术因共生菌种类而异: 对于可体外培养的共生菌, 可以向无菌虫体回接共生菌, 从而明确共生菌对宿主的功能 (Coon *et al.*, 2014; Vilela *et al.*, 2015); 对于难以体外培养的共生菌, 则只能借助分析基因组、转录组、蛋白组和代谢组等组学数据, 推测和论证共生菌对宿主的功能 (Douglas, 2018; 毛曼菲等, 2019)。

昆虫-共生菌联系的研究技术发展迅速, 已有文献对共生菌的分离培养 (梅承等, 2018) 和多样性分析 (陈勃生等, 2017; 杨云秋等, 2018), 以及环境微生物转录组学 (蔡元锋和贾仲君, 2013)、宏基因组学 (叶雷等, 2016) 和微生物代谢组学 (王智文等, 2010) 等研究方法进行了综述。面对种类繁多的研究技术, 如何根据研究目标选取合适的研究技术, 是所有研究工作者都要面临的问题。因此, 本文围绕共生菌对昆虫功能的研究模式, 系统地总结和比较昆虫共生菌功能研究的方法和技术, 构建昆虫对宿主功能研究的方法体系, 以期推进共生菌对宿主功能的研究。由于共生细菌是功能研究的热点, 因此本文侧重于描述昆虫共生细菌相关的研究方法和技术。

1 昆虫共生菌多样性分析

共生菌多样性分析常用的方法有 2 种: (1) 分子标记分析法。对细菌的 16S rRNA 的可变区进行分析 (表 1), 通过比对细菌特征数据库进行较准确和全面的分类; (2) 体外培养鉴定法。解剖带菌组织获得菌液, 分离培养得到纯化菌株。根据菌株的各种特性或分析菌株的 16S rRNA 序列确定种类。然而, 由于共生菌生长所需的条件复杂, 绝大多数共生菌目前难以进行人工培养 (梅承等, 2018), 如在舞毒蛾 *Lymantria dispar* 幼虫中肠, 使用胰蛋白酶大豆琼脂培养基 (TSA) 分离出 15 种细菌, 利用末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP) 分析 16S rRNA 序列检测出 23 种细菌 (Broderick *et al.*, 2004), 而利用 16S rRNA 高通量测序分析出 203 个分类单元

(Martemyanov *et al.*, 2016)。因此, 尽管培养法能将共生菌明确到种的分类阶元, 但不能准确反映样品中共生菌的组成情况。

在共生菌多样性研究中, 使用的技术主要有共生菌的体外培养、菌落鉴定和计数以及共生菌分子标记分析。

1.1 共生菌的体外培养

共生菌的生存环境特殊, 需要特殊的营养物质、pH、氧分压和氧化还原电位, 对体外培养条件的要求苛刻 (Engel and Moran, 2013)。进行多样性分析时, 要根据各种菌的需求设计培养条件, 模拟昆虫体内生境, 同时注意避免外源微生物的干扰, 才能增加可体外培养菌的种类。常采用的方法有利用寡营养培养基, 使用特殊的营养组分, 添加非目的菌抑制剂和延长培养时间等 (梅承等, 2018)。

1.1.1 培养基的选择和优化 培养基的组成和 pH 值均会影响共生菌分离培养的种类, 如在培养基中添加醋酸钠前后, 从北美散白蚁 *Reticulitermes flavipes* 肠道中培养出的疣微菌门 *Verrucomicrobia* 菌株的品系不同 (Stevenson *et al.*, 2004); 家蚕 *Bombyx mori* 的肠道为碱性, 选用碱性培养基可提高肠道共生菌分离的种类 (Anand *et al.*, 2010)。常用的培养基有 LB、马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA)、马铃薯蔗糖琼脂 (PSA)、脑心浸液 (BHI)、TSA、胰蛋白酶大豆肉汤 (TSB) 和沙氏肉汤 (Sabouraud broth) 等。固体培养基主要用来纯化菌株, 而液体培养基多用来扩大培养菌株。联合选用多种培养基或参考 KOMODO (Known media database) 预测平台对已知菌的培养基进行优化可以提高共生菌分离培养的多样性 (Oberhardt *et al.*, 2015)。

在培养基加入特定组分制备选择培养基使共生菌落中的目的菌富集, 或是抑制非目的菌的生长可以促进目的菌的分离 (梅承等, 2018), 如在培养基中加入环己酰胺可以消除真菌对肠道共生菌的抑制作用 (Mason *et al.*, 2014); 在培养基中加入过氧化氢酶或丙酮酸盐, 降低氧化还原电位后, 可促进大肠杆菌 *Escherichia coli* 和创

表 1 16S rRNA 序列分析在昆虫共生菌多样性分析中的应用举例
 Table 1 Application of 16S rRNA gene sequencing in diversity analysis of insect microbial symbionts

种 Species	扩增区 Target zone	引物 (5'-3') Primers	多样性分析方法 Diversity analysis approaches	参考文献 References
美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	V3	27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT	构建 16S rRNA 基因文库测序	Fang <i>et al.</i> , 2013
蟋蟀 <i>Teleogryllus sp.</i>	V3-V4	341F: CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG 805R: GACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA	高通量测序	张科等, 2017
褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	V3-V4	333F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 806R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT	高通量测序	王天召等, 2019
桑粒肩天牛 <i>Apriona germari</i>	V3	357F: TACGGGAGGCAGCAG 518R: ATTACCGCGGCTGCTGG 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1492R: TACGGYTACCTTGTTACGACTT	DGGE; 构建 16S rRNA 基因 文库, RFLP	陈金华等, 2008
毛健夜蛾 <i>Brithys crini</i>	V1-V3	28F: GAGTTTGATCNTGGCTCAG 519R: GTNTTACNGCGGCKGCTG	高通量测序	Vilanova <i>et al.</i> , 2016
稻纵卷叶螟 <i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	V3-V4	338F: ACTCCTACGGGAGGCAGCA 806R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT	高通量测序	刘小改等, 2016
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	V3	27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT	构建 16S rRNA 基因文库, 基因 芯片	Tang <i>et al.</i> , 2012
贡嘎蝠蛾 <i>Hepialus gonggaensis</i>	V3	357F: GCCCTACGGGAGGCAGCAG 518R: ATTACCGCGGCTGCTGG	DGGE	穆冬冬等, 2010
小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	V6 V3	V6F: CAACGCGARGAACCTTACC V6R: CGACAGCCATGCASCACCT 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT	高通量测序; 纯化菌株扩增 测序	夏晓峰, 2014; 李文红等, 2015
斜纹夜蛾 <i>Spodoptera litura</i>	V3	343F: GCACTCCTACGGGAGGCAGCAG 534R: ATTACCGCGGCTGCTGG 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT	高通量测序; DGGE, 扩增 克隆测序	蓝波妙, 2016
海灰翅夜蛾 <i>Spodoptera littoralis</i>	V3	27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT	构建 16S rRNA 基因文库测序; 基因芯片	Tang <i>et al.</i> , 2012

伤弧菌 *Vibrio vulnificus* 的生长 (Stevenson *et al.*, 2004); 在半选择培养基 PCAT 上, 19 种 *Burkholderia* 属的细菌可正常生长, 而其它属如 *Pandoraea*、*Cupriavidus*、*Ralstonia* 和 *Wautersia* 则不能生长 (Tago *et al.*, 2015); 在 Berg's 琼脂中加入特殊的营养组分 (羧甲基纤维素、柑橘果胶、燕麦木聚糖、淀粉) 后, 从家蚕中肠中分离出能降解碳水化合物的共生菌 (Anand *et al.*, 2010)。

1.1.2 共生菌的分离和接种 在分离肠道共生菌时, 为避免食物中过路菌的影响, 通常会对试虫进行 24 h 的饥饿处理 (张伟等, 2004; Vilanova *et al.*, 2016)。为避免外源微生物的感染, 分离菌时多采用 70%-75%乙醇消毒试虫体表, 无菌水漂洗后, 在无菌环境下解剖出带菌组织。将带菌组织在无菌水或缓冲液中均质成菌液, 并迅速以 10 倍梯度稀释至 10^{-4} - 10^{-8} , 采用平板涂布法或连续划线法接种, 达到分离培养的目的。平板

涂布法是将菌液倒入培养皿后, 再加入培养基, 菌落在培养基底部生长, 适用于培养厌氧菌 (Anand *et al.*, 2010)。另外, 在分离厌氧菌时, 应在低氧条件下分离和接种, 以保证菌的活力 (Stevenson *et al.*, 2004)。

对于严格遵循垂直传播(由昆虫母代传给子代)的共生菌, 可采取宿主的卵作为共生菌分离对象, 以排除虫体其它共生菌的污染。如类酵母共生菌 (YLS) 在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 脂肪体和卵中均有分布, 通过侵染宿主卵母细胞垂直传播。为避免脂肪体中其它共生菌的干扰, 可采取褐飞虱的卵块分离 YLS (张珏锋等, 2009)。

1.1.3 培养的环境条件 尽可能模拟共生菌的生长环境, 如氧分压(无氧)、光照和温度等。由于共生菌的生长环境多为全暗条件, 优先考虑全暗培养 (李文红等, 2015)。在有氧条件下, 厌氧菌的生长会受到抑制, 如兼性厌氧的大肠杆菌与空气接触后, 一些突变品系的生长速率减慢。通过提高 CO₂ 浓度或降低 O₂ 浓度可以提高厌氧菌分离培养的多样性, 如在高 CO₂ (5%) 的环境中, 可从北美散白蚁肠道中培养出 Acidobacteria 菌门的多个菌株 (Stevenson *et al.*, 2004); 在无氧条件下, 可从家蚕肠道中培养出 11 种兼性厌氧菌 (Anand *et al.*, 2010)。

1.2 菌落鉴定和计数

菌落鉴定的方法有 2 种: (1) 形态和生化特征鉴定法。培养得到纯化的菌株后, 参照《微生物学实验手册》及 Hendricks 等 (1995) 的方法进行染色及生化试验。比对《Bergey's Manual of Systemic Bacteriology》和《一般细菌鉴定手册》中所描述的特征, 鉴别菌的种类 (张伟等, 2004)。受细菌分类特征的限制, 该法只能鉴定到属及以上的分类阶元; (2) 分子标记序列分析法。一般选择 16s rRNA 高变区 V3-V4 区, 使用通用引物进行 PCR 扩增后测序, 比对数据库来判断菌种的信息 (张科等, 2017; 王天召等, 2019)。

菌落形成单位 (Colony-forming units, CFU) 计数按照可数性原则, 记数相同稀释浓度下每个平板上培养出的典型目的菌落, 根据稀释倍数和

带菌组织 (如粪便、肠道) 的质量计算每克组织的带菌量 (Hernandez-Martinez *et al.*, 2010; 李文红等, 2015)。培养条件和培养时间均会影响 CFU, 因此, 该法仅适用于监测同种菌丰度的动态变化, 而不适用于比较不同种类丰度的差异。

1.3 共生菌分子标记分析

在第二代测序技术出现以前, 以 16S rRNA 为分子标记的研究对象, 先后利用荧光原位杂交 (FISH)、基于聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳/温度梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE/TGGE)、限制性片段长度多态性 (RFLP) (原理同核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析 (ARDRA))、T-RFLP 和基因芯片等方法结合第一代测序进行共生菌多样性分析。各方法的应用特点见表 2。在开展昆虫多样性研究时, 需要根据研究目的选用多样性分析的方法及其组合, 以提高分析结果的准确性和高效性。

高通量测序 (第二代测序技术) 是目前基因组学研究中应用最广泛的测序技术, 具有通量高, 速度快, 成本低等优点, 被广泛用于昆虫肠道共生菌多样性分析 (表 1)。高通量测序技术能够扩增出样品中绝大多数的 16S rRNA 基因序列, 通过对测序所得的序列进行比对筛选和聚类, 再与细菌常用数据库 (如 Silva, Greengenes 和 RDP) 或专用数据库, 如针对网翅目昆虫的 DictDb 数据库进行比对, 即可获得样品中共生菌的种属信息及其丰度 (叶雷等, 2016; 陈勃生等, 2017)。

利用荧光定量 PCR (qPCR) 可以对已知共生菌进行定量分析。可以针对某个分类阶元, 设计 16S rRNA 的特定引物来分析分类阶元的相对含量, 结合 16S rRNA 通用引物测定总细菌的含量, 可以得出某个分类阶元的相对丰度, 如对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫肠道中的变形菌门 Proteobacteria、厚壁菌门 Firmicutes、克雷伯氏菌属 *Klebsiella*、肠球菌属 *Enterococcus*、肠杆菌属 *Enterobacter* 和假单胞杆菌属 *Pseudomonas* 进行相对定量 (蓝波妙, 2016); 对褐飞虱成虫肠

表 2 共生菌分子标记分析方法比较
Table 2 Comparisons of different approaches for signal gene sequencing of microbial symbionts

方法 Approaches	基本原理 Principles	优点 Advantages	缺点 Drawbacks
荧光原位杂交 (FISH)	根据目的菌 16S rRNA 序列的相对保守区设计带有荧光标记的寡聚核苷酸探针, 与目标菌进行杂交, 通过检测目标序列的荧光强度来确定菌的种类和数量(黄卫强和张和平, 2014)。	①不依赖 PCR 扩增的分析技术。分辨率高, 检测步骤少; ②能检测目标菌的空间分布和动态变化; ③可以检测难以培养的菌; ④用不同的染料标记, 可同时处理多目标序列(呼庆等, 2004; Shi <i>et al.</i> , 2010)。	①不能检测未知的菌; ②细菌的自发荧光现象和探针的特异性不足可能导致假阳性结果; ③分析组分复杂的样品时, 结果易被干扰; ④不适用于低丰度目的菌的检测 (Shi <i>et al.</i> , 2010; 黄卫强和张和平, 2014)。
PCR 变性梯度凝胶电泳/温度梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE/TGGE)	扩增 16S rRNA 的可变区。不同扩增片段在变性凝胶电泳中解链所需的变性剂浓度或变性温度不同, 在凝胶的不同位置形成条带。根据条带位置判定种类, 根据条带亮度判定丰度(黄俊文等, 2006)。	①应用最广的不依赖基因测序的多样性分析方法; ②操作简单、成本低、快速; ③对目的条带进行回收测序, 可以明确到种; ④可以检测难以培养的菌(相辉等, 2007; Shi <i>et al.</i> , 2010; 杨云秋等, 2018)。	①检测灵敏度较低, 只能检测到相对丰度>1%的优势菌; ②要求 DNA 长度<500 bp, 否则 DGGE 分辨率降低; ③PCR 产物在电泳时会出现“共迁移”现象, 降低了特异性和分辨率; ④影响因素较多, 如样品预处理、引物、电泳条件等(黄卫强和张和平, 2014)。
限制性片段长度多态性 (RFLP)	用限制性内切酶消化 16S rRNA 扩增产物。由于不同来源的 DNA 碱基排列位置不同, 酶切位点分布不同, 产生长度不同的片段, 电泳谱图呈现多态性(夏月等, 2007)。	①比 DGGE 的分辨率高; ②受操作影响小, 重复性好; ③对克隆文库菌种进行分型, 避免选择克隆测序的盲目性; ④测定获得的序列数据库具有参考意义(赵小刚等, 2007; 陈金华等, 2008; 刘玮琦等, 2008)。	①更适用于已经成功分离的菌; ②对于复杂的样品, 需要构建 16S rRNA 基因文库, 操作步骤复杂; 电泳分析时要设置很多电泳重复, 整合电泳图谱较为费时(赵小刚等, 2007; 陈勃生等, 2017)。
末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP)	原理与 RFLP 相似, 在 PCR 引物中比 RFLP 多了末端荧光标记。酶切产物电泳后, 荧光扫描图谱上不同的峰代表不同的菌(陈勃生等, 2017)。	①最早的 DNA 标记技术; ②比常规 RFLP 分析多态性效率高; ③利用扫描图谱的峰面积可分析菌的含量(骆毅, 2010; Shi <i>et al.</i> , 2010; 杨云秋等, 2018)。	①片段无法进一步回收鉴定; ②无法区分近缘种; ③只检测末端序列, 不适用于区分末端序列相似的菌种(赵小刚等, 2007; 杨云秋等, 2018)。
基因芯片	将大量的 DNA 片段作为探针, 规则地排列并固定在固相介质上, 再与荧光标记的待测 DNA 杂交, 通过确定荧光强度最强的探针位置, 明确待测菌 DNA(徐晓丽等, 2018)。	①灵敏度和准确性高, 对目的菌检测限可达 1 000 CFU/mL, 比 PCR 电泳检测灵敏度高 100 倍以上; ②高通量和高效率, 可同时对上千个基因进行快速分析(黄卫强和张和平, 2014; 徐晓丽等, 2018)。	①只能检出已知菌, 而不能用于鉴定未知菌; ②不能判定菌的丰度(叶雷等, 2016)。
第二代测序 (高通量测序)	利用超声破碎将待测 DNA 打碎成小片段。在片段两端加上特定的接头序列, 构建新的 DNA 文库。文库中 DNA 经 Flowcell 后, 经几轮的桥式 PCR 扩增放大信号, 边合成边测序(徐晓丽等, 2018)。	①通量高, 可对复杂样品进行全方位分析; ②对难以培养菌和低丰度菌的检测效率高; ③克服了基因芯片不易发现新基因的局限(刘小改等, 2016; 徐晓丽等, 2018; 杨云秋等, 2018)。	①依赖大型测序平台, 不适合小规模测序; ②虽然高通量测序技术的价格不断降低, 但成本仍相对较高(王兴春等, 2012)。

道中 2 种细菌和真菌进行相对定量, 结果与宏基因组分析结果一致 (王天召等, 2019)。

2 昆虫共生菌功能的分析和验证

可通过 2 种途径来分析共生菌对宿主的功能: (1) 选择性地去除特定共生菌, 比较特定菌去除前后宿主表现型的变化来分析共生菌的功能。但是, 现有的灭菌方法, 如抗生素和高温去除共生菌的选择性低, 会影响多种共生菌的丰度, 这会对宿主产生复杂的影响, 据此很难分析特定菌与宿主的联系 (Chouaia *et al.*, 2012); (2) 对基因组、转录组、蛋白组和代谢组数据进行关联分析, 推测特定菌对宿主的功能 (Douglas, 2018)。

此外, 对于可体外培养的共生菌, 可通过体外生化实验分析其功能 (de Almeida *et al.*, 2017)。需要指出的是, 共生菌在体外具有的生理功能, 并不一定在宿主体内仍然能够表现出来, 反之亦然。因此, 可以将从昆虫体内分离纯化的菌株回接到无菌昆虫体内, 比较回接前后昆虫表现型的变化, 直观地验证特定共生菌对宿主的功能 (Coon *et al.*, 2014)。

在分析和验证共生菌功能的研究中, 需要的技术除 qPCR 外 (详情参见 1.3), 还有共生菌的去除和回接、共生菌体外生化测定和多组学数据分析。

2.1 共生菌的去除

对试虫进行灭菌处理前, 需在体外测定共生菌对灭菌方法的耐受性, 初步筛选灭菌方法及其剂量, 如将含抗生素的药敏纸片平贴于已接种菌株的培养基上, 培养 48 h 后, 测定抑菌圈直径判定该菌对抗生素的敏感性 (李文红等, 2015)。此外, 现有的灭菌方法如抗生素和高温处理均会给昆虫带来不可预测的影响 (Douglas, 1989), 这会对共生菌-宿主联系的分析产生干扰。因此, 要结合灭菌前后宿主种群发育参数的变化 (夹福先, 2009; Chouaia *et al.*, 2012), 制定合适的灭菌方案以最大程度地降低灭菌给昆虫带来的直接影响。最后, 需结合传统培养法、共生菌荧光染

色、PCR-DGGE 或 qPCR 等检测处理前后宿主体内共生菌含量的变化, 判定灭菌效果 (Dong *et al.*, 2009; Coon *et al.*, 2014; Rodgers *et al.*, 2017)。

2.1.1 杀菌剂处理

(1) 抗生素

抗生素处理是最常见的灭菌方法, 通过试虫取食或虫体注射, 可以去除胞外共生菌和内共生菌 (Engl *et al.*, 2018), 灭菌效果会随着抗生素处理剂量的增加和处理时间的延长而增强 (Lin *et al.*, 2015; Visweshwar *et al.*, 2015), 如使用利福平、庆大霉素和青霉素处理德国小蠊 *Blattella germanica* 的肠道共生菌, 处理剂量 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的去除效果要好, 处理 30 d 比 20 d 的去除效果要好 (刘浩, 2013)。但抗生素会对昆虫产生毒性, 如使用低剂量的链霉素饲喂橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* 后, 雌虫的生殖力降低 (Dimou *et al.*, 2010)。

共生菌对抗生素的敏感性存在差异, 如万古霉素和青霉素能去除革兰氏阳性菌, 链霉素和庆大霉素能去除革兰氏阴性菌 (Barnard *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020); 一种肠球菌对环丙沙星、左氧氟沙星和甲硝唑混剂的耐受性高于一种肠杆菌和 *Serratia* sp. (夏晓峰, 2014); 黄粉虫 *Tenebrio molitor* 肠道共生菌中的变形菌门对四环素的耐受性明显高于厚壁菌门 (Fredensborg *et al.*, 2020); 蒙氏肠球菌 *Enterococcus mundtii*、欧文氏菌 *Erwinia persicina* 和成团泛菌 *Pantoea agglomerans* 等细菌对青霉素、氨苄青霉素、麦迪霉素、克拉霉素和洁霉素的敏感性很低, 而对磷霉素、万古霉素、强力霉素的敏感性较高 (李文红等, 2015)。但是, 由于现有抗生素的广谱性, 仍缺乏能够选择性地去除特定共生菌的抗生素。

不过, 通过降低抗生素的使用剂量, 可以选择性改变某些共生菌的相对丰度。低浓度的环丙沙星、左氧氟沙星和甲硝唑混剂饲喂斜纹夜蛾后, 肠道中的三个优势菌属, 假单孢杆菌属、肠球菌属和克雷伯氏菌属的丰度降低, 但 *Staphylococcus pettenkoferi*、*Enterococcus casseliflavus* 和 *Staphylococcus arlettae* 的丰度上升 (蓝波妙, 2016)。使用 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (虫体重) 的氨苄

青霉素注射豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 后,能特异性地去除后代的一种兼性内共生菌 PAUS,而虫体必需共生菌 *Buchnera* 的丰度没有变化 (Tsuchida *et al.*, 2004)。但是,由于不能排除非目的菌丰度变化对宿主的影响,依据目的菌丰度改变后宿主表现型的变化推断其对宿主的功能存在很大的风险 (Chouaia *et al.*, 2012)。

如果目的是获得无菌昆虫,可以通过多种抗生素复配提高灭菌效果 (Li *et al.*, 2020),同时降低处理剂量和处理时间以减少抗生素处理对昆虫的直接影响。可将抗革兰氏阳性细菌的抗生素与抗革兰氏阴性细菌的抗生素组合使用。用环丙沙星、左氧氟沙星和甲硝唑混合液浸泡叶片饲喂小菜蛾 *Plutella xylostella* 初孵幼虫,能完全抑制中肠细菌的生长。为提高抗生素在植物叶片上的附着力,可在抗生素溶液中加入表面活性剂,如 1%的吐温-20 (夏晓峰, 2014)。将硫酸庆大霉素和青霉素复配,或将庆大霉素、链霉素和青霉素复配添加到糖水或血餐中可提高冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 成虫肠道共生菌的去除效果 (Dong *et al.*, 2009; Rodgers *et al.*, 2017)。庆大霉素、氯霉素、新霉素、氨基青霉素、利福平、链霉素和青霉素混剂能有效抑制棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫的肠道共生菌 (Visweshwar *et al.*, 2015)。

此外,有些专性共生菌为宿主提供必需的氨基酸和维生素 (Engel and Moran, 2013),为了减少抗生素处理去除专性共生菌给宿主带来的负面影响,可在宿主的饲料中添加必需的营养组分。专性共生菌 *Wigglesworthia* 与舌蝇 *Glossina morsitans morsitans* 雌蝇的生殖力密切相关 (Pais *et al.*, 2008),在食物中添加酵母提取物可降低四环素处理对雌蝇生殖的影响 (Engl *et al.*, 2018)。

(2) 其它杀菌剂

对于通过垂直胞外传播或水平传播的内共生菌,可以对卵进行灭菌处理,然后在无菌条件下饲养获得无菌昆虫。处理卵的杀菌剂多为一些非抗生素类杀菌剂,如利用过氧乙酸处理沙漠飞蝗 *Schistocerca gregaria* 的卵 (Dillon and Charnley, 2002); 先后使用 70%乙醇处理 5 min, 4%甲醛

处理 30 min 和 70%的乙醇处理 10 s, 获得 2 种龟蝽 *Megacopta cribraria* 和 *M. punctatissima* 的无菌卵 (Hosokawa *et al.*, 2007); 先后使用 70%乙醇处理 5 min, 3%的漂白剂和 0.1% ROCCAL-D 处理 3 min 和 70%乙醇处理 5 min, 无菌水漂洗 3 次, 获得埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 和冈比亚按蚊的无菌卵 (Coon *et al.*, 2014)。

注射溶菌酶也可获得无菌试虫。但是研究表明,溶菌酶改变昆虫共生菌组成的机理是溶菌酶对昆虫的毒性所致,而不是因为溶菌酶对共生菌细胞壁的破坏作用。溶菌酶可以有效去除美洲大蠊 *Periplaneta americana* 的共生菌,但是引起宿主组织发炎,并且干扰了宿主卵巢的发育 (Douglas, 1989)。因此,不建议使用溶菌酶来去除昆虫的共生菌。

2.1.2 高温和辐照处理 高温 (31-36 °C) 处理若干天可以有效去除臭虫科 Cimicidae、*Sitophilus* 属和 *Oryzaephilus* 属昆虫的共生菌。但是,高温处理不适用于去除蜚蠊和多数同翅亚目昆虫的共生菌,是因为这些共生菌对高温的耐受性要高于其宿主 (Douglas, 1989)。去除昆虫共生酵母菌时多采用高温处理,如 34-35 °C 连续处理豌豆蚜 2 日龄若虫 4-5 h, 专性共生菌 *Buchnera* 的数量显著降低 (Moran and Yun, 2015)。35 °C 连续处理褐飞虱初孵若虫 3 d, 共生酵母菌的数量显著降低 (傅强等, 2001)。33 °C 连续处理,三色书虱 *Liposcelis tricolor* 共生菌 *Wolbachia* 的共生率逐代递减,至第 6 代 *Wolbachia* 被完全去除。但是,相对于 F₁ 代, F₂-F₆ 代书虱的相对适合度 (以种群内禀增长率为评价指标) 持续从 0.995 降至 0.552, 说明长期高温处理会影响三色书虱的适合度 (夹福先, 2009)。

辐照在去除共生菌中的应用较少。有研究表明特定剂量的辐照处理可选择性去除某类共生菌,如使用 20-110 Gy 剂量 γ 射线处理后,舌蝇内共生菌 *Sodalis* 和 *Wolbachia* 的丰度下降,而 *Wigglesworthia* 的丰度不变,但文中未提到其它共生菌丰度的变化 (Engl *et al.*, 2018)。

2.1.3 共生菌荧光染色计数 用荧光染料对菌细胞染色后,使用荧光显微镜观察计数并计算组

织的总带菌量, 判定共生菌的去除效果。如使用 4,6-二氨基-2-苯基吡啶 (DAPI) 对舞毒蛾幼虫肠道共生菌染色计数 (Broderick *et al.*, 2004); 使用 5-(4,6-二氯三唑-2-基)胺)荧光素 (DTAF) 对北美散白蚁的肠道共生菌染色计数 (Stevenson *et al.*, 2004)。

2.2 共生菌的回接

为了消除抗生素等杀菌处理对宿主适合度造成的直接影响, 大多数研究首先利用广谱性的灭菌方法获得无菌昆虫, 然后通过比较特定共生菌回接前后宿主表现型的变化来分析共生菌-宿主间的联系。在回接共生菌时, 仍需结合传统培养法、qPCR 或 PCR-DGGE 等检测灭菌处理前后共生菌含量的变化, 判定共生菌的回接效果。

2.2.1 自然感染法 龟蝽科 *Plataspidae* 肠道共生菌的传播途径为垂直传播。雌虫排卵的同时会排出含肠道共生菌的共生菌囊 (Symbiont capsule), 若虫孵化后通过取食该囊回接共生菌。一种龟蝽的无菌卵孵化后, 通过取食另一种龟蝽的共生菌囊就可获得对方的肠道共生菌 (Hosokawa *et al.*, 2007)。

2.2.2 菌株饲喂法 将饲料与菌液混合, 在无菌的环境中饲喂无菌昆虫, 并定时更换新的处理饲料以保证回接的效果 (穆冬冬等, 2010)。使用植物组织作饲料时, 可以用 0.1% 的次氯酸钠溶液对组织进行灭菌处理。将组织在菌液中浸泡一定时间后, 取出备用 (Doane and Redys, 1970; 夏晓峰, 2014); 使用粉状饲料时, 将饲料制成粉片可以提高菌液分布的均匀性。将粉状饲料加入无菌水混合成糊状后, 晾干制成粉片 (直径 1 cm, 厚度 1 mm), 将菌液滴加到粉片表面饲喂昆虫 (Takatsuka and Kunimi, 2000); 使用液体饲料时, 直接将菌液与饲料混合即可。如使用含有共生菌 *Burkholderia* 的维生素 C 溶液饲喂蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 的 2 龄若虫 24 h 后, 继续使用无菌维生素 C 溶液饲养, 最后在 3 龄若虫中肠共生菌囊中能检测出 *Burkholderia* (Tago *et al.*, 2015)。从 1 龄幼虫开始, 在无菌埃及伊蚊幼虫生长的无菌环境中加入纯化的菌株, 持续饲

养至成虫能成功回接 *Acinetobacter*、*Aeromonas*、*Aquitalea*、*Chryseobacterium* 和 *Paenibacillus* (Coon *et al.*, 2014)。

2.2.3 菌液注射法 对于可体外培养的共生菌, 可将液体培养基进行离心并用磷酸盐缓冲液制成菌液后, 将菌液注射导入宿主组织 (Cowen *et al.*, 2009)。为消除虫体机械损伤和昆虫生活力的影响, 需要设置仅注射缓冲液的和正常的对照。使用注射法将乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* 菌液从未龄幼虫腹足处导入大蜡螟 *Galleria mellonella* 血淋巴中, 并抑制了宿主共生菌白假丝酵母菌 *Candida albicans* 的生长 (Vilela *et al.*, 2015); 将大肠杆菌导入柞蚕 *Antheraea pernyi* 滞育蛹中, 并成功诱导宿主产生抗菌物质 (黄自然和王少颐, 1981)。

对于难以体外培养的共生菌, 解剖昆虫获得带菌组织, 冰浴中均质, 离心获得菌液。向无菌昆虫体内注射菌液可实现回接。向初羽化成虫体内注射 4 龄若虫或 1-3 日龄成虫的腹部匀浆可回接豌豆蚜的专性共生菌 *Buchnera* (Moran and Yun, 2015) 或褐飞虱的共生菌 *Arsenophonus* (Pang *et al.*, 2018)。向去除兼性内共生菌 PAUS 的蚜虫体内注射带菌豌豆蚜的血淋巴后可回接该菌 (Tsuchida *et al.*, 2004)。将感染 *Wolbachia* 的果蝇的血淋巴注射到二化螟 *Chilo suppressalis* 卵中, PCR 检测发现二化螟雌虫 *Wolbachia* 的感染率为 7.1% (周文慧, 2017)。

2.3 共生菌体外生化测定

对于可体外培养的共生菌, 可将底物, 如杀虫剂和碳水化合物添加到培养基中, 培养一段时间后, 检测培养基中底物浓度的变化, 判定可体外培养共生菌的功能。利用此方法, 确定了小菜蛾肠道共生菌 *Bacillus cereus* 能降解茚虫威 (Ramya *et al.*, 2016); 印度谷螟 *Plodia interpunctella* 肠道共生菌 *Enterobacter asburiae* 和 *Bacillus* sp. 能降解聚乙烯塑料 (Yang *et al.*, 2014); 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 肠道共生菌能降解高效氯氟氰菊酯、溴氰菊酯、乙基毒死蜱、虱螨脲和多杀菌素 (de Almeida *et al.*, 2017); 点蜂缘蝽

Riptortus pedestris 共生菌 *Burkholderia* 具有降解杀螟硫磷的能力 (Tago *et al.*, 2015); 舞毒蛾共生菌群能降解酚苷 (Mason *et al.*, 2014); 家蚕、小菜蛾和斜纹夜蛾肠道共生菌能降解多种碳水化合物 (Anand *et al.*, 2010; 夏晓峰, 2014; 孙博通等, 2017)。

也可通过分析培养基中积累的功能性物质, 如降解酶的含量和活性来明确共生菌的体外活性, 如在改进的 CPDA 液体培养基中加入吡虫啉, 接入褐飞虱共生菌解脂假丝酵母 *Candida lipolytica* 的纯化菌株, 培养数天后, 测定培养基中的蛋白含量和解毒酶羧酸酯酶活性、谷胱甘肽-S-转移酶活性、多功能氧化酶的活性, 从而判定该菌株的解毒能力 (李娜等, 2010); 将肠道菌枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的发酵产物滴加到德国小蠊成虫背板后, 德国小蠊对白僵菌 *Beauveria bassiana* 的耐受性增加, 说明枯草芽孢杆菌的代谢物具有抑制真菌的功能 (黄艳红, 2012)

2.4 多组学分析

共生菌和宿主之间通过代谢物进行交流和建立联系, 多组学产生的大量数据为全方位和多层次地研究昆虫-共生菌的代谢物和分子功能交流提供了机会。例如, 通过共生菌的宏基因组或基因组分析可以推测共生菌潜在的代谢功能; 通过分析蛋白组和宏转录组可以推测共生菌与宿主的分子功能交流; 通过代谢组分析可以为共生菌对宿主的功能提供更为直接的证据。将基因组、转录组、蛋白组和代谢组等组学数据加以整合, 研究多个层面的分子网络系统变化, 能更精确地阐述关键功能基因的表达模式和参与通路, 为预测共生菌对宿主的功能提供更可靠的数据支持 (Douglas, 2018; 毛曼菲等, 2019)。

2.4.1 基因组和宏基因组分析 宏基因组学对样品中所有的 DNA 序列进行测序, 能够全面地分析肠道菌群的组成, 特别是能分析 16S rRNA 序列不能区分的种内多样性 (Ellegaard and Engel, 2016)。此外, 将宏基因组数据和功能数据库进行比对注释和功能分析, 可以推测共生菌

潜在的代谢功能。分析从蜜蜂属 *Apis* 和熊蜂属 *Bombus* 中分离的肠道菌的基因组发现, *Gilliamella apicola* 和 *Snodgrassella alvi* 在宿主体内利用的代谢原料不同, 前者进行糖酵解, 而后者进行羧酸氧化 (Kwong *et al.*, 2014); 在松树皮象 *Hylobius abietis* 中肠共生菌宏基因组中发现二萜酸降解基因 *dit* 的同源序列, 推测中肠细菌可能参与二萜酸的降解过程 (Berasategui *et al.*, 2017); 比较 2 种植食性昆虫和木食性白蚁的肠道共生菌宏基因组发现, 植食性昆虫肠道菌中有丰富的淀粉酶和葡萄糖酶等相关基因, 而白蚁肠道菌中富含纤维素酶相关基因 (Shi *et al.*, 2013)。

结合共生菌宏基因组与宿主基因组数据, 根据共生菌-宿主间的代谢功能互补原则可以预测某些共生菌对宿主的功能, 如利用 KEGG ipath2 程序分析了小菜蛾基因组和中肠共生菌宏基因组参与的代谢途径, 发现中肠共生菌宏基因组具有更多样的代谢途径, 一些肠杆菌和肉杆菌 *Carnobacterium maltaromaticum* 能与宿主共同合成氨基酸, 为宿主提供必需氨基酸 (夏晓峰, 2014)。但是, 宏基因组学单纯依赖基因测序结果进行预测, 不能肯定共生菌的功能。特别是对于通过间接作用影响宿主功能的共生菌, 通过基因组很难筛选出共生菌作用于宿主的关键功能分子, 无法回答何种共生菌通过何种方式影响宿主等关键科学问题。只有与其它组学技术联用, 才能更精准地构建代谢功能网络 (侯璐文等, 2019)。

2.4.2 转录组和蛋白组分析 转录组学和蛋白组学适用于研究宿主带菌和不带菌组织的分子功能差异, 或共生菌去除前后宿主分子功能的变化。相对高成本的蛋白组学, 转录组学的应用更多, 如对比 B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* 转录组和共生菌宏转录组发现, 宿主必需氨基酸生物合成所需的基因来自共生菌, 并推测 *Delftia* sp. 参与了宿主氨基酸的合成 (Xie *et al.*, 2012)。但转录组学也有明显的缺陷: 细菌蛋白编码基因的转录产物的含量很低, 且很难富集。提取的 RNA 中主要是昆虫的 rRNA 和蛋白编码基因的转录产物。尽管能采取一定的技术降解 rRNA, 但是

当 rRNA 降解后, 序列池 (Sequence pool) 中细菌的蛋白编码基因的转录产物仍 <10% (通常 <1%), 并且由于细菌 mRNA 没有 Poly-A 尾致使无法对其进行富集 (Douglas, 2018)。

相对于转录组学, 蛋白组学能平行地对昆虫和共生菌的分子功能进行定量分析, 并可借助蛋白相互作用网络分析, 揭示共生菌-宿主间的分子功能交流。蛋白组分析发现, 蚜虫共生菌 *Buchnera* 蛋白组中有合成宿主必需氨基酸的全部的酶, 为 *Buchnera* 合成宿主必需氨基酸提供了证据 (Poliakov *et al.*, 2011); 病媒昆虫亚洲柑橘木虱 *Diaphorina citri* 携带的病原菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) 产生的磷酸泛酸半胱氨酸合成/脱羧酶 (辅酶 A 生物合成酶) 与宿主的血蓝蛋白 (与免疫相关) 发生相互作用, CLas 产生的泛酸激酶 (催化辅酶 A 生物合成的限速酶) 与宿主的肌球蛋白发生相互作用 (Ramsey *et al.*, 2017)。综合分析亚洲柑橘木虱肠道组织的转录组和蛋白组, 进一步发现感染 CLas 导致肠道组织的三羧酸循环、铁代谢、杀虫剂抗性和昆虫免疫的代谢通路发生变化, 尤其是三羧酸循环代谢流量调控酶的表达量下调 (Kruse *et al.*, 2017)。

2.4.3 代谢组分析 代谢组学通过检测和分析小分子代谢产物研究机体的动态代谢情况 (Patti *et al.*, 2012)。在共生菌对昆虫功能的研究中, 宿主主要通过代谢物的交流与共生菌建立联系。许多基因组学、转录组学和蛋白组学等研究方法无法察觉的变化, 可以通过分析代谢组学体现出来 (Johnson *et al.*, 2016)。与转录组学和蛋白组学相比, 代谢组学的分析结果更接近昆虫和共生菌的代谢功能, 如通过代谢组分析发现, 热处理时豌豆蚜的兼性共生菌 *Serratia symbiotica* 改变了共生体的糖、多元醇、核酸、氨基酸和三羧酸循环代谢物的含量, 增加了宿主的耐热性 (Burke *et al.*, 2010)。

然而, 共生菌-宿主间分子功能的联系是动态的, 代谢组学最大的缺陷在于其只能检测稳态的代谢物, 无法揭示代谢物在共生菌-宿主间的动态传递。比如, 某个代谢物从共生菌转移至宿

主后, 宿主及时分解导致该代谢物的滴度降低, 导致无法根据该代谢物的滴度判断其重要性。可以通过去除特异性共生菌的实验设计来弥补代谢物分析的缺陷, 如通过比较专性共生菌 *Wigglesworthia* 去除前后舌蝇共生菌的宏转录组以及昆虫血淋巴和细菌的代谢组数据发现, *Wigglesworthia* 可提供宿主需要的 B 族维生素, 缺失该共生菌会破坏宿主的碳水化合物和氨基酸代谢等多种代谢途径 (Bing *et al.*, 2017)。

在昆虫共生菌的研究中, 目前仍然很难从生物功能的角度分析共生菌的基因组与宿主表现型的联系。为取得突破性的进展, 就需要加强两方面的工作: 首先, 将昆虫蛋白质组学和代谢组学的数据, 或者将基因组学和转录组学的数据进行整合, 从中找到能将昆虫基因型和表现型关联起来的分子信息; 其次, 充分利用对共生菌、代谢物和/或基因间相关关系的已有认识, 结合生物信息学方法从数据库中进行信息挖掘, 对多组学数据进行整合分析 (侯璐文等, 2019)。

3 结语与展望

随着科学技术的不断进步, 过去只拘泥于以“核心菌群” (Core microbiota) 对肠道菌群开展研究的思维方式已经不能满足如今的科研需求。丰度低的共生菌也可能会有重要的功能, 如共生菌 *Carnobacterium maltaromaticum* 在小菜蛾幼虫中的丰度只有 5%, 但是由该菌富集的代谢相关功能却高达 10% (夏晓峰, 2014)。此外, 共生菌种类之间存在复杂的相互作用, 一些共生菌种类丰度的变化往往会引起相关共生菌的竞争性或补偿性生长 (Indiragandhi *et al.*, 2007; Vilela *et al.*, 2015)。“菌群的动态组合”为概念的研究方式 (Koenig *et al.*, 2011) 以及共生菌种内多样性分析 (Ellegaard and Engel, 2016) 的推行, 使得共生菌对宿主功能的研究更加趋于多元化和系统化。

在研究技术方面, 多组学和单细胞培养技术将在共生菌对宿主功能的研究中扮演重要的角色。多组学的分析技术和方法有助于更精确地预测共生菌对宿主的功能, 如何验证组学分析结果

是研究人员当前面临最大的挑战。尽管基因编辑或 RNAi 有助于明确共生菌-宿主互作过程中参与调控表现型的关键基因和代谢路径 (Douglas, 2018), 共生菌对宿主功能的验证仍依赖于带菌和无菌昆虫表现型的比较。对于肠道共生菌组成复杂的昆虫, 难以体外培养的共生菌的分离和培养成为验证共生菌对宿主功能研究的关键技术。近年来发展的液滴微流控技术 (Droplet microfluidics), 可以将单细胞和培养基隔离在液体培养小囊中, 实现了单菌细胞的培养, 且培养小囊生成的速率很快, 每秒可产生上万个, 实现了痕量微生物的高效培养 (Joensson and Svahn, 2012), 有助于解决共生菌对宿主功能的验证问题。

参考文献 (References)

- Anand AAP, Vennison SJ, Sankar SG, Prabhu DIG, Vasani PT, Raghuraman T, Geoffrey CJ, Vandan SE, 2010. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science*, 10: e107.
- Barnard K, Jeanrenaud ACSN, Brooke BD, Oliver SV, 2019. The contribution of gut bacteria to insecticide resistance and the life histories of the major malaria vector *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Scientific Reports*, 9: e9117.
- Berasategui A, Salem H, Paetz C, Santoro M, Gershenson J, Kaltenpoth M, Schmidt A, 2017. Gut microbiota of the pine weevil degrades conifer diterpenes and increases insect fitness. *Molecular Ecology*, 26(15): 4099–4110.
- Bing XL, Attardo GM, Vigneron A, Aksoy E, Scolari F, Malacrida A, Weiss BL, Aksoy S, 2017. Unravelling the relationship between the tsetse fly and its obligate symbiont *Wigglesworthia*: Transcriptomic and metabolomic landscapes reveal highly integrated physiological networks. *Proceedings of the Royal Society B*, 284(1857): e20170360.
- Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J, 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1): 293–300.
- Burke G, Fiehn O, Moran N, 2010. Effects of facultative symbionts and heat stress on the metabolome of pea aphids. *The ISME Journal*, 4(2): 242–252.
- Cai YF, Jia ZJ, 2013. Progress in environmental transcriptomics based on next-generation high-throughput sequencing. *Biodiversity Science*, 21(4): 401–410. [蔡元锋, 贾仲君, 2013. 基于新一代高通量测序的环境微生物转录组学研究进展. 生物多样性, 21(4): 401–410.]
- Chen BS, Lu XM, Shao YQ, 2017. Diversity of the gut microbiota in lepidopteran insects and their interaction with hosts. *Acta Entomologica Sinica*, 60(6): 710–722. [陈勃生, 鲁兴萌, 邵勇奇, 2017. 鳞翅目昆虫肠道微生物的多样性及其与宿主的相互作用. 昆虫学报, 60(6): 710–722.]
- Chen JH, Wang ZK, He M, Yin YP, 2008. Analysis of intestinal microecology of *Apriona germara* (Hope) larvae by DGGE and RFLP techniques. *Biotechnology Bulletin*, 24(6): 115–119. [陈金华, 王中康, 贺闽, 殷幼平, 2008. DGGE 和 RFLP 方法分析桑粒肩天牛幼虫肠道微生物多样性. 生物技术通报, 24(6): 115–119.]
- Chouaia B, Rossi P, Epis S, Mosca M, Ricci I, Damiani C, Ulissi U, Crotti E, Daffonchio D, Bandi C, Favia G, 2012. Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of *Asaia* bacterial symbionts. *BMC Microbiology*, 12(Suppl. 1): S2.
- Coon KL, Vogel KJ, Brown MR, Strand MR, 2014. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Molecular Ecology*, 23(11): 2727–2739.
- Cowen LE, Singh SD, Kohler JR, Collins C, Zaas AK, Schell WA, Aziz H, Mylonakis E, Perfect JR, Whitesell L, Lindquist S, 2009. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8): 2818–2823.
- de Almeida LG, de Moraes LAB, Trigo JR, Omoto C, Consoli FL, 2017. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PLoS ONE*, 12(3): e0174754.
- Dillon R, Charnley K, 2002. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Research in Microbiology*, 153(8): 503–509.
- Dimou I, Rempoulakis P, Economopoulos AP, 2010. Olive fruit fly [*Bactrocera (Dacus) oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae)] adult rearing diet without antibiotic. *Journal of Applied Entomology*, 134(1): 72–79.
- Doane CC, Redys JJ, 1970. Characteristics of motile strains of *Streptococcus faecalis* pathogenic to larvae of the gypsy moth. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15(3): 420–430.
- Dong YM, Manfredini F, Dimopoulos G, 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathogens*, 5(5): e1000423.
- Douglas AE, 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 64(4): 409–434.

- Douglas AE, 2018. Omics and the metabolic function of insect-microbial symbioses. *Current Opinion in Insect Science*, 29: 1–6.
- Ellegaard KM, Engel P, 2016. Beyond 16S rRNA community profiling: Intra-species diversity in the gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 7: e1475.
- Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5): 699–735.
- Engl T, Michalkova V, Weiss BL, Uzel GD, Takac T, Miller WJ, Abd-Alla AMM, Aksoy S, Kaltenpoth M, 2018. Effect of antibiotic treatment and gamma-irradiation on cuticular hydrocarbon profiles and mate choice in tsetse flies (*Glossina morsitans*). *BMC Microbiology*, 18(Suppl. 1): 145.
- Fang W, Fang ZM, Liu ZM, Yuan J, Zhang XC, Peng H, Hong YZ, XiaoYZ, 2013. Phylogenetic analysis of bacterial community in the gut of American cockroach (*Periplaneta americana*). *Acta Microbiologica Sinica*, 53(9): 984–994.
- Fredensborg BL, Kalvalio IFI, Johannesen TB, Stensvold CR, Nielsen HV, Kapel CMO, 2020. Parasites modulate the gut-microbiome in insects: A proof-of-concept study. *PLoS ONE*, 15(1): e0227561.
- Fu Q, Zhang ZT, Hu C, Lai FX, 2001. The effects of high temperature on both yeast-like symbionts and amino acid requirements of *Nilaparvata lugens*. *Acta Entomologica Sinica*, 44(4): 534–540. [傅强, 张志涛, 胡萃, 赖凤香, 2001. 高温处理后褐飞虱体内共生酵母菌和氨基酸需求的变化. 昆虫学报, 44(4): 534–540.]
- Hendricks CW, Doyle JD, Hugley B, 1995. A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5): 2016–2019.
- Hernandez-Martinez P, Naseri B, Navarro-Cerrillo G, Escrache B, Ferre J, Herrero S, 2010. Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Microbiology*, 12(10): 2730–2737.
- Hosokawa T, Kikuchi Y, Shimada M, Fukatsu T, 2007. Obligate symbiont involved in pest status of host insect. *Proceedings of the Royal Society B*, 274(1621): 1979–1984.
- Hou LW, Wu CX, Qin XM, Li JG, 2019. Advances in research on association analysis methods between gut functional metagenomics and metabolomics. *Acta Microbiologica Sinica*, 59(9): 1813–1822. [侯璐文, 吴长新, 秦雪梅, 李建国, 2019. 肠道微生物功能宏基因组学与代谢组学关联分析方法研究进展. 微生物学报, 59(9): 1813–1822.]
- Hu Q, Qi HY, Zhang HX, 2004. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and its applications in microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 24(5): 1048–1054. [呼庆, 齐鸿雁, 张洪勋, 2004. 荧光原位杂交技术及其在微生物生态学中的应用. 生态学报, 24(5): 1048–1054.]
- Huang JW, Feng DY, Lin YC, 2006. Application of PCR-DGGE technique in animal intestinal micro-ecological research. *Chinese Journal of Animal Science*, 42(17): 47–50. [黄俊文, 冯定远, 林映才, 2006. PCR-DGGE 技术及其在动物肠道微生物生态学中的应用. 中国畜牧杂志, 42(17): 47–50.]
- Huang WQ, Zhang HP, 2014. Research advancement of molecular biological technology in the study of intestinal flora. *Microbiology China*, 41(6): 1195–1202. [黄卫强, 张和平, 2014. 分子生物学技术在肠道菌群研究中的进展. 微生物学通报, 41(6): 1195–1202.]
- Huang YH, 2012. Study on beta-cypermethrin resistance-related proteins and intestinal flora in *Blattella germanica*. Doctoral dissertation. Jinan: Shandong Normal University. [黄艳红, 2012. 德国小蠊抗高效氯氰菊酯相关蛋白及肠道菌群的研究. 博士学位论文. 济南: 山东师范大学.]
- Huang ZR, Wang SY, 1981. Some inducible antibacterial substances developed from the hemolymph of oak silkworm, *Antheraea pernyi*, pupae by injecting with *Escherichia coli*. *Journal of South China Agricultural College*, 2(1): 68–71. [黄自然, 王少颀, 1981. 注射大肠杆菌诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质. 华南农业大学学报, 2(1): 68–71.]
- Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kim GH, Saravanan VS, Sa T, 2007. Cultivable bacteria associated with larval gut of prothiofos-resistant, prothiofos-susceptible and field-caught populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* and their potential for, antagonism towards entomopathogenic fungi and host insect nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6): 2664–2675.
- Jia FX, 2009. Influence of continuous high temperature impact on *Wolbachia* infection frequency and fitness of *Liposcelis tricolor* (Psocoptera: Liposcelididae). Master thesis. Chongqing: Southwest University. [夹福先, 2009. 高温连续胁迫对三色书虱体内 *Wolbachia* 的共生率及其种群适合度的影响. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Joensson HN, Svahn HA, 2012. Droplet microfluidics—a tool for single-cell analysis. *Angewandte Chemie*, 51(49): 12176–12192.
- Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G, 2016. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(7): 451–459.
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE, 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(Suppl. 1): 4578–4585.
- Kruse A, Fattah-Hosseini S, Saha S, Johnson R, Warwick ER, Sturgeon K, Mueller L, MacCoss MJ, Shatters RG Jr., Heck MC, 2017. Combining 'omics and microscopy to visualize interactions between the Asian citrus psyllid vector and the Huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the insect gut. *PLoS ONE*, 12(6): e0179531.
- Kwong WK, Engel P, Koch H, Moran NA, 2014. Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31): 11509–11514.
- Lan BM, 2016. Diversity and function of gut bacterial symbionts of *Spodoptera litura*. Master thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [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.]
- Li GN, Xia XJ, Zhao S, Shi M, Liu FD, Zhu Y, 2020. The physiological and toxicological effects of antibiotics on an interspecies insect model. *Chemosphere*, 248: e126019.
- Li N, Chen JM, Zhang JF, He YP, Chen LZ, 2010. Comparison for activities of detoxifying enzymes in resistant- and susceptible-imidacloprid endosymbiotic strains of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 22(5): 653–659. [李娜, 陈建明, 张钰锋, 何月平, 陈列忠, 2010. 褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和敏感菌株解毒酶活性的比较. 浙江农业学报, 22(5): 653–659.]
- Li WH, Jin DC, Jin JX, Cheng Y, Li FL, 2015. Isolation, identification and antibiotic susceptibility testing of gut bacteria from larval feces of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(5): 546–552. [李文红, 金道超, 金剑雪, 程英, 李凤良, 2015. 基于幼虫粪便的小菜蛾肠道细菌分离鉴定及其抗生素敏感性分析. 昆虫学报, 58(5): 546–552.]
- Lin XL, Kang ZW, Pan QJ, Liu TX, 2015. Evaluation of five antibiotics on larval gut bacterial diversity of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Insect Science*, 22(5): 619–628.
- Liu H, 2013. Study on the symbiotic bacteria population change and insecticide resistance of *Blattella germanica*. Master thesis. Jinan: Shandong Normal University. [刘浩, 2013. 德国小蠊共生菌群变化与抗药性的关系. 硕士学位论文. 济南: 山东师范大学.]
- Liu WQ, Mao ZC, Yang YH, Xie BY, 2008. Analysis of soil bacterial diversity by using the 16S rRNA gene library. *Acta Microbiologica Sinica*, 48(10): 1344–1350. [刘玮琦, 郭振川, 杨宇红, 谢丙炎, 2008. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性. 微生物学报, 48(10): 1344–1350.]
- Liu XG, Yang YJ, Liao QJ, Xu HX, Liu YH, Lü ZX, 2016. Analysis of the bacterial community structure and diversity in the intestine of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 59(9): 965–976. [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.]
- Luo Y, 2010. Application of T-RFLP in the diversity analysis of bacterial community in orthopaedic infection. Doctoral dissertation. Beijing: Peking Union Medical College Hospital. [骆毅, 2010. 应用末端限制性片段长度多态性技术对骨科感染中细菌群落的解析. 博士学位论文. 北京: 北京协和医院.]
- Mao MF, Yue SQ, Zhao MR, 2019. Advances in pesticide poisoning mechanism based on multi-omics. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 21(5/6): 823–830. [毛曼菲, 岳思青, 赵美蓉, 2019. 基于多组学技术的农药致毒机制研究进展. 农药学报, 21(5/6): 823–830.]
- Martemyanov VV, Belousova IA, Pavlushin SV, Dubovskiy IM, Ershov NI, Alikina TY, Kabilov MR, Glupov VV, 2016. Phenological asynchrony between host plant and gypsy moth reduces insect gut microbiota and susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *Ecology and Evolution*, 6(20): 7298–7310.
- Mason CJ, Couture JJ, Raffa KF, 2014. Plant-associated bacteria degrade defense chemicals and reduce their adverse effects on an insect defoliator. *Oecologia*, 175(3): 901–910.
- Mei C, Fan S, Yang H, 2018. The strategies of isolation of insect gut microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica*, 58(6): 985–994. [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.]
- Moran NA, Yun YL, 2015. Experimental replacement of an obligate insect symbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(7): 2093–2096.
- Mu DD, Wang ZK, Yin YP, 2010. Changes of intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae after feeding with *Camobacterium* sp. Hg4-03 as a probiotic strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 50(2): 251–255. [穆冬冬, 王中康, 殷幼平, 2010. 饲喂肉杆菌 Hg4-03 对贡嘎蝠蛾幼虫肠菌生物多样性的影响. 微生物学报, 50(2): 251–255.]
- Oberhardt MA, Zarecki R, Gronow S, Lang E, Klenk HP, Gophna U, Ruppin E, 2015. Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism-media pairings. *Nature Communications*, 6: e8493.
- Pais R, Lohs C, Wu YN, Wang JW, Aksoy S, 2008. The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19): 5965–5974.
- Pang R, Chen M, Yue L, Xing K, Li TC, Kang K, Liang ZK, Yuan

- LY, Zhang WQ, 2018. A distinct strain of *Arsenophonus* symbiont decreases insecticide resistance in its insect host. *PLoS Genetics*, 14(10): e1007725.
- Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G, 2012. Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 263–269.
- Poliakov A, Russell CW, Ponnala L, Hoops HJ, Sun Q, Douglas AE, van Wijk KJ, 2011. Large-scale label-free quantitative proteomics of the pea aphid-*Buchnera* symbiosis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(6): M110.007039.
- Ramsey JS, Chavez JD, Johnson R, Hosseinzadeh S, Mahoney JE, Mohr JP, Robison F, Zhong X, Hall DG, MacCoss M, Bruce J, Cilia M, 2017. Protein interaction networks at the host-microbe interface in *Diaphorina citri*, the insect vector of the citrus greening pathogen. *Royal Society Open Science*, 4(2): e160545.
- Ramya SL, Venkatesan T, Murthy KS, Jalali SK, Verghese A, 2016. Detection of carboxylesterase and esterase activity in culturable gut bacterial flora isolated from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), from India and its possible role in indoxacarb degradation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2): 327–336.
- Rodgers FH, Gendrin M, Wyer CAS, Christophides GK, 2017. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathogens*, 13(5): e1006391.
- Shi W, Syrenne R, Sun JZ, Yuan JS, 2010. Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the ‘omics’ age. *Insect Science*, 17(3): 199–219.
- Shi WB, Xie SX, Chen XY, Sun S, Zhou X, Liu LT, Gao P, Kyrpides NC, No EG, Yuan JS, 2013. Comparative genomic analysis of the endosymbionts of herbivorous insects reveals eco-environmental adaptations: Biotechnology applications. *PLoS Genetics*, 9(1): e1003131.
- Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM, Breznak JA, 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8): 4748–4755.
- Sun BT, Lan BM, Wang Q, Xia XF, You MS, 2017. Isolation and preliminary analysis of the larval gut bacteria from *Spodoptera litura*. *Biotic Resources*, 39(4): 264–271. [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. *生物资源*, 39(4): 264–271.]
- Tago K, Kikuchi Y, Nakaoka S, Katsuyama C, Hayatsu M, 2015. Insecticide applications to soil contribute to the development of *Burkholderia* mediating insecticide resistance in stinkbugs. *Molecular Ecology*, 24(14): 3766–3778.
- Takatsuka J, Kunimi Y, 2000. Intestinal bacteria affect growth of *Bacillus thuringiensis* in larvae of the oriental tea tortrix, *Homona magnanima* Diakonoff (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 76(3): 222–226.
- Tang XS, Freitag D, Vogel H, Ping LY, Shao YQ, Cordero EA, Andersen G, Westermann M, Heckel DG, Boland W, 2012. Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous lepidopteran larvae. *PLoS ONE*, 7(7): e36978.
- Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T, 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 303(5666): e1989.
- Vilanova C, Baixeras J, Latorre A, Porcar M, 2016. The generalist inside the specialist: Gut bacterial communities of two insect species feeding on toxic plants are dominated by *Enterococcus* sp. *Frontiers in Microbiology*, 7: e1005.
- Vilela SFG, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MCA, Anbinder AL, Jorge AOC, Junqueira JC, 2015. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence*, 6(1): 29–39.
- Visweshwar R, Sharma HC, Akbar SMD, Sreeramulu K, 2015. Elimination of gut microbes with antibiotics confers resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin proteins in *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(8): 1621–1637.
- Wang TZ, Wang ZL, Zhu HF, Wang ZY, Yu XP, 2019. Analysis of the gut microbial diversity of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) by high-throughput sequencing. *Acta Entomologica Sinica*, 62(3): 323–333. [王天召, 王正亮, 朱杭锋, 王紫晔, 俞晓平, 2019. 基于高通量测序的褐飞虱肠道微生物多样性分析. *昆虫学报*, 62(3): 323–333.]
- Wang XC, Yang ZR, Wang M, Li W, Li SC, 2012. High-throughput sequencing technology and its application. *China Biotechnology*, 32(1): 109–114. [王兴春, 杨致荣, 王敏, 李玮, 李生才, 2012. 高通量测序技术及其应用. *中国生物工程杂志*, 32(1): 109–114.]
- Wang ZW, Ma XH, Chen X, Zhao XM, Chen T, 2010. Current methods and advances in microbial metabolomics. *Progress in Chemistry*, 22(1): 163–172. [王智文, 马向辉, 陈洵, 赵学明, 陈涛, 2010. 微生物代谢组学的研究方法进展. *化学进展*, 22(1): 163–172.]
- Xia XF, 2014. Organizational diversity and functional characterization of microbiota in the midgut of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). Doctoral dissertation. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [夏晓峰, 2014. 小菜蛾中肠微生物多样性及其功能研究. 博士学位论文. 福州: 福建农林大学.]
- Xia Y, Khan S, He JZ, Zhu YG, 2007. Use of amplified ribosomal

- DNA restriction analysis to study microbial diversity in soils impacted by heavy metals. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 27(6): 953–960. [夏月, Khan S, 贺纪正, 朱永官, 2007. 限制性片段长度多态性分析方法对重金属污染土壤中细菌群落多样性的研究. *环境科学学报*, 27(6): 953–960.]
- Xiang H, Li MW, Zhao Y, Zhao LP, Zhang YH, Huang YP, 2007. Bacterial community in midguts of the silkworm larvae estimated by PCR-DGGE and 16S rDNA gene library analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 50(3): 222–233. [相辉, 李木旺, 赵勇, 赵立平, 张月华, 黄勇平, 2007. 家蚕幼虫中肠细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rDNA 文库序列分析. *昆虫学报*, 50(3): 222–233.]
- Xie W, Meng QS, Wu QJ, Wang SL, Yang X, Yang NN, Li RM, Jiao XG, Pan HP, Liu BM, Su Q, Xu BY, Hu SN, Zhou XG, Zhang YJ, 2012. Pyrosequencing the *Bemisia tabaci* transcriptome reveals a highly diverse bacterial community and a robust system for insecticide resistance. *PLoS ONE*, 7(4): e35181.
- Xu XL, Lin J, Yan RX, 2018. Comparison of principle and application of the gene chip and high-throughput sequencing technologies. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 34(11): 1166–1174. [徐晓丽, 林娟, 鄢仁祥, 2018. 基因芯片与高通量测序技术的原理与应用的比较. *中国生物化学与分子生物学报*, 34(11): 1166–1174.]
- Yang J, Yang Y, Wu WM, Zhao J, Jiang L, 2014. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environmental Science & Technology*, 48(23): 13776–13784.
- Yang YQ, Zhang Y, Chen YR, Zhang C, Zhao TY, Long YH, 2018. Function and research methods of insect intestinal bacteria. *Journal of Anhui Agricultural University*, 45(3): 512–518. [杨云秋, 张勇, 陈亦然, 张灿, 赵天宇, 龙雁华, 2018. 昆虫肠道细菌的功能和研究方法. *安徽农业大学学报*, 45(3): 512–518.]
- Ye L, Yan YL, Chen QS, Zhao LS, Ling N, Pang GC, 2016. Application of high-throughput sequencing technology in studying matagenomics of intestinal microbiota. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 16(7): 216–223. [叶雷, 闫亚丽, 陈庆森, 赵林森, 龄南, 庞广昌, 2016. 高通量测序技术在肠道微生物宏基因组学研究中的应用. *中国食品学报*, 16(7): 216–223.]
- Zhang JF, Chen JM, Chen FJ, Zheng XS, Chen LZ, Yu XP, 2009. The isolation of yeast-like-symbiots in the brown planthopper and the sequences analysis of its 26S rDNA. *Scientia Agricultura Sinica*, 42(6): 2211–2216. [张珏锋, 陈建明, 陈法军, 郑许松, 陈列忠, 俞晓平, 2009. 褐飞虱内共生菌的分离及其 26S rDNA 部分序列分析. *中国农业科学*, 42(6): 2211–2216.]
- Zhang K, Liu WX, Zheng XH, Liu BX, 2017. Matagenome analysis of bacterial diversity in cricket intestines. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 54(3): 417–425. [张科, 刘伍限, 郑新华, 刘冰许, 2017. 蟋蟀肠道细菌多样性的宏基因组分析. *应用昆虫学报*, 54(3): 417–425.]
- Zhang W, He ZB, Deng XP, Yin YP, 2004. Variety and distribution of intestinal flora of *Apriona germari* (Hope) larvae. *Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science)*, 26(2): 169–172. [张伟, 何正波, 邓新平, 殷幼平, 2004. 桑粒肩天牛幼虫肠道菌群的种类及分布. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 26(2): 169–172.]
- Zhang YH, Li JH, Wan H, 2019. Research progress on the relationship between host detoxification metabolism and insect microbial symbionts. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 21(5/6): 729–735. [张云骅, 李建洪, 万虎, 2019. 昆虫共生菌与宿主的解毒代谢关系研究进展. *农药学学报*, 21(5/6): 729–735.]
- Zhao XG, Tan ZL, Tang SX, Sun ZH, 2007. Application of fingerprint profile techniques in research of microbial diversity in animal intestines. *Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science*, 26(4): 350–355. [赵小刚, 谭支良, 汤少勋, 孙志洪, 2007. 指纹图谱技术在动物肠道微生物多样性研究中的应用. *广西农业生物科学*, 26(4): 350–355.]
- Zhou WH, 2017. Effect of *Wolbachia* infection and its density on the resistance to insecticide in *Chilo suppressalis*. Master thesis. Wuhan: Hubei University. [周文慧, 2017. *Wolbachia* 感染及其密度对二化螟抗药性的影响. 硕士学位论文. 武汉: 湖北大学.]