

红棕象甲幼虫取食分泌物的抑菌活性分析*

张 鹤^{1,2**} 林锐洵² 唐凡希² 侯有明^{2***}

(1. 忻州师范学院生物系, 忻州 034000; 2. 福建农林大学植物保护学院, 农林生物安全全国重点实验室, 福建省昆虫生态重点实验室, 福州 350002)

摘 要 【目的】红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus* 是世界范围内棕榈种植区最具毁灭性的入侵害虫之一。在红棕象甲饲养过程中, 发现幼虫取食的甘蔗上较少发生微生物滋长, 推测幼虫取食的分泌物具有抑制微生物生长的作用。本文测定了取食分泌物对几种细菌和真菌的抑制活性。【方法】利用无菌水萃取幼虫取食过的甘蔗作为处理组, 并以无菌水萃取幼虫未取食过的甘蔗作为对照进行抑菌试验, 测试了幼虫取食分泌物对 4 种细菌的生长抑制活性和 2 种真菌孢子萌发抑制活性, 同时测定了蛋白酶 K 以及热处理后对幼虫取食分泌物抑菌活性的影响。此外, 还测定了幼虫体表分泌物和排泄物的抑菌活性明确抑菌分泌物的来源。【结果】幼虫取食过的甘蔗萃取液相比对照对大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 的生长都有极强的抑制作用 ($P<0.000\ 1$), 且能够抑制 95% 以上的球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 的孢子萌发 ($P<0.000\ 1$), 但对粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 的抑制作用不显著 ($P>0.05$)。对萃取液分别进行蛋白酶 K 和高温处理 (100 °C) 后, 取食分泌物的抑菌活性仍然没有减弱, 说明分泌物中的抗菌物质不是蛋白质或者多肽, 具有较强的热稳定性。幼虫体表分泌物和排泄物不仅对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长没有抑制作用, 反而促进了这 2 种细菌的生长, 说明抗菌物质可能是幼虫取食过程中分泌至食物中的。【结论】红棕象甲幼虫在取食过程中分泌抗菌物质到食物中, 可以有效抑制微生物的生长, 且抗菌活性表现出较强的稳定性, 从而保证食物和生存环境的安全。本研究丰富了昆虫应对环境病原微生物的外部防御策略, 也为开发昆虫源的抗微生物药物奠定了基础。

关键词 红棕象甲; 抗菌分泌物; 外部防御

Antimicrobial activity of feeding secretions of red palm weevil larvae

ZHANG He^{1,2**} LIN Rui-Xun² TANG Fan-Xi² HOU You-Ming^{2***}

(1. Department of Biology, Xinzhou Normal University, Xinzhou 034000, China; 2. State Key Laboratory of Agricultural and Forestry Biosecurity, Key Laboratory of Insect Ecology in Fujian, College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract 【Aim】To clarify the antimicrobial properties of the feeding secretions of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, larvae, and assess the effect of these secretions on various bacteria and fungi. 【Methods】The effects of aqueous extracts of sugarcane that had been consumed by *R. ferrugineus* larvae on four bacteria, and two fungi, species, and on the germination of fungal spores, were compared to those of freshly squeezed sugarcane juice. In addition, the effects of proteinase K and heat treatment on the antimicrobial activity of larval feeding secretions were determined. Finally, the antimicrobial activity of larval body surface secretions and excretions was tested to clarify the source of antimicrobial activity. 【Results】Compared to the control, sugarcane extract that had been consumed by larvae strongly inhibited the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus thuringiensis* ($P<0.000\ 1$), and suppressed the germination of > 95% of *Beauveria bassiana* and *Metarsiana anisopliae* spores ($P<0.000\ 1$). However, it had no significant inhibitory effect on *Serratia*

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31872033); 国家重点研发计划 (2022YFC2601400); 忻州师范学院科研基金资助项目 (2021KY10)

**第一作者 First author, E-mail: zhhe1205@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: ymhou@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-02-20; 接受日期 Accepted: 2024-04-17

marcescens ($P>0.05$). Treatment with proteinase K and high temperature (100 °C) did not affect the antimicrobial activity of larval feeding secretions, indicating that the active antimicrobial substances are not proteins or peptides. Larval body surface secretions and excretions not only did not inhibit the growth of *E. coli* and *S. aureus*, but promoted the growth of these two bacteria, indicating that the active antibacterial substances are probably secreted into the food during feeding. **[Conclusion]** *R. ferrugineus* larvae secrete antimicrobial substances into food during ingestion that can effectively inhibit the growth of microorganisms. The antimicrobial compounds responsible have strong thermal stability. These results improve understanding of the strategies insects use to defend themselves against environmental pathogens, and lay a foundation for the development of insect-derived antimicrobial drugs.

Key words *Rhynchophorus ferrugineus*; antimicrobial secretion; external defense

昆虫抗菌分泌物是由昆虫分泌腺分泌或共生菌分泌的具有抗菌活性的物质,其构筑昆虫免疫防御的第一道防线。通过分泌抗菌物质,昆虫能够在早期阻止潜在的病原威胁,降低病原菌的寄生压力。同时,抗菌分泌物还具有保存食物、巢穴清洁、保护后代以及维持个体卫生与群体卫生的功能 (Otti *et al.*, 2014)。不同昆虫抗菌分泌物的产生和发挥作用方式存在显著差别,且在昆虫生存中具有不同的意义。例如,社会性昆虫蚂蚁和蜜蜂可以通过毒腺和杜氏腺分泌毒液来发挥体外防御的作用,毒液散布到昆虫的表皮和巢穴中,组成所谓的“社会免疫”,对微生物有极强的抑制作用 (Baracchi *et al.*, 2012; Tragust *et al.*, 2013; Isidorov *et al.*, 2023); 白蚁通过唾液腺将革兰氏阴性菌结合蛋白 (Gram-negative bacteria binding proteins, GNBPs) 整合入巢穴的建筑材料中,该蛋白能帮助蚁群感知病原感染并快速产生免疫响应,当该蛋白表达被抑制后,病原存在下会加速蚁群的感染和死亡 (Bulmer *et al.*, 2009)。腐食性昆虫红斑尼葬甲 *Nicrophorus vespilloides* 幼虫和成虫通过频繁地将含有溶菌酶和抗菌肽的口器和消化道分泌物涂在动物尸体上防止食物腐败,从而提高生存适合度 (Arce *et al.*, 2012, 2013)。寄生性昆虫扁头泥蜂 *Ampulex compressa* 幼虫在寄主体内孵化后,不断向寄主体内释放口器分泌物,分泌物中富含 (R)-(-)-mellein 和 micromolide,对潜在病原革质沙雷细菌 *Serratia marcescens* 和 *Staphylococcus hyicus* 具有极强的抑制作用,能够有效保障寄主食物安全及幼虫顺利发育 (Herzner *et al.*, 2013)。仓储害虫赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 胸腺和腹腺各具有一对特化

的腺体,可以分泌苯醌类物质到面粉中抑制病原微生物生长,有效保持食物健康和自身安全 (Li *et al.*, 2013; Sawada *et al.*, 2020)。此外,温带臭虫 *Cimex lectularius* 释放出的防御分泌物含有 (E)-2-己烯醛和 (E)-2-辛烯醛等,能显著抑制金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 的生长 (Ulrich *et al.*, 2015); 具角黑艳甲 *Odontotaenius disjunctus* 可以通过共生放线菌合成并分泌抗菌物质至它们的蛀屑中,以达到保护食物的目的 (Pessotti *et al.*, 2021)。因此,昆虫应用抗菌分泌物组成一个有效的防御系统来应对环境中潜在的病原威胁,而对昆虫分泌物的抗菌效应研究有助于理解昆虫的防御策略。

红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus* 是一种毁灭性入侵害虫,已蔓延到我国南方各棕榈种植区,对棕榈产业和景观造成严重破坏 (Peng and Hou, 2017; Wang *et al.*, 2017)。该害虫以幼虫钻蛀取食幼嫩茎秆组织为害 (Peng *et al.*, 2016),取食残渣为病原微生物的滋长提供了有利条件,对幼虫的生存环境和生长发育可能构成严重威胁 (刘丽等, 2011)。在野外也发现加那利海枣 *Phoenix canariensis* 上存在的许多天然病原菌,金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*、球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*、粘质沙雷细菌 *Serratia marcescens* 等对红棕象甲生长发育造成威胁 (丁秘等, 2015; Pu and Hou, 2016)。然而,红棕象甲是否存在应对环境病原微生物的防御策略还不清楚。在实验室红棕象甲的饲养过程中发现,幼虫未取食过的甘蔗极易感染霉菌 (图 1: A),而取食过的甘蔗不易长霉腐败 (图 1: B)。红棕象甲幼虫可能在取食过程中,分泌了抗菌物质到

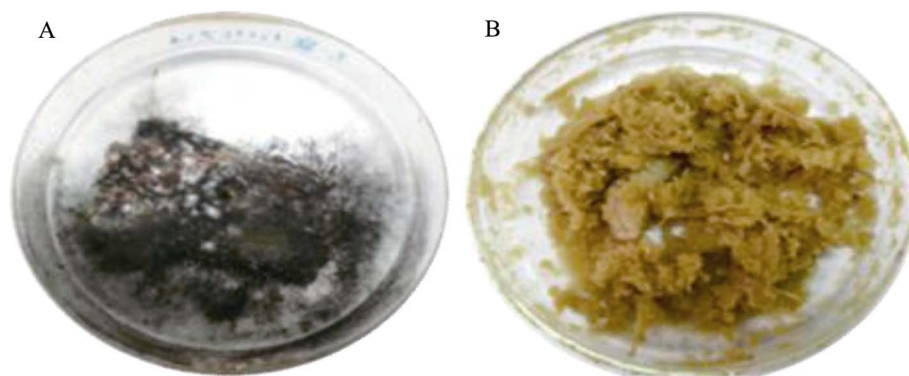


图 1 红棕象甲幼虫取食的甘蔗长霉情况

Fig. 1 Fungus growth in sugarcane fed by *Rhynchophorus ferrugineus* larvae

将两片甘蔗分别放入 2 个培养皿中, 一个培养皿不做处理, 另一个培养皿接入 1 头 5 龄幼虫取食, 放置在人工培养箱中培养, 温度 (27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 75%, 光周期为全黑暗。一周后, 没有幼虫取食的甘蔗 (A) 长出了霉菌, 而有幼虫取食的甘蔗 (B) 没有长霉。

Two pieces of sugarcane were respectively placed in two Petri dishes. One Petri dish was left untreated, while the other was inoculated with one 5th-instar larva for feeding. Both were then placed in an artificial incubator for cultivation at (27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 75% RH, and a complete dark photoperiod. After one week, mold grew on the sugarcane (A) that was not fed on by the larva, while the sugarcane (B) that was fed on by the larva did not develop mold.

食物中, 以达到保存食物新鲜和提高自身存活率的目的。本研究探讨了红棕象甲幼虫取食分泌物的抗菌特性, 以期帮助理解该害虫的病原防御策略。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

红棕象甲种群来源于从福建农林大学校园以及南安市棕榈种植园区捕获的茧和成虫。种群在人工培养箱 (GZD-305B 型, 立思高仪器设备 (南京) 有限公司) 中饲养至今。雌、雄成虫喂食甘蔗, 在 (27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 75%, 光周期为 12L : 12D 的条件下 1 : 1 配对饲养。卵定期收集在湿润的滤纸上, 收集的卵在幼虫孵化后接种于甘蔗块上。幼虫单独饲养在培养皿中, 幼虫饲养条件同成虫, 光周期为全黑暗条件饲养, 在化蛹和羽化前喂食甘蔗, 并定期更换甘蔗。

1.2 供试菌种

供试菌种均为福建农林大学闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室储藏菌种, 本研究中所用到的细菌种类有大肠杆菌 *Escherichia coli*

(革兰氏阴性菌), 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (革兰氏阳性菌), 苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (革兰氏阳性菌), 粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* (革兰氏阴性菌); 真菌种类有球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*。其中苏云金芽孢杆菌、粘质沙雷氏菌为本实验室前期研究对红棕象甲具有一定杀虫活性的病原菌 (Pu and Hou, 2016; Pu et al., 2017), 球孢白僵菌和金龟子绿僵菌为实验室培养的昆虫病原真菌。为了方便抗菌活性测定, 本研究采用电击转化法将 pBR322 质粒 (北京索莱宝科技有限公司) 导入苏云金芽孢杆菌和粘质沙雷氏菌 2 种病原菌中, 使其获得四环素抗性。具体操作如下: 首先将过夜培养的苏云金芽孢杆菌和粘质沙雷氏菌进行离心, 收集菌体细胞后用冰浴灭菌 ddH₂O 清洗 3 次, 最后悬浮细胞于 100 μL 灭菌的 ddH₂O 中。随后加入 1 μL pBR322 质粒并混匀, 立即进行电击转化, 电击条件为电压 1.5 kV, 电阻 300 Ω , 电容 2.5 μF 。电击完成后, 将 500 μL 的 LB 培养液迅速加入电击杯, 充分混匀并转移到新的离心管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h, 吸取 50 μL 涂布于含有四环素的 LB 平板上, 培养 1-2 d 筛选阳性克隆。

1.3 实验方法

1.3.1 取食和未取食甘蔗萃取液的制备 将新鲜的甘蔗切片置于饲养盒中,与玻璃培养皿、磁珠、离心管以及 ddH₂O 一起高压蒸汽灭菌。在超净工作台中,选择实验室饲养的 1.8-2.2 g (约 8-9 龄) 红棕象甲幼虫,用蘸有 75% 酒精的棉花擦拭体表进行消毒处理,然后将其置于灭菌的玻璃培养皿中,添加灭菌甘蔗片,于 28 °C 的恒温箱放置 2 d。用 5 mL 离心管分别收集红棕象甲幼虫取食后的甘蔗残渣 (实验组) 和仍未取食的甘蔗片 (阴性对照),按每克甘蔗加入 1 mL 无菌水,加入磁珠置于组织研磨器 (SCIENTZ-48 型,宁波新芝生物科技股份有限公司) 中进行匀浆处理,然后于离心机中 8 000 r/min 离心 10 min,吸取离心管中的上清液,并用 0.22 μm 的针头式过滤器过滤至无菌的 1.5 mL 离心管中,将获得的液体分装保存于 -80 °C 冰箱用于后续抑菌实验。每个处理设置 4 个生物学重复,以无菌水作为空白对照进行后续实验。

1.3.2 幼虫取食分泌物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性测定 通过比浊法 (Shi *et al.*, 2014) 测定样品对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性,将在牛肉膏蛋白胨培养基中过夜培养的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌稀释至约 1×10^5 cfu/mL。在酶标板上,幼虫取食和未取食的甘蔗萃取液以及无菌水分别取 75 μL 与大肠杆菌或金黄色葡萄球菌培养液 1:1 混合,每个样品 4 个技术重复,置于 30 °C 培养箱培养,于 0 和 24 h 在分光光度计 (Synergy HTX, BioTek Instruments) 下测定 OD₆₀₀ 吸光值,取两个时间点的 OD₆₀₀ 吸光值差值为细菌的生长量。

1.3.3 幼虫取食分泌物对苏云金芽孢杆菌和粘质沙雷氏菌的抑菌活性测定 测定方法参照 Haine 等 (2008), 并做了一些修改。分别取 44 μL 幼虫取食、未取食的萃取液和无菌水,加入 1 μL 过夜培养的苏云金芽孢杆菌或粘质沙雷氏菌菌液于 30 °C、150 r/min 摇床中孵育 2 h。培养结束后苏云金芽孢杆菌处理液用无菌水稀释 100 倍,粘质沙雷氏菌处理液用无菌水稀释 200 倍。每个处理组取 50 μL 均匀涂布于含四环素抗性

(5 μg/mL) 和两性霉素 B 抗性 (5.6 mg/mL, 防止真菌污染) 的 Luria-Bertani 固体平板中,设置 3 个技术重复。在恒温培养箱中 30 °C 培养 48 h。统计每个平板的菌落数,取 3 个平板的平均值计算每个处理的 CFUs。每个处理至少设置 4 个生物学重复。

1.3.4 幼虫取食分泌物对球孢白僵菌和金龟子绿僵菌孢子萌发的抑制测定 测定方法参照 Wu 等 (2014)。用 PDA 固体培养基培养球孢白僵菌和金龟子绿僵菌获取大量真菌孢子。无菌条件下用刀片刮真菌孢子于 0.1% 的吐温 80 溶液中,用移液枪将真菌孢子吹打均匀后置于内塞纱布的注射器中,过滤除去菌丝制成孢子悬浮液 (许华等, 2016)。将孢子悬浮液于血细胞计数板在显微镜下计数,然后稀释至 10^7 个/mL。取幼虫取食和未取食的甘蔗萃取液以及无菌水各 15 μL 分别与孢子悬浮液 1:1 混合均匀,加入凹载玻片后置于湿盒中 25 °C 培养 8 h。再于显微镜下取凹载玻片的 6 个大小为 10 μm×40 μm 的视野进行孢子萌发计数,孢子芽管长度大于孢子的 3 倍视为萌发。计算公式为: $R=M/N \times 100\%$, 其中 R 为孢子萌发率, M 为孢子萌发数, N 为统计的孢子总数 (许华等, 2013)。

1.3.5 蛋白酶 K 和高温处理对幼虫取食分泌物抑菌活性的影响测定 分别取 240 μL 幼虫取食和未取食甘蔗萃取液,加入 2.6 μL 的蛋白酶 K 后 37 °C 处理 2 h, 然后进行细菌抑菌活性测定和真菌孢子萌发测定,方法同 1.3.2、1.3.3 和 1.3.4。分别取幼虫取食和未取食甘蔗萃取液 100 °C 水浴处理 20 min, 然后 4 °C、10 000 r/min 离心,收集上清溶液进行细菌抑菌活性测定和真菌孢子萌发测定,方法同 1.3.2、1.3.3 和 1.3.4。同时取未做任何处理的幼虫取食和未取食甘蔗萃取液进行同步实验。

1.3.6 幼虫体表分泌物和排泄物的抑菌活性测定 在超净工作台中,用蘸有 75% 酒精的棉花对红棕象甲鲜活幼虫的体表进行消毒处理,然后置于无菌培养皿中,不添加任何食物,按每克幼虫加入 200 μL 无菌水至其体表,促使幼虫体表分泌物和排泄物的溶解和释放。在室温下放置 2 h,使得分泌物和排泄物的混合物充分萃取到水溶

液中。接着,将萃取到的分泌物和排泄物混合物吸取到无菌的 1.5 mL 离心管中,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液并用 0.22 μm 的针头式过滤器过滤,最后通过比浊法测定其抑制细菌的能力,方法同 1.3.2。

1.4 数据分析

试验数据用 Excel 2016 进行整理,在 Graphpad prism 9.0.0 软件中进行统计分析和作图。数据呈正态分布,用平均值 $\pm$ 标准误来表示。细菌抑菌活性和真菌孢子萌发抑制测定用 ANOVA 进行单因素分差分析,并用 Tukey 方法进行多重比较分析;蛋白酶 K 和高温处理后的抑菌活性测定及体表分泌物和排泄物的抑菌活性测定采用独立样本 t 检验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 红棕象甲取食分泌物抗细菌活性测定

由图 2 (A, B) 可知红棕象甲幼虫取食甘蔗的萃取液培养的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌几乎没有生长,生长量显著低于未取食甘蔗萃取液

和空白对照培养细菌的生长量(大肠杆菌: $F_{2,15} = 51.58, P < 0.0001$;金黄色葡萄球菌: $F_{2,15} = 331.80, P < 0.0001$)。表明红棕象甲幼虫取食过的食物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长具有极强的抑制作用。

如图 3 (A-D) 所示,幼虫取食甘蔗萃取液处理的平板相比未取食甘蔗萃取液以及无菌水处理长有更少的苏云金芽孢杆菌菌落(图 3: A, A', A''),而 3 组处理的粘质沙雷细菌菌落都比较多(图 3: B, B', B'')。CFUs 统计结果表明,3 组处理的苏云金芽孢杆菌菌落数存在差异,幼虫取食甘蔗萃取液处理苏云金芽孢杆菌菌落数(平均为 28 CFUs)显著低于未取食甘蔗萃取液(平均为 723 CFUs)以及无菌水处理(平均为 631 CFUs) ($F_{2,15} = 362.30, P < 0.0001$) (图 3: C),表明幼虫取食甘蔗萃取液抑制了苏云金芽孢杆菌的生长。3 组处理的粘质沙雷氏菌菌落数存在差异,表现为幼虫取食甘蔗萃取液处理粘质沙雷氏菌菌落数(平均为 444 CFUs)显著低于未取食甘蔗萃取液(平均为 558 CFUs) ($F_{2,18} = 7.84, P < 0.01$),但与阴性对照无菌水处理(平均为 490 CFUs)没有显著性差异 ($P > 0.05$) (图 3: D),

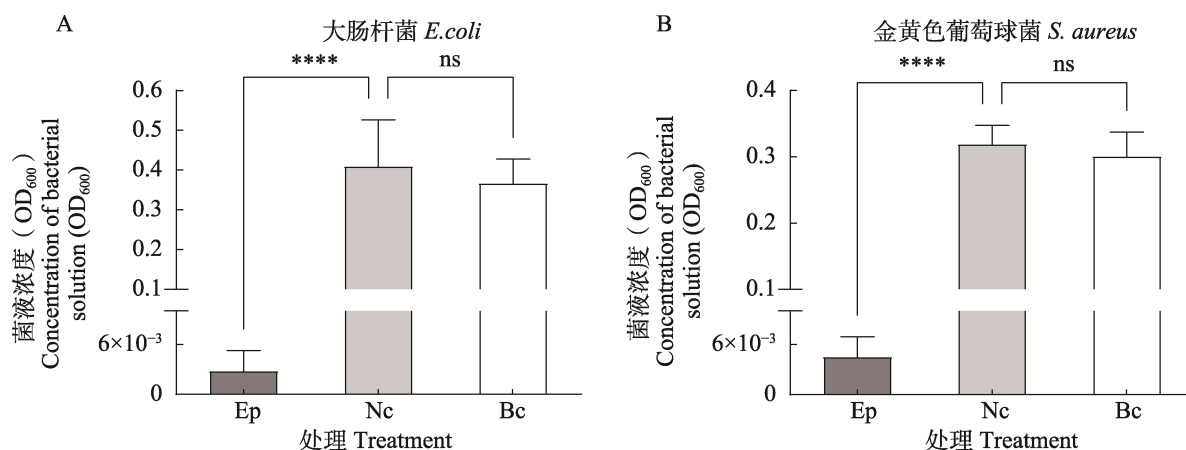


图 2 红棕象甲幼虫取食分泌物对大肠杆菌 (A) 和金黄色葡萄球菌 (B) 的抑菌活性
Fig. 2 Antibacterial activity of feeding secretions from *Rhynchophorus ferrugineus* larvae against *Escherichia coli* (A) and *Staphylococcus aureus* (B)

Ep: 实验组, 幼虫取食甘蔗的萃取液; Nc: 阴性对照, 幼虫未取食甘蔗的萃取液; Bc: 空白对照, 萃取溶剂无菌水。

图 3-图 5 同。图中数据为平均值 $\pm$ 标准误。****表示经 Tukey's 多重比较在 $P < 0.0001$ 水平差异显著, ns 表示经 Tukey's 多重比较差异不显著 ($P > 0.05$)。图 3 和图 4 同。

Ep: Experimental group, extract from sugarcane that larvae has eaten; Nc: Negative control, extract from sugarcane that larvae has not eaten. Bc: Blank control, extraction solvent sterile water. The same for Fig. 3-Fig. 5. Data in the figure are mean $\pm$ SE. **** indicates significant difference at 0.0001 level by Tukey's multiple comparison test, and ns indicates no significant difference by Tukey's multiple comparison test ($P > 0.05$). The same for Fig. 3 and Fig. 4.

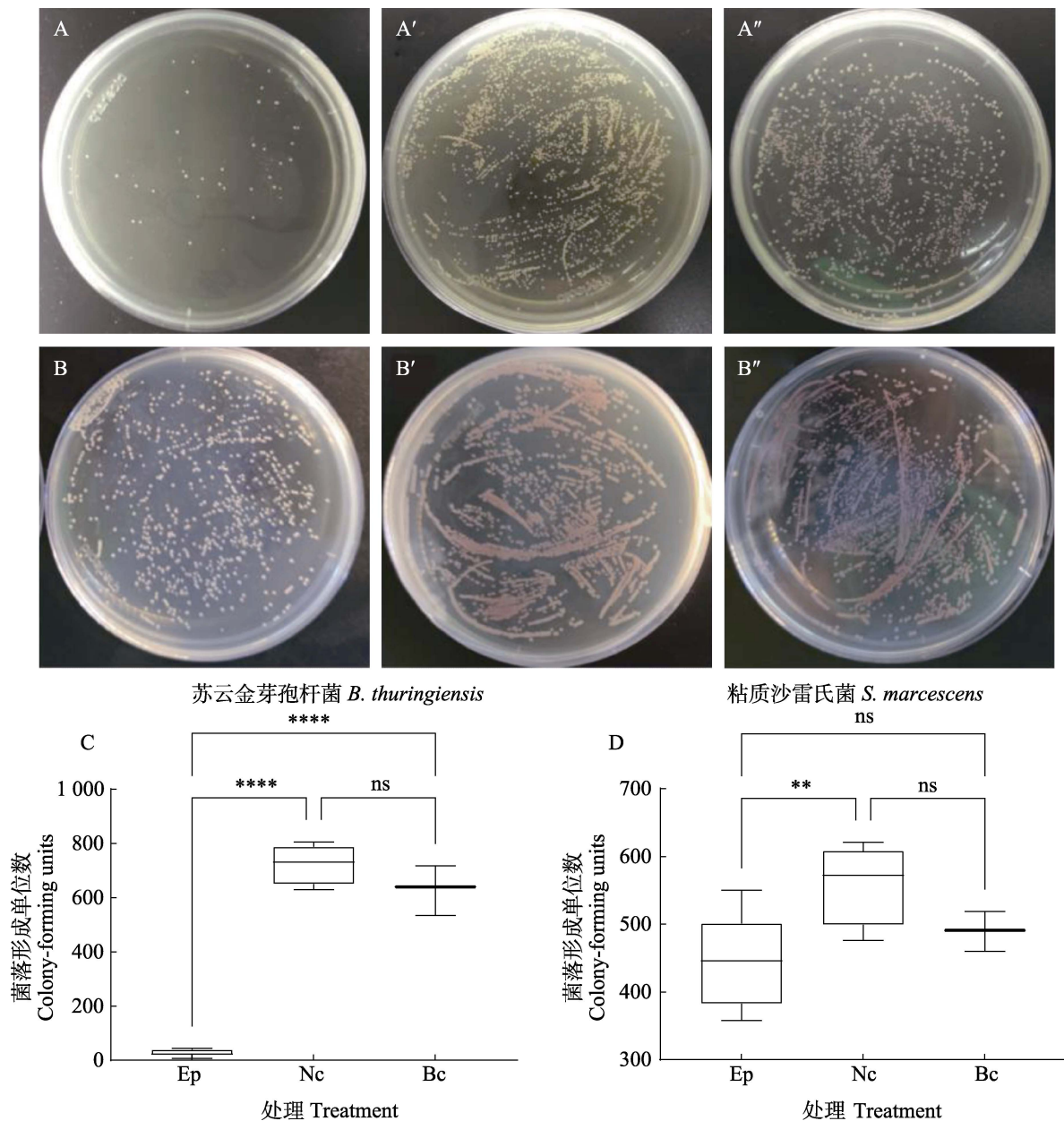


图 3 红棕象甲幼虫取食分泌物对苏云金芽孢杆菌和粘质沙雷氏菌的抑菌活性
Fig. 3 Antibacterial activity of feeding secretions from *Rhynchophorus ferrugineus* larvae against *Bacillus thuringiensis* and *Serratia marcescens*

A, A' and A''. 分别为 Ep、Nc 和 Bc 处理下培养的苏云金芽孢杆菌菌落; B, B' and B''. 分别为 Ep、Nc 和 Bc 处理下培养的粘质沙雷氏菌菌落; C. 不同处理苏云金芽孢杆菌菌落数比较; D. 不同处理粘质沙雷氏菌菌落数比较。

**表示经 Tukey's 多重比较在 $P < 0.01$ 水平差异显著。

A, A' and A''. *Bacillus thuringiensis* colonies cultured under Ep, Nc and Bc treatments, respectively; B, B' and B''. *S. marcescens* colonies cultured under Ep, Nc and Bc treatments, respectively; C. Comparison of CFUs of *B. thuringiensis* under different treatments; D. Comparison of CFUs of *S. marcescens* under different treatments.

** indicates significant difference at 0.01 level by Tukey's multiple comparison test.

表明幼虫取食甘蔗萃取液不能有效抑制粘质沙雷氏菌的生长。综上所述,幼虫取食甘蔗萃取液含有有效抑菌成分能够抑制苏云金芽孢杆菌生长,但不能抑制粘质沙雷氏菌的生长。

2.2 红棕象甲取食分泌物对真菌孢子萌发的抑制作用

如图 4 (A-F) 所示,可以明显看出球孢白

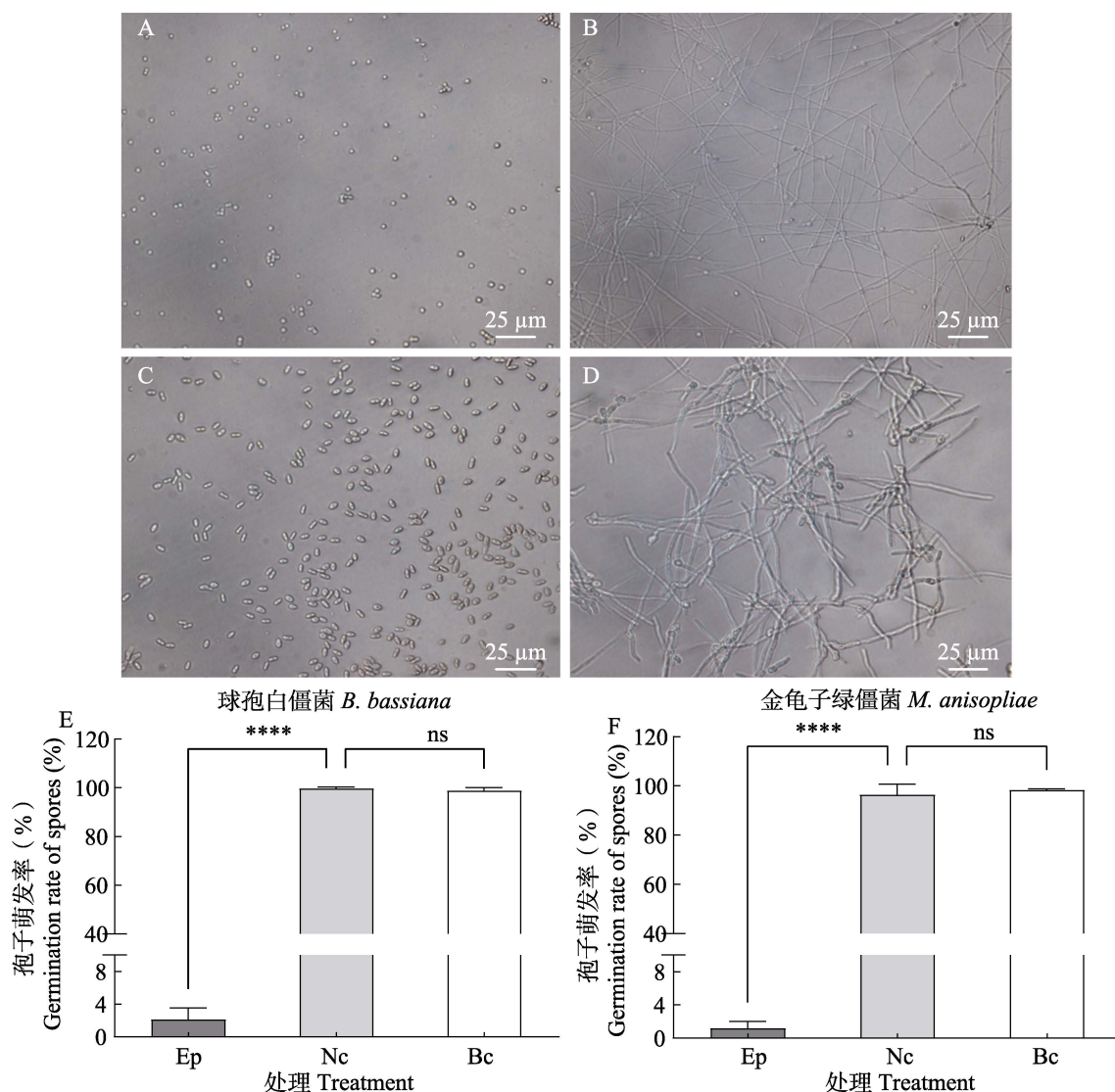


图 4 红棕象甲幼虫取食分泌物对球孢白僵菌和金龟子绿僵菌的孢子萌发抑制测定

Fig. 4 Inhibition of fungal spore germination of feeding secretions from *Rhynchophorus ferrugineus* larvae against *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*

A. 球孢白僵菌孢子在幼虫取食过的甘蔗萃取液中的萌发状态; B. 球孢白僵菌孢子在未取食过的甘蔗萃取液中的萌发状态; C. 金龟子绿僵菌孢子在取食过的甘蔗萃取液中的萌发状态; D. 金龟子绿僵菌孢子在未取食过的甘蔗萃取液中的萌发状态; E. 金龟子绿僵菌孢子不同处理 8 h 的萌发率; F. 球孢白僵菌孢子不同处理 8 h 的萌发率。

A. Germination of *B. bassiana* spores in sugarcane extract that larvae has eaten; B. Germination of *B. bassiana* spores in sugarcane extract that larvae has not eaten; C. Germination of *M. anisopliae* spores in sugarcane extract that larvae has eaten; D. Germination of *M. anisopliae* spores in sugarcane extract that larvae has not eaten; E. Germination rate of *B. bassiana* spores under different treatments for 8 h; F. Germination rate of *M. anisopliae* spores under different treatments for 8 h.

僵菌和金龟子绿僵菌的孢子在取食过的甘蔗萃取液中几乎没有萌发出菌丝 (图 4: A, C), 而在未取食的甘蔗萃取液中几乎所有孢子都萌发了菌丝 (图 4: B, D)。统计 8 h 时的孢子萌发率, 球孢白僵菌孢子在取食过的甘蔗萃取液中的平均萌发率仅为 2.77%, 而在无菌水和未取食的

甘蔗萃取液中的萌发率分别为 98.75% 和 99.75%, 球孢白僵菌在未取食甘蔗萃取液中的孢子萌发率显著高于取食过的甘蔗萃取液的孢子萌发率 ($F_{2,16}=15\ 374$, $P<0.000\ 1$) (图 4: E); 金龟子绿僵菌在取食过的甘蔗萃取液中的萌发率仅为 0.88%, 而在无菌水和未取食的甘蔗萃取

液中的萌发率分别为 98.65% 和 98.32%，金龟子绿僵菌在未取食甘蔗萃取液中的孢子萌发率显著高于取食过的甘蔗萃取液的孢子萌发率 ($F_{2,16}=2\,786$, $P<0.000\,1$) (图 4: F)。结果表明，幼虫取食分泌物含有有效抑菌成分能够抑制真菌孢子的萌发与生长。

2.3 蛋白酶 K 和高温处理对幼虫取食分泌物抑菌活性的影响

经蛋白酶 K 处理后，幼虫取食甘蔗萃取液培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长量依然显著低于未取食甘蔗萃取液培养的生长量 (大肠杆菌: $t=33.85$, $df=6$, $P<0.000\,1$; 金黄色葡萄球菌:

$t=24.92$, $df=6$, $P<0.000\,1$) (图 5: A, B)。幼虫取食甘蔗萃取液处理球孢白僵菌和金龟子绿僵菌的孢子萌发率显著低于未取食甘蔗萃取液培养处理的孢子萌发率 (球孢白僵菌: $t=126.9$, $df=13$, $P<0.000\,1$; 金龟子绿僵菌: $t=143.1$, $df=14$, $P<0.000\,1$) (图 5: C, D)。幼虫取食甘蔗萃取液处理苏云金芽孢杆菌菌落数显著低于未取食甘蔗萃取液 ($t=23.57$, $df=10$, $P<0.000\,1$) (图 5: E)。经高温水浴处理后，幼虫取食甘蔗萃取液培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长量依然显著低于未取食甘蔗萃取液培养的生长量 (大肠杆菌: $t=7.557$, $df=6$, $P<0.001$; 金黄色葡萄球菌: $t=11.03$, $df=6$, $P<0.000\,1$) (图 5: A, B)。幼

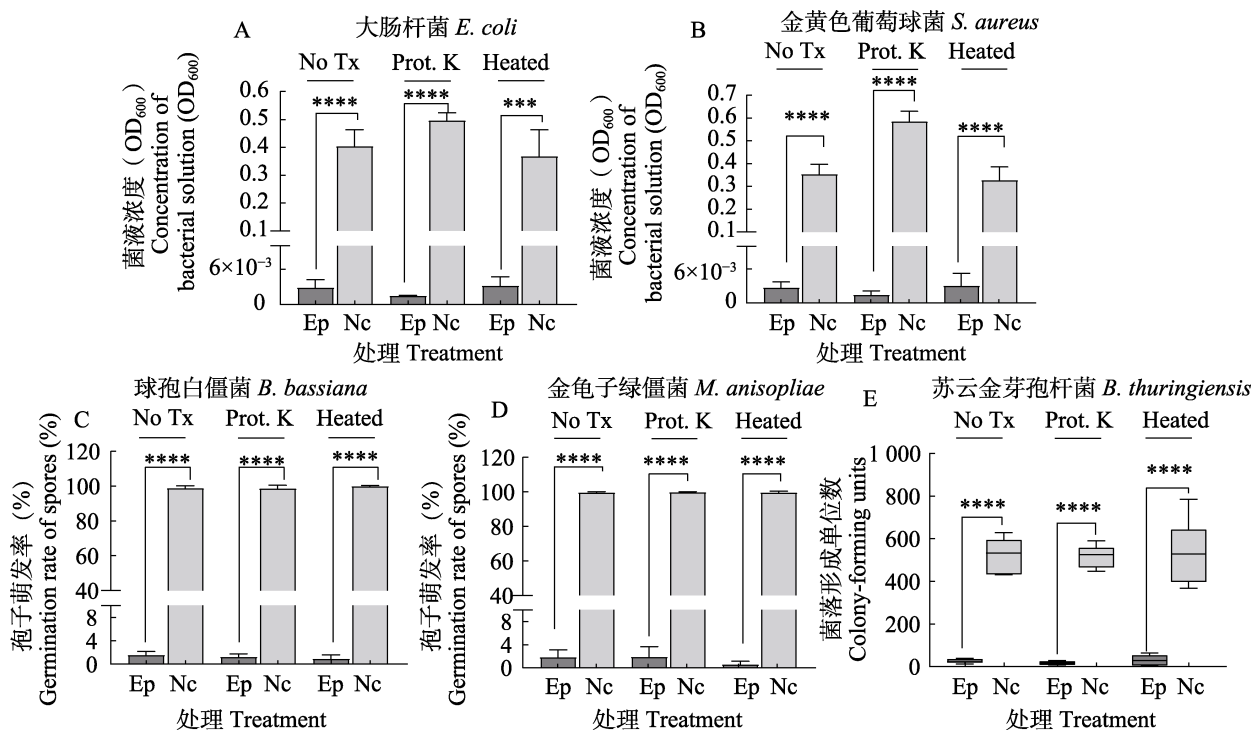


图5 蛋白酶 K 和高温处理后红棕象甲幼虫取食分泌物抑菌活性测定

Fig. 5 Antimicrobial activity of feeding secretions from *Rhynchophorus ferrugineus* larvae after protease K and high temperature treatment

No Tx: 无任何处理; Prot. K: 蛋白酶 K 处理; Heated: 100 °C 水浴处理。A、B 和 E. 不同处理分别对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和苏云金芽孢杆菌抑菌活性的影响; C 和 D. 不同处理分别对球孢白僵菌和金龟子绿僵菌孢子萌发率的影响。图中数据为平均值±标准误。***表示经独立样本 t 检验在 $P<0.001$ 水平差异显著, ****表示经独立样本 t 检验在 $P<0.000\,1$ 水平差异显著。图 6 同。

No Tx: Untreated; Prot. K: Protease K treatment; Heated: 100 °C water bath treatment. A, B and E. Effects of different treatments on antibacterial activity of *E. coli*, *S. aureus* and *B. thuringiensis*, respectively; C and D. Effects of different treatments on spore germination rates of *B. bassiana* and *M. anisopliae*, respectively. Data in the figure are mean±SE. *** indicates significant difference at 0.001 level by independent sample t -test. **** indicates significant difference at 0.000 1 level by independent sample t -test. The same for Fig. 6.

虫取食甘蔗萃取液处理球孢白僵菌和金龟子绿僵菌的孢子萌发率显著低于未取食甘蔗萃取液培养处理的孢子萌发率(球孢白僵菌: $t=259.5$, $df=9$, $P<0.0001$; 金龟子绿僵菌: $t=224.4$, $df=11$, $P<0.0001$)(图 5: C, D)。幼虫取食甘蔗萃取液处理苏云金芽孢杆菌菌落数显著低于未取食甘蔗萃取液($t=8.209$, $df=10$, $P<0.0001$)(图 5: E)。结果表明, 蛋白酶 K 处理和高温水浴处理并未影响幼虫取食分泌物的抑菌活性, 说明幼虫取食分泌物中的抗菌物质可能不是蛋白质或多肽类的化合物, 而且具有很强的热稳定性。

2.4 体表分泌物和排泄物的抑菌特性分析

为验证食物中的抑菌特性是幼虫取食过程中分泌的, 而非体表分泌物或排泄物引起的, 萃取了幼虫体表分泌物和排泄物进行抑菌活性测定。结果表明, 体表分泌物和排泄物萃取液不仅没有对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌产生抑菌效应, 反而显著促进了这 2 种细菌的生长(大肠杆菌: $t=24.76$, $df=4$, $P<0.0001$; 金黄色葡萄球菌: $t=12.84$, $df=4$, $P<0.001$)(图 6)。说明红棕象甲幼虫食物萃取液中的抑菌活性物质不是由幼虫体表分泌物和排泄物引起的, 而是在幼虫取食过程中分泌至食物中的。

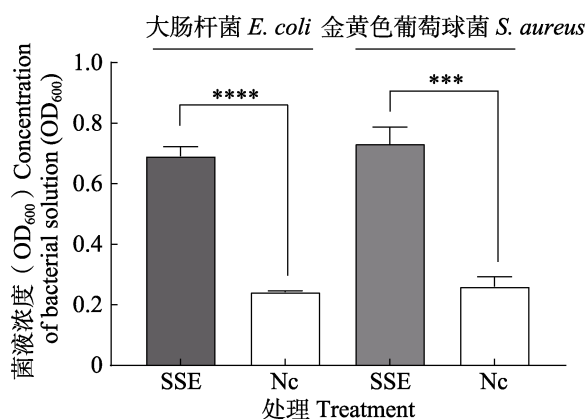


图 6 红棕象甲幼虫体表分泌物和排泄物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性

Fig. 6 Antibacterial activity of surface secretions and excreta from *Rhynchophorus ferrugineus* larvae against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

SSE: 体表分泌物和排泄物; Nc: 对照组, 萃取溶剂无菌水。SSE: Surface secretions and excreta; Nc: Control, extraction solvent sterile water.

3 讨论

本研究结果表明, 红棕象甲幼虫取食过的甘蔗对细菌和真菌的生长均具有强烈的抑制作用, 且幼虫取食过的甘蔗萃取液经蛋白酶 K 和热处理后仍表现出稳定的抗菌活性, 说明分泌物中的抗菌活性成分不是蛋白质或者多肽, 且有一定的热稳定性。此外, 非取食状态下, 幼虫体表分泌物和排泄物对细菌没有明显的抑制作用, 说明导致幼虫取食过的甘蔗不易腐败的原因是幼虫在取食过程中向食物中分泌了抗菌化合物。

首先, 研究结果反映了红棕象甲应对环境病原微生物的一种防御策略, 即向食物及环境中释放稳定的抗菌物质, 从而维持食物及自身环境的安全。红棕象甲主要以幼虫在棕榈科植株茎秆内钻蛀取食为害, 红棕象甲侵染后的枣椰树可溶性糖类和蛋白质含量显著上升 (Manzoor *et al.*, 2022), 取食过的蛀屑潮湿且具有发酵性气味 (Butera *et al.*, 2012), 说明幼虫取食后的食物残渣为微生物的滋长提供了丰富的营养条件, 可能会对红棕象甲的生存造成威胁。而本研究表明红棕象甲取食分泌物具有极强的抑菌特性, 可能参与抑制食物中微生物滋长的作用, 进而短时间内维持其健康的生存环境。研究表明, 在自然环境中红棕象甲幼虫比成虫更容易被病原微生物感染, 且从幼虫环境中分离到的病原真菌和细菌对幼虫均有较强的致死率和致病率 (Abdel-Baky *et al.*, 2021), 说明幼虫的生存饱受环境中病原微生物的威胁。在红棕象甲的生物防治中, 球孢白僵菌 (Hussain *et al.*, 2015; Jalinat *et al.*, 2015) 和金龟子绿僵菌 (朱辉等, 2010; 张晶等, 2012) 等真菌具有一定的防治潜能。本实验室前期研究表明苏云金芽孢杆菌 (Pu *et al.*, 2017) 和粘质沙雷氏菌 (Pu and Hou, 2016) 也对幼虫具有良好的防治潜能。本研究发现, 红棕象甲的取食分泌物既能抑制这些病原细菌的生长, 又能抑制病原真菌孢子的萌发, 并且抑菌效能稳定, 蛋白酶 K 和热处理也不会对其抑菌特性产生影响, 表明该害虫通过向食物环境中分泌抗菌物质防止病原菌生长对自身健康造成影响。同时, 这种预防策

略可能会影响病原菌对该虫的防治效率。本研究并未证实取食分泌物对粘质沙雷氏菌有较强的抑菌活性,其广谱的抗菌特性尚需进一步验证。另外,红棕象甲的幼虫有 2-3 个月的幼虫龄期,这种防御策略也为幼虫从低龄向高龄的发育提供了保障。

其次,本研究在取食分泌物的上清液中证明了其抗菌特性,且高温处理和蛋白酶 K 也没有降低其抑菌效能,说明幼虫抗菌分泌物可能是较为稳定的水溶性且非蛋白类物质组成。白蚁的兵蚁口器可以持续向外分泌广谱的抗微生物蛋白从而构筑起群体外部免疫 (He *et al.*, 2018)。而红棕象甲幼虫通常单独取食且取食量巨大,再加上其主要分布在热带和亚热带地区,生存环境炎热潮湿 (Peng *et al.*, 2016),分泌的抗菌物质的稳定性和时效性可能关乎其生存健康,蛋白质类抗菌分泌物在环境中易受不良因素如高温的影响而分解,效力较差,持续时间短,这可能是其不作为体外抗菌分泌物的原因。一些昆虫分泌的抗菌化合物展现出广谱的抗菌效能和较强的稳定性,如赤拟谷盗成虫分泌的抗菌化合物 1,4-Benzoquinone、Methyl-1,4-benzoquinone、Ethyl-1,4-benzoquinone 都展现出了极强的抑菌效能和时效性 (Sawada *et al.*, 2020; Duarte *et al.*, 2022),而在红棕象甲幼虫的口器分泌物中也含有一定量的 *p*-benzoquinone,可能发挥着潜在的抗菌作用 (Pu *et al.*, 2020)。此外,家蝇幼虫体表及蛹壳的粗提取物具有广谱的抑菌活性,也表现出极强的热稳定性,在 100 °C 高温处理 10 min 后仍然保持较高抑菌活性 (王香萍, 2001),这与红棕象甲幼虫抗菌分泌物的耐高温特性相一致,展现出了相似的外部防御策略。

最后,昆虫可以通过不同的途径向环境中分泌抗菌物质实现外部免疫 (Otti *et al.*, 2014),如赤拟谷盗通过特化的胸腺和腹腺分泌醌类物质发挥抑菌特性 (Li *et al.*, 2013),红头丽蝇 *Calliphora vicina* 的排泄物和分泌物均有抗菌特性 (Dallavecchia *et al.*, 2021)。而红棕象甲幼虫抗菌物质的分泌可能取食行为相关。本研究萃取了红棕象甲幼虫的表皮分泌物和排泄物,其并不

能有效抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长,相反却在一定程度上促进细菌的生长,说明幼虫的表皮分泌物和排泄物不仅没有抑菌特性,其中可能还包含着一些营养物质有利于细菌生长。Sewify 等 (2017) 研究表明,红棕象甲的消化道分泌物能够有效抑制包括革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌以及一些真菌的生长,这与本研究中幼虫取食分泌物的抑菌特性相一致,而红棕象甲幼虫取食过程通过类似反刍的方式将咀嚼碎的食物吐出 (Seman-Kamarulzaman *et al.*, 2023),推测该害虫可能在取食过程中将消化道中的抑菌活性物质释放到食物中,从而保持了食物的抗菌特性。为了解决日益增长的耐药性危机,迫切需要增加对抗微生物药物研究和开发。目前,许多研究正在关注昆虫及其微生物群的关系,以寻找新的抗菌剂 (Borrelli *et al.*, 2021; Van Moll *et al.*, 2021)。本研究发现红棕象甲幼虫取食分泌物具有较为广谱的抑菌特性,有助于研究和开发昆虫源的抗微生物药物。

总的来说,本研究证实了红棕象甲幼虫在取食过程中分泌抗菌物质到食物中,可以有效的抑制细菌的生长和真菌孢子的萌发,并且抗菌活性物质表现出极强的稳定性,这是幼虫应对环境病原微生物一种有效的预防策略,可以保证食物和生存环境的安全,提高幼虫的存活率。同时,这也给红棕象甲的病原防治带来了新的挑战,在后续研究中应更注重食物抗菌分泌物对生物防治效果的影响,进一步筛选验证幼虫抗菌分泌物的组成,丰富对红棕象甲防御策略的了解,并促进昆虫源的抗微生物药物的开发。

参考文献 (References)

- Abdel-Baky NF, Hamed KE, Al-Otaibi ND, Aldeghairi MA, 2021. Bioassay of some indigenous entomopathogens for controlling *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier in Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 24(9): 944–952.
- Arce AN, Johnston PR, Smiseth PT, Rozen DE, 2012. Mechanisms and fitness effects of antibacterial defences in a carrion beetle. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(5): 930–937.
- Arce AN, Smiseth PT, Rozen DE, 2013. Antimicrobial secretions and social immunity in larval burying beetles, *Nicrophorus*

- vespilloides*. *Animal Behaviour*, 86(4): 741–745.
- Baracchi D, Mazza G, Turillazzi S, 2012. From individual to collective immunity: The role of the venom as antimicrobial agent in the Stenogastrinae wasp societies. *Journal of Insect Physiology*, 58(1): 188–193.
- Borrelli L, Variale L, Dipineto L, Pace A, Menna LF, Fioretti A, 2021. Insect derived lauric acid as promising alternative strategy to antibiotics in the antimicrobial resistance scenario. *Frontiers in Microbiology*, 12: 620798.
- Bulmer MS, Bachelet I, Raman R, Rosengaus RB, Sasisekharan R, 2009. Targeting an antimicrobial effector function in insect immunity as a pest control strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31): 12652–12657.
- Butera G, Ferraro C, Colazza S, Alonzo G, Quatrini P, 2012. The culturable bacterial community of frass produced by larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) in the Canary island date palm. *Letters in Applied Microbiology*, 54(6): 530–536.
- Dallavecchia DL, Ricardo E, da Silva AS, Rodrigues AG, 2021. Antibacterial and antifungal activity of excretions and secretions of *Calliphora vicina*. *Medical And Veterinary Entomology*, 35(2): 225–229.
- Ding B, Wei CJ, Huang ZY, Wang LP, 2015. Risk assessment of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier in China. *Fujian Linye*, 2015(1): 32–35. [丁璐, 魏初奖, 黄振裕, 王玲萍, 2015. 我国红棕象甲的风险评估报告. 福建林业, 2015(1): 32–35.]
- Duarte S, Magro A, Tomás J, Hilário C, Ferreira RB, Carvalho MO, 2022. Antifungal activity of benzoquinones produced by *Tribolium castaneum* in maize-associated fungi. *Insects*, 13(10): 868.
- Haine ER, Moret Y, Siva-Jothy MT, Rolff J, 2008. Antimicrobial defense and persistent infection in insects. *Science*, 322(5905): 1257–1259.
- He S, Johnston PR, Kuropka B, Lokatis S, Weise C, Plarre R, Kunte HJ, McMahon DP, 2018. Termite soldiers contribute to social immunity by synthesizing potent oral secretions. *Insect Molecular Biology*, 27(5): 564–576.
- Herzner G, Schlecht A, Dollhofer V, Parzefall C, Harrar K, Kreuzer A, Pilsl L, Ruther J, 2013. Larvae of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* sanitize their host, the American cockroach, with a blend of antimicrobials. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4): 1369–1374.
- Hussain A, Rizwan-ul-Haq M, Al-Ayedh H, Ahmed S, Al-Jabr AM, 2015. Effect of *Beauveria bassiana* infection on the feeding performance and antioxidant defence of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *BioControl*, 60(6): 849–859.
- Isidorov V, Zalewski A, Zambrowski G, Swiecicka I, 2023. Chemical composition and antimicrobial properties of honey bee venom. *Molecules*, 28(10): 4135.
- Jalinas J, Güerri-Agulló B, Mankin RW, López-Follana R, Lopez-Llorca LV, 2015. Acoustic assessment of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) effects on *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) larval activity and mortality. *Journal of Economic Entomology*, 108(2): 444–453.
- Li JW, Lehmann S, Weißbecker B, Ojeda Naharros I, Schütz S, Joop G, Wimmer EA, 2013. Odoriferous defensive stink gland transcriptome to identify novel genes necessary for quinone synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *PLoS Genetics*, 9(7): e1003596.
- Liu L, Yan W, Wei J, Huang SC, Zhang J, Qin WQ, Cao JH, Peng ZQ, 2011. Chemical control of *Rhynchophorus ferrugineus* larvae. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 32(8): 1545–1548. [刘丽, 阎伟, 魏娟, 黄山春, 张晶, 覃伟权, 曹建华, 彭正强, 2011. 红棕象甲幼虫化学防治研究. 热带作物学报, 32(8): 1545–1548.]
- Manzoor M, Yang L, Wu SY, El-Shafie H, Haider MS, Ahmad JN, 2022. Feeding preference of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) on different date palm cultivars and host biochemical responses to its infestation. *Bulletin of Entomological Research*, 112(4): 494–501.
- Otti O, Tragust S, Feldhaar H, 2014. Unifying external and internal immune defences. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(11): 625–634.
- Peng L, Miao YX, Hou YM, 2016. Demographic comparison and population projection of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) reared on sugarcane at different temperatures. *Scientific Reports*, 6: e31659.
- Peng L, Hou YM, 2017. Chapter 13 red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier)// Wan FH, Jiang MX, Zhan AB (eds.). Biological Invasions and Its Management in China, Volume 11 of the Series Invading Nature-Springer Series in Invasion Ecology. The Netherlands: Springer Nature. 245–256.
- Pessotti RC, Hansen BL, Reaso JN, Ceja-Navarro JA, El-Hifnawi L, Brodie EL, Traxler MF, 2021. Multiple lineages of *Streptomyces* produce antimicrobials within passalid beetle galleries across eastern North America. *eLife*, 10: e65091.
- Pu YC, Hou YM, 2016. Isolation and identification of bacterial strains with insecticidal activities from *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Applied Entomology*,

- 140(8): 617–626.
- Pu YC, Ma TL, Hou YM, Sun M, 2017. An entomopathogenic bacterium strain, *Bacillus thuringiensis*, as a biological control agent against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science*, 73(7): 1494–1502.
- Pu YC, Xiang HJ, Liang XY, Wang Y, Hou YM, Fu L, Wang R, 2020. External immune inhibitory efficiency of external secretions and their metabolic profiling in red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Frontiers in Physiology*, 10: 1624.
- Sawada M, Sano T, Hanakawa K, Sirasoonthorn P, Oi T, Miura K, 2020. Benzoquinone synthesis-related genes of *Tribolium castaneum* confer the robust antifungal host defense to the adult beetles through the inhibition of conidial germination on the body surface. *Journal of Invertebrate Pathology*, 169: 107298.
- Sewify GH, Hamada HM, Alhadrami HA, 2017. In vitro evaluation of antimicrobial activity of alimentary canal extracts from the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier larvae. *BioMed Research International*, 2017: 8564601.
- Seman-Kamarulzaman AF, Pariamiskal FA, Azidi AN, Hassan M, 2023. A review on digestive system of *Rhynchophorus ferrugineus* as potential target to develop control strategies. *Insects*, 14(6): 506.
- Shi ZH, Lin YT, Hou YM, 2014. Mother-derived trans-generational immune priming in the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera, Dryophthoridae). *Bulletin of Entomological Research*, 104(6): 742–750.
- Tragust S, Mitteregger B, Barone V, Konrad M, Ugelvig LV, Cremer S, 2013. Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison. *Current Biology*, 23(1): 76–82.
- Ulrich KR, Feldlaufer MF, Kramer M, St Leger RJ, 2015. Inhibition of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* sensu lato in vitro by the bed bug defensive secretions (*E*)-2-hexenal and (*E*)-2-octenal. *BioControl*, 60(4): 517–526.
- Van Moll L, De Smet J, Cos P, Van Campenhout L, 2021. Microbial symbionts of insects as a source of new antimicrobials: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(5): 562–579.
- Xu H, Ruan XH, Liu XH, Chen ZH, Deng XY, Zhu XQ, Lai ST, You XY, Chen C, 2013. Suppression of three alien invasive plants extracts on plant pathogenic fungi. *Hubei Agricultural Sciences*, 52(24): 6057–6059, 6086. [许华, 阮晓慧, 刘小函, 陈梓煌, 邓晓勇, 祝晓晴, 赖斯婷, 尤馨悦, 陈超, 2013. 三种外来入侵植物提取液对三种植物病原真菌的抑菌作用. 湖北农业科学, 52(24): 6057–6059, 6086.]
- Xu H, Lin Q, Su CZ, Wei YK, 2016. Inhibition effects of extracts from three alien invasive plants on spore germination of three plant pathogenic fungi. *China Plant Protection*, 36(4): 15–18, 14. [许华, 林青, 苏纯哲, 魏宇昆, 2016. 3种外来入侵植物提取液对3种病原真菌孢子萌发的抑制作用初探. 中国植保导刊, 36(4): 15–18, 14.]
- Wang GH, Hou YM, Zhang X, Zhang J, Li JL, Chen ZM, 2017. Strong population genetic structure of an invasive species, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), in Southern China. *Ecology and Evolution*, 7(24): 10770–10781.
- Wang XP, 2001. Extraction and purification of secretion from housefly larvae and its antimicrobial character. Master dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [王香萍, 2001. 家蝇幼虫体外分泌物分离纯化及抑菌作用研究. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]
- Wu GQ, Zhao ZY, Liu CL, Qiu LH, 2014. Priming *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae with heat-killed bacterial cells induced an enhanced immune protection against *Photobacterium luminescens* TT01 and the role of innate immunity in the process. *Journal of Economic Entomology*, 107(2): 559–569.
- Zhang J, Qin WQ, Yan W, Peng ZQ, 2012. Detection of pathogenicity of *Metarhizium* against *Rhynchophorus ferrugineus* in laboratory. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 33(5): 899–905. [张晶, 覃伟权, 阎伟, 彭正强, 2012. 金龟子绿僵菌对红棕象甲的室内致病力测定. 热带作物学报, 33(5): 899–905.]
- Zhu H, Qin WQ, Huang SC, Yan W, Sun XD, 2010. Isolation and identification of an entomopathogenic fungus strain of *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver. *ACTA Phytophylacica Sinica*, 37(4): 336–340. [朱辉, 覃伟权, 黄山春, 阎伟, 孙晓东, 2010. 一株红棕象甲寄生真菌的分离鉴定. 植物保护学报, 37(4): 336–340.]