



橘小实蝇无菌品系的构建方法*

谢俊飞^{1**} 何文峰² 邱敏² 舒浩然³ 林嘉欣² 刘磊磊^{1***}

(1. 武汉生物工程学院生命科学与技术学院, 武汉 430415; 2. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070;
3. 湖北工业大学生命科学与健康工程学院, 武汉 430068)

摘要 【目的】建立橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 无菌品系的标准化培育方法, 为探究其肠道微生物与宿主之间的互作关系提供有力的技术支持。【方法】操作流程包括环境控制、材料灭菌、胚胎脱菌和无菌培养四个环节。利用平板涂布结合细菌 16S rDNA 和真菌 ITS1 区 PCR 扩增与电泳检测, 综合评价无菌培育效果。【结果】脱菌后的卵可稳定发育至蛹期。平板涂布培养及分子检测 (16S rDNA 与 ITS1 区 PCR 扩增电泳) 结果一致表明, 所获幼虫体内外均无外源微生物污染。【结论】本研究通过优化操作流程与环境控制, 建立了稳定、可重复的橘小实蝇无菌品系培育体系, 可为肠道共生菌等功能研究提供标准化的实验模型。

关键词 橘小实蝇; 肠道微生物; 无菌培养, 品系构建

Method for constructing axenic strain of *Bactrocera dorsalis*

XIE Jun-Fei^{1**} HE Wen-Feng² QIU Min² SHU Hao-Ran³
LIN Jia-Xin² LIU Lei-Lei^{1***}

(1. School of Life Sciences and Technology, Wuhan University of Bioengineering, Wuhan 430415, China;
2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
3. School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract [Aim] To establish a standardized method for cultivating germ-free strains of *Bactrocera dorsalis*, providing robust technical support for investigating the interactions between gut microbiota and host. [Methods] The operational procedure comprised four key steps: Environmental control, material sterilization, embryo surface sterilization, and axenic cultivation. The effectiveness of the axenic rearing was comprehensively evaluated using plate culture combined with PCR amplification and electrophoretic detection of bacterial 16S rDNA and fungal ITS1 regions. [Results] Following the above procedure, surface-sterilized embryos consistently developed to the pupal stage. Both plate culture and molecular detection (PCR amplification and electrophoresis of 16S rDNA and ITS1 regions) yielded consistent results, indicating no detectable exogenous microbial contamination inside or outside the obtained larvae. [Conclusion] By optimizing operational procedures and environmental controls, this study established a stable and reproducible system for cultivating axenic strain of *B. dorsalis*, providing a standardized experimental model for functional studies on gut symbionts and other aspects.

Key words *Bactrocera dorsalis*; gut microbiota; axenic cultivation; strain establishment

据估计, 人类肠道中的微生物数量约是细胞总数的 10 倍, 其编码基因数量可达动物基因的 100 倍 (Valdes *et al.*, 2018)。随着科学家对肠

道共生菌功能研究的深入, 其在宿主代谢、免疫调节和行为调控等多方面的功能逐渐被揭示, 因而被视作一个虚拟的“功能器官”。与哺乳动物

*资助项目 Supported project: 武汉生物工程学院高层次人才科研启动经费 (2024KQ01)

**第一作者 First author, E-mail: jfxie2013@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liulei@mails.cnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2025-07-24; 接受日期 Accepted: 2026-02-03

类似, 昆虫肠道内寄居着大量的共生微生物, 主要包括细菌、真菌、原生动物、病毒和古菌等, 广泛参与宿主的营养吸收、能量代谢、免疫、繁殖和抗药性等生理过程 (Jang and Kikuchi, 2020; Schretter, 2020; Wang *et al.*, 2020)。一方面, 肠道可以为微生物定植与繁殖提供一个相对稳定的内环境; 另一方面, 共生菌的代谢产物也为宿主的生长发育和繁殖提供了必要的微量因子。这种互惠互利的关系共同塑造了共生菌独特的生物学特性 (Rajagopal, 2009; Jang and Kikuchi, 2020)。

昆虫与微生物的互作关系研究, 一直是昆虫学研究的热门领域之一。阐明宿主与肠道微生物之间的关系及其互作机制, 不仅有助于开发新的微生物源生物制剂产品, 也可有害虫防治提供重要理论依据。例如, 从中华按蚊 *Anopheles stephensi* 卵巢内分离得到的可跨代传播的粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens*, 经工程化改造后能在多种按蚊肠道内高效抑制或杀灭疟原虫, 从而在源头上切断疟疾的传播 (Wang *et al.*, 2017)。类似地, 自冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 肠道中分离的粘质沙雷氏菌, 可通过分泌可溶性因子干扰疟原虫动合子阶段的发育, 进而抑制其传播 (Bahia *et al.*, 2014)。本课题组前期研究发现, 补充肠道共生菌——产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca*, 可显著提升辐照不育雄虫的交配竞争力, 为基于昆虫不育技术 SIT (Sterile insect technique) 的害虫防治策略提供了新思路 (Cai *et al.*, 2018)。

目前, 昆虫肠道共生菌功能的研究主要采用抗生素饲喂, 以达到无菌或限菌的目的。然而, 不同抗生素的抗菌谱各异, 实验前需要进行初步筛选 (Akami *et al.*, 2019; Bai *et al.*, 2019)。在剂量控制方面, 低浓度往往达不到清除的效果, 而高浓度则可能导致宿主线粒体功能障碍、氧化损伤等负面效应, 甚至影响取食、交配等行为 (Kalghatgi *et al.*, 2013; Hughes *et al.*, 2014; Chabanol *et al.*, 2020)。此外, 部分昆虫肠道内还存在耐抗生素菌株, 这在很大程度上影响了该方法的适用性与结果的可靠性 (Coon *et al.*, 2016)。由于抗生素处理无法消除抗生素暴露对

昆虫生长发育可能产生的负面作用, 该方法在实际应用中的科学性与有效性备受质疑 (Ridley *et al.*, 2013; Zarrinpar *et al.*, 2018; Chabanol *et al.*, 2020)。加之抗生素成本较高、常温下易失活等特点, 也增加了实验成本与难度。目前, 除黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 及黑水虻 *Hermetia illucens* 等少数物种外, 大多数昆虫仍缺乏稳定可靠的无菌品系, 这严重制约了昆虫-微生物互作机制的深入解析 (Smith *et al.*, 2007; Koyle *et al.*, 2016; Correa *et al.*, 2018)。

橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 隶属于双翅目 Diptera 实蝇科 Tephritidae 果实蝇属 *Bactrocera*, 是一种重要的果蔬园艺害虫。其寄主范围广泛, 可危害 40 余种植物的 350 多种瓜果 (Schutze *et al.*, 2015); 近年研究表明, 橘小实蝇肠道内存在复杂的微生物群落 (Guo *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2023), 然而, 受限于无菌品系构建技术的缺乏, 这些特定微生物的生物学功能至今尚未明确, 亟待建立适用于该昆虫的无菌培育体系, 以推动相关研究的深入开展。

1 材料与方 法

1.1 供试虫源

供试橘小实蝇源于华中农业大学城市与园艺昆虫所, 在本实验室已经稳定传代 30 代以上。幼虫取食人工饲料: 麦麸 80 g, 蔗糖 40 g; 玉米粉 40 g; 酵母 15 g; 苯甲酸钠 0.5 g; 水: 200 mL。待化蛹前 1-2 d 转移到湿度为 70% 蛭石中进行化蛹, 定期喷水保持湿度。羽化后成虫转入饲养笼 (40 cm×40 cm×40 cm) 内, 喂食蔗糖: 酵母=3:1 的人工饲料, 以蓄水的脱脂棉供给水源。饲养条件: 温度(27±1)℃, 相对湿度 70%±10%, 光照周期 12L:14D。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 仪器 超净工作台(苏州净化设备有限公司), 全自动高压灭菌锅(致微(厦门)仪器有限公司), 光照培养箱(武汉瑞华仪器设备有限责任公司), PCR 仪(美国 Bio-Rad 伯乐生物技

术公司), 电泳仪(北京六一生物科技有限公司), 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 伯乐生物技术公司), 全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司)。

1.2.2 耗材 果蝇培养瓶(Biosharp, BC021), 诱卵杯(一次性纸杯, 在杯子侧壁留有孔洞, 诱卵时内置香蕉, 以引诱橘小实蝇产卵), 孵化盒(采用 38 cm×26 cm×21 cm 的收纳盒改造而成, 盒底平铺海绵用于蓄水保湿, 两端设有通气软管于补充氧气)。除上述专用装置外, 实验所用常规耗材还包括: 烧杯、培养皿、试管、细毛笔刷、无菌水、塑料套管、巴氏吸管、滤网、量筒、标签纸、洗瓶等。

1.2.3 试剂 2×Taq PCR Master Mix(上海翊圣生物科技有限公司), 酵母粉(英国 OXOID 公司), 琼脂糖(西班牙 Biowest 公司), 溴化乙锭(美国 Sigma-Aldrich 公司), 新洁尔灭消毒液(山东德新康医疗科技有限公司), 75%消毒酒精(武汉兴和达商贸有限公司), 蔗糖(国药集团化学试剂有限公司), Triton-X 100(国药集团化学试剂有限公司), E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit(美国 Omega Bio-Tek 公司)。

1.3 无菌品系构建流程

橘小实蝇无菌品系幼虫的构建主要包括以下四个环节:

1.3.1 环境控制 a) 环境消毒: 用新洁尔灭工作液喷洒到工作环境周边, 20 min 后再用 84 消毒液工作液处理 20 min; b) 仪器消毒: 用新洁尔灭工作液擦拭超净工作台台面, 20 min 后用再用 75%酒精擦拭, 然后开紫外灯 30 min; 培养箱、无菌培养盒消毒同超净工作台操作; c) 衣物消毒: 用新洁尔灭工作液喷洒到实验服等物品上, 消毒 30 min 以上; d) 操作人员: 穿戴实验服, 佩戴一次性医用外科口罩和乳胶手套。

1.3.2 材料灭菌 将培养基、烧杯、培养皿、量筒、滤网、毛笔刷等材料洗涤干净, 灭菌袋包裹后进行高温高压灭菌(121℃, 20 min); 之后转移至超净工作台, 开启紫外灯灭菌 30 min。幼虫人工饲料和不宜灭菌的实验材料需采用钴-60 辐

照灭菌, 或根据饲料特性分开灭菌, 如将饲料分为 A、B 两组, 分开灭菌后在超净工作台内混匀(A 组: 麦麸、玉米淀粉; B 组: 蔗糖、酵母粉和无菌水)。

1.3.3 胚胎脱菌 a) 将诱卵杯放入产卵盛期的种群中诱卵 30 min, 用无菌水冲洗掉粘附于内壁的卵, 200 目滤网过滤收集, 随后转移至超净工作台进行后续操作; b) 将卵连同滤网浸没在盛有 75%酒精的烧杯中, 表面消毒 3-5 min; c) 无菌水中洗涤 1 min, 然后转移至含 2%次氯酸钠(有效氯含量)溶液处理 60-80 s, 以脱去卵壳; d) 无菌水洗涤 1 min, 转移到新的含 75%酒精的烧杯中消毒 3-5 min; e) 依次在 500 mL、1 L 无菌水中洗涤 1 min; f) 用 100 mL 0.02% Triton-X100 润洗, 然后置于培养皿上; g) 用毛笔刷将胚胎转移至饲料表面, 盖紧瓶塞, 放置到无菌培养盒, 并补充氧气。

1.3.4 无菌幼虫培养 将无菌培养盒转移至光照培养箱中培养, 定期消毒, 并及时补充氧气。

1.4 实验方法

1.4.1 LB 和 PDA 平板涂布检测 取 5 头无菌和常规培养的 3 龄幼虫于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 ml 无菌水和钢珠, 离心管放入研磨仪适配器中研磨, 研磨频率和时间: 70 hz/s, 60 s; 取 10 倍稀释的研磨匀浆液 100 μL 均匀涂布在平板表面, 放入培养箱中培养 24-48 h (LB 培养基, 37℃; PDA 培养基, 25℃)。

1.4.2 DNA 提取、PCR 扩增和凝胶电泳检测

在解剖镜下解剖无菌和常规培养幼虫的肠道组织, 采用 E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit 提取肠道总菌。细菌采用 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。真菌采用 18S rDNA 的通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) 进行 PCR 扩增。以橘小实蝇 β -actin 基因作为内参 (β -actin-F: 5'-TCGATCATGAAGTGCGATGT-3', β -actin-R: 5'-ATCAGCAATACCGGGGTACA-3')。引物由金

斯瑞生物合成。PCR 反应体系: $2 \times$ Taq Mix 12.5 μ L, 10 μ mol/L Forward 引物 1 μ L, 10 μ mol/L Reverse 引物 1 μ L, 模板 DNA 3 μ L, Nuclease-free water 7.5 μ L。扩增程序参照 Correa 等 (2018), 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 45 s (16S rDNA) 或 1 min (18S rDNA), 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 32 个循环; 最后在 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下保存。取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

采用平板涂布法与基于分子生物技术的真

菌 ITS 及细菌 16S rDNA 序列扩增法, 对构建的无菌幼虫种群进行微生物污染双重验证。如图 1 (A-D) 所示, 在 LB 和 PDA 培养基平板上, 传统饲养幼虫的肠道样本涂布后可见密集的微生物菌落, 而无菌幼虫样本的平板中未出现肉眼可见的菌落。该结果初步表明, 经本流程所构建的幼虫种群体内均未检出可培养的微生物。

进一步提取幼虫肠道组织总 DNA, 以其为模板分别扩增内参基因 β -actin、细菌 16S rDNA 及真菌 ITS 序列, 取 5 μ L 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。结果如图 2 所示, 在传统饲养组中, 16S rDNA 与 ITS 扩增产物均可见清晰的目

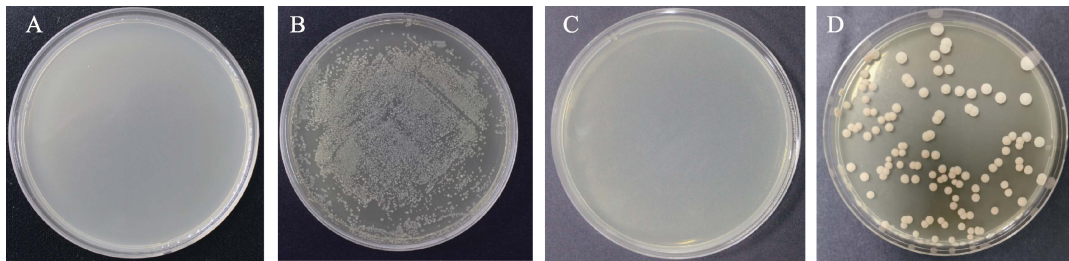


图 1 橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 幼虫肠道样本 LB 平板和 PDA 平板涂布结果

Fig. 1 Microbial culture of *Bactrocera dorsalis* larval gut homogenates on LB and PDA plates

- A. 无菌饲养幼虫匀浆的 LB 平板涂布结果; B. 传统饲养幼虫匀浆的 LB 平板涂布结果;
C. 无菌饲养幼虫匀浆 PDA 的平板涂布结果; D. 传统饲养幼虫匀浆的 PDA 平板涂布结果。
A. LB plate plating of axenically-reared larval homogenate; B. LB plate plating of conventionally-reared larval homogenate; C. PDA plate plating of axenically-reared larval homogenate; D. PDA plate plating of conventionally-reared larval homogenate.

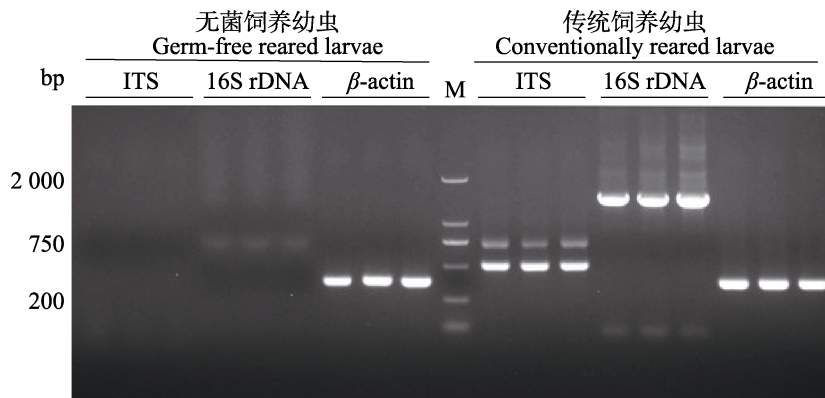


图 2 橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 幼虫肠道微生物分子检测凝胶电泳图

Fig. 2 Electrophoresis analysis of PCR products amplifying bacterial 16S rDNA and fungal ITS regions from *Bactrocera dorsalis* larval gut samples

M: DNA 分子量标准; ITS: 真菌内转录间隔区序列;

16S rDNA: 细菌 16S rRNA 基因片段; β -actin: 橘小实蝇内参基因。

M: DNA marker; ITS: Fungal internal transcribed spacer region;

16S rDNA: Bacterial 16S ribosomal RNA gene fragment; β -actin: Housekeeping gene of *B. dorsalis*.

的条带,表明幼虫肠道内存在丰富的细菌与真菌群落;而在无菌饲养组中,上述两条引物扩增结果均为阴性,未见任何特异性条带。此外,两组样本中均成功扩增出橘小实蝇内参基因 β -actin,说明 DNA 提取与扩增体系有效。综上,平板涂布与分子检测结果一致,表明本实验所建立的无菌幼虫品系未受到可检测的外源微生物污染,满足后续无菌昆虫功能研究的要求。

3 讨论

长期以来,昆虫与微生物互作一直以来都是昆虫学领域的研究热点。既往研究通常采用抗生素处理以试图获得无菌或少菌的昆虫个体,但该方法难以精确控制菌群状态,且可能干扰宿主正常生理,极大地制约了人们对肠道共生微生物与宿主复杂作用机理的深入探索。目前,仅在少数昆虫,如埃及伊蚊 *A. aegypti* (Correa *et al.*, 2018)、黑腹果蝇 *D. melanogaster* (Shin *et al.*, 2011; Koyle *et al.*, 2016)、黑水虻 *H. illucens* (Li *et al.*, 2023) 等报道成功构建无菌品系。由于无菌昆虫的培育与维持对环境控制、操作流程及种群维系等均有系统性要求,而已有报道多集中于胚胎表面脱菌等单一环节,对整体实验环境控制与后续饲养管理缺乏系统阐述。为此,本研究围绕环境控制、材料灭菌、胚胎脱菌和无菌培养四个关键环节,建立了橘小实蝇无菌品系的标准化培育体系。

微生物在自然环境中广泛存在,这构成了培育橘小实蝇无菌品系的主要挑战。因此,建立并维持一个高度洁净的操作环境,是获得可靠无菌个体的关键前提。本研究依据不同消毒剂的理化特性与杀菌谱等,对操作环境进行消毒剂的优化组合使用(郑吟秋等, 2017; 潘明明等, 2019)。如 84 消毒液可有效杀灭肠道致病菌、化脓性球菌和细菌芽孢,适用于操作区域周边环境的喷洒消毒。但因其对金属具有腐蚀性,应避免接触超净工作台等金属设备。新洁尔灭具有广谱杀菌作用与良好的清洗效果,尤其对革兰阳性菌繁殖体杀灭效果显著,可用于操作台面的清洁消毒。75%酒精能穿透细菌细胞膜,使菌体内部蛋白质

凝固,从而实现快速有效的表面消毒。

除无菌操作环境外,配制洁净、无外源污染物的人工饲料,是成功培育无菌幼虫的另一关键环节。然而,以往研究较少详细描述饲料无菌化处理的具体细节。鉴于不同饲料原料在理化性质上存在差异,需采用与之相适应的灭菌方法以确保效果。例如,含淀粉成分的人工饲料经高温高压灭菌后易发生糊化,室温放置后变板结硬化,不利于幼虫钻蛀取食。而富含蛋白质和蔗糖的饲料在高温高压条件下可能发生美拉德反应,导致营养组分改变,同时高温亦会破坏维生素等热敏性微量元素,影响幼虫的正常发育。紫外线因穿透能力有限,通常仅适用于材料表面消毒。相比之下,辐照灭菌已广泛应用于医疗器械与食品保鲜领域,其在杀灭微生物的同时可较好保持物料原有性状。例如,在埃及伊蚊人工饲料灭菌中,采用钴-60 辐照处理,可在彻底清除外源微生物的同时,最大限度保持饲料的理化特性与营养价值(任春磊等, 2008)。

目前,胚胎脱菌主要采用漂白剂处理以去除外层卵壳,再辅以其他消毒剂进行二次灭菌(Romoli *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2023)。为抑制可能残留的微量微生物,部分研究还会在后续培养过程中添加低浓度抗生素(Storelli *et al.*, 2011; Ridley *et al.*, 2013)。其中,漂白剂浓度与处理时间是影响脱菌效果及胚胎存活的关键因素,需在彻底灭菌与维持胚胎活性之间取得平衡。此外,脱去卵壳的胚胎结构脆弱,在转移时应使用柔软笔刷或巴氏吸管小心操作,以减少机械损伤。由于无菌饲养容器通常处于相对封闭状态,还需适时补充高浓度氧气,以满足幼虫正常发育的代谢需求,避免因缺氧导致生长迟缓或发育异常。

为验证所建立无菌品系的质量,需对昆虫消化道内容物进行微生物检测。常用的方法包括平板涂布培养,以检测可培养微生物的污染情况;针对不可培养微生物,则需提取肠道样本总 DNA,通过扩增真菌 ITS 序列和细菌 16S rDNA 并进行电泳或测序分析,进一步判断是否存在微生物污染(Koyle *et al.*, 2016; Correa *et al.*,

2018)。结合上述两种方法,可系统评估昆虫体内是否残留外源微生物,从而确认无菌品系建立的可靠性。此外,本文所述的无菌胚胎制备流程,也为昆虫胚胎细胞系的建立提供了前期处理基础,具有一定的拓展应用潜力。

参考文献 (References)

- Akami M, Andongma AA, Chen ZZ, Jiang N, Khaeso K, Jurkevitch E, Niu CY, Yuval B, 2019. Intestinal bacteria modulate the foraging behavior of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *PLoS ONE*, 14(1): e0210109.
- Bahia AC, Dong Y, Blumberg BJ, Mlambo G, Tripathi A, BenMarzouk-Hidalgo OJ, Chandra R, Dimopoulos G, 2014. Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. *Environmental Microbiology*, 16(9): 2980–2994.
- Bai Z, Liu L, Noman MS, Zeng L, Luo M, Li Z, 2019. The influence of antibiotics on gut bacteria diversity associated with laboratory-reared *Bactrocera dorsalis*. *Bulletin of Entomological Research*, 109(4): 500–509.
- Cai ZH, Yao ZC, Li YS, Xi ZY, Bourtzis K, Zhao Z, Bai S, Zhang HY, 2018. Intestinal probiotics restore the ecological fitness decline of *Bactrocera dorsalis* by irradiation. *Evolutionary Applications*, 11(10): 1946–1963.
- Chabanol E, Behrends V, Prévot G, Christophides GK, Gendrin M, 2020. Antibiotic treatment in *Anopheles coluzzii* affects carbon and nitrogen metabolism. *Pathogens*, 9(9): 679.
- Coon KL, Brown MR, Strand MR, 2016. Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molecular Ecology*, 25(22): 5806–5826.
- Correa MA, Matusovsky B, Brackney DE, Steven B, 2018. Generation of axenic *Aedes aegypti* demonstrate live bacteria are not required for mosquito development. *Nature Communications*, 9(1): 4464.
- Guo QY, Yao ZC, Cai ZH, Bai S, Zhang HY, 2022. Gut fungal community and its probiotic effect on *Bactrocera dorsalis*. *Insect Science*, 29(4): 1145–1158.
- Hughes GL, Dodson BL, Johnson RM, Murdock CC, Tsujimoto H, Suzuki Y, Patt AA, Cui L, Nossa CW, Barry RM, Sakamoto JM, Hornett EA, Rasgon JL, 2014. Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34): 12498–12503.
- Jang S, Kikuchi Y, 2020. Impact of the insect gut microbiota on ecology, evolution, and industry. *Current Opinion in Insect Science*, 41: 33–39.
- Kalghatgi S, Spina CS, Costello JC, Liesa M, Morones-Ramirez JR, Slomovic S, Molina A, Shirihai OS, Collins JJ, 2013. Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in mammalian cells. *Science Translational Medicine*, 5(192): 192ra185.
- Koyle ML, Veloz M, Judd AM, Wong AC, Newell PD, Douglas AE, Chaston JM, 2016. Rearing the fruit fly *Drosophila melanogaster* under axenic and gnotobiotic conditions. *Journal of Visualized Experiments*, 113: 54219.
- Li XY, Mei C, Luo XY, Wulamu D, Zhan S, Huang YP, Yang H, 2023. Dynamics of the intestinal bacterial community in black soldier fly larval guts and its influence on insect growth and development. *Insect Science*, 30(4): 947–963.
- Pan MM, Chen WW, Wang Y, Wang J, Zhou ZY, 2019. Six kinds of commonly used disinfectants for laboratory animal barrier facilities. *Laboratory Animals and Comparative Medicine*, 39(6): 489–495. [潘明明, 陈枉枉, 王艳, 王婧, 周正宇, 2019. 实验动物屏障设施常用的6种消毒剂. *实验动物与比较医学*, 39(6): 489–495.]
- Rajagopal R, 2009. Beneficial interactions between insects and gut bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 49(2): 114–119.
- Ren CL, Yang GS, Yan AS, 2008. Application of Co- γ irradiation technology in the sterilisation of feed for experimental animals. *Laboratory Animal Science*, 25(4): 51–54. [任春磊, 杨国山, 闫傲霜, 2008. Co- γ 射线辐照技术在实验动物饲料灭菌中的应用. *实验动物科学*, 25(4): 51–54.]
- Ridley EV, Wong AC, Douglas AE, 2013. Microbe-dependent and nonspecific effects of procedures to eliminate the resident microbiota from *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(10): 3209–3214.
- Romoli O, Schönbeck JC, Hapfelmeier S, Gendrin M, 2021. Production of germ-free mosquitoes via transient colonisation allows stage-specific investigation of host-microbiota interactions. *Nature Communications*, 12(1): 942.
- Schretter CE, 2020. Links between the gut microbiota, metabolism, and host behavior. *Gut Microbes*, 11(2): 245–248.
- Schutze MK, Mahmood K, Pavasovic A, Wang B, Newman J, Clarke AR, Krosch MN, Cameron SL, 2015. One and the same: Integrative taxonomic evidence that *Bactrocera invadens*

- (Diptera: Tephritidae) is the same species as the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*. *Systematic Entomology*, 40(2): 472–486.
- Shin SC, Kim SH, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, Yoon JH, Ryu JH, Lee WJ, 2011. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science*, 334(6056): 670–674.
- Smith K, McCoy KD, MacPherson AJ, 2007. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in Immunology*, 19(2): 59–69.
- Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F, 2011. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metabolism*, 14(3): 403–414.
- Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD, 2018. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ-British Medical Journal*, 361: k2179.
- Wang SB, Dos-Santos ALA, Huang W, Liu KC, Oshaghi MA, Wei G, Agre P, Jacobs-Lorena M, 2017. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science*, 357(6358): 1399–1402.
- Wang SC, Wang LY, Fan X, Yu C, Feng L, Yi L, 2020. An insight into diversity and functionalities of gut microbiota in insects. *Current Microbiology*, 77(9): 1976–1986.
- Xie JF, Cai ZH, Zheng WP, Zhang HY, 2023. Integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles in response to gut microbiota depletion in the abdomens of female *Bactrocera dorsalis*. *Insect Science*, 30(2): 443–458.
- Zarrinpar A, Chaix A, Xu ZZ, Chang MW, Marotz CA, Saghatelian A, Knight R, Panda S, 2018. Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. *Nature Communications*, 9(1): 2872.
- Zheng YQ, Wang YC, He Y, Zhao XP, Dai Q, 2017. Study on disinfection efficacy of five chemical disinfectants in high-level biosafety laboratory. *Chinese Journal of Disinfection*, 34(10): 905–908. [郑吟秋, 王云川, 何媛, 赵兴平, 代青, 2017. 5种化学消毒剂对高等级生物安全实验室消毒效果研究. 中国消毒学杂志, 34(10): 905–908.]