



# 七氟菊酯和溴氰菊酯对棉铃虫肠道菌群的影响

姜笑维<sup>1</sup>, 关丹阳<sup>1</sup>, 李清亚<sup>1</sup>, 刘 晓<sup>1</sup>, Hongmei LI-BYARLAY<sup>2</sup>, 贺秉军<sup>1,\*</sup>

(1. 南开大学生命科学学院, 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071;

2. Central State University, Wilberforce, OH 45384, USA)

**摘要:**【目的】本研究旨在探究拟除虫菊酯类杀虫剂对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫肠道菌群结构及代谢的影响,丰富对杀虫剂作用机理的认识。【方法】分别对棉铃虫 2 和 3 龄幼虫饲喂普通人工饲料(对照组, SS)、含 2% 七氟菊酯(I 型拟除虫菊酯)粉剂饲料(七氟菊酯处理组, Te)和含 2.5% 溴氰菊酯(II 型拟除虫菊酯)乳油饲料(溴氰菊酯处理组, DM),然后提取 3 龄幼虫肠道菌群基因组 DNA;利用 Illumina MiSeq 二代高通量测序技术对肠道细菌的 16S rDNA 的 V3-V4 变异区进行测序,分析其肠道细菌的多样性和丰富度;利用 qPCR 验证 16S rDNA 测序分析结果。取 2 和 3 龄幼虫肠道,匀浆后进行 Biolog-Eco 实验,分析肠道细菌对 Eco 板上 31 种碳源的代谢情况。【结果】16S rDNA 测序结果表明,棉铃虫 3 龄幼虫肠道细菌主要是厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和蓝藻菌门(Cyanobacteria)。与对照组相比,溴氰菊酯处理组和七氟菊酯处理组的棉铃虫幼虫肠道细菌的  $\alpha$  多样性指数没有显著性改变,但是菌群结构发生了变化:在门水平,拟杆菌门的相对丰度减少,厚壁菌门和蓝藻菌门的相对丰度增加,qPCR 验证结果亦支持 16S rDNA 测序分析的这个结果;在属水平,拟杆菌属 *Bacteroides*、普氏菌属 *Prevotella* 和假单胞菌属 *Pseudomonas* 等的相对丰度降低,狭义梭菌属 *Clostridium sensu stricto* 1、埃希菌属-志贺氏菌属 *Escherichia-Shigella* 和盐单胞菌属 *Halomonas* 等的相对丰度增加,其中盐单胞菌属 *Halomonas* 的相对丰度显著增加。Biolog-Eco 结果表明,与对照组相比,溴氰菊酯处理组中 2 龄幼虫对羧酸类碳源的代谢能力下降;溴氰菊酯处理组和七氟菊酯处理组中 3 龄幼虫对 DL- $\alpha$ -磷酸甘油、肝糖和 L-苯丙氨酸等碳源的利用能力下降。【结论】结果显示,拟除虫菊酯类杀虫剂对棉铃虫肠道菌群的结构和代谢能力有明显影响,拟除虫菊酯类杀虫剂使棉铃虫肠道有益菌的相对丰度下降,而使致病菌的相对丰度增加。短时间拟除虫菊酯处理未造成抗药性菌群的丰度增加。qPCR 检测结果与 16S rDNA 测序分析结果相似。I 型和 II 型拟除虫菊酯类杀虫剂对棉铃虫肠道菌群结构和代谢功能的影响不同。

**关键词:** 棉铃虫; 肠道细菌; 菌群结构; 16S rDNA; Biolog-Eco; 拟除虫菊酯; 碳源

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2020)10-1183-11

## Effects of tefluthrin and deltamethrin on gut microbiota in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

JIANG Xiao-Wei<sup>1</sup>, GUAN Dan-Yang<sup>1</sup>, LI Qing-Ya<sup>1</sup>, LIU Xiao<sup>1</sup>, Hongmei LI-BYARLAY<sup>2</sup>, HE Bing-Jun<sup>1,\*</sup> (1. Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Central State University, Wilberforce, OH 45384, USA)

**Abstract:** 【Aim】 This study aims to address the effects of pyrethroid insecticides on the structure and metabolism of larval gut microbiota of *Helicoverpa armigera* and to enrich the knowledge about the action mechanisms of pesticides. 【Methods】 The 2nd and 3rd instar larvae of *H. armigera* were fed with the

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871992, 31371974)

作者简介: 姜笑维, 女, 1992 年 3 月生, 河北邯郸人, 硕士研究生, 研究方向为动物生理生化, E-mail: 18333192838@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: hebj@nankai.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-02-24; 接受日期 Accepted: 2020-04-28

normal artificial diet (control group, SS) and diets containing 2% tefluthrin (type I pyrethroid) powder (tefluthrin treatment group, Te) and 2.5% deltamethrin (type II pyrethroid) emulsifiable concentrate (deltamethrin treatment group, DM), respectively, and then the genomic DNA of gut bacteria of the 3rd instar larvae was extracted. Then the V3-V4 region of 16S rDNA of gut bacteria was sequenced using Illumina MiSeq of the 2nd generation high-throughput sequencing technology to analyze the diversity and abundance of gut bacteria, and qPCR was performed to verify the 16S rDNA sequencing and analysis results. In addition, the gut samples of the 2nd and 3rd instar larvae of *H. armigera* were milled for Biolog-Eco experiment to analyze the metabolism of 31 carbon sources by gut bacteria on the Eco plate. 【Results】 Sequencing results of 16S rDNA showed that the gut bacteria of the 3rd instar larvae of *H. armigera* were mainly composed of Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes and Cyanobacteria. Compared with the control group, the  $\alpha$ -diversity index of the larval gut bacteria in the deltamethrin and tefluthrin treatment groups did not change significantly, but the community structure of bacteria changed. At the phylum level, the relative abundance of Bacteroides in the deltamethrin and tefluthrin treatment groups decreased as compared with that in the control group, while that of Firmicutes and Cyanobacteria increased. qPCR verification results supported the above 16S rDNA sequencing and analysis results. At the genus level, the relative abundance of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Pseudomonas* was reduced, and that of *Clostridium sensu stricto* 1, *Escherichia-Shigella*, and *Halomonas* increased, especially *Halomonas* with significant increase. Biolog-Eco results showed that the metabolic capacity of carboxylic acid carbon sources in the 2nd instar larvae in the deltamethrin treatment group and the metabolic capacity of DL-alpha-glycerophosphate, hepatose, and L-phenylalanine in the 3rd instar larvae in the tefluthrin and deltamethrin treatment groups decreased as compared with those in the control group. 【Conclusion】 The results indicate that pyrethroid insecticides have notable effects on the structure and metabolic capacity of larval gut microbiota of *H. armigera*. Pyrethroid insecticides reduce the relative abundance of beneficial bacteria but increase the relative abundance of pathogenic bacteria in the gut of *H. armigera*. Short-term pyrethroid treatment does not result in the increased abundance of resistant bacteria. The qPCR results are similar to the 16S rDNA sequencing and analysis results. Type I and type II pyrethroids exhibit different effects on the structure and metabolic functions of gut bacteria of *H. armigera*.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*; gut bacteria; bacterial community structure; 16S rDNA; Biolog-Eco; pyrethroids; carbon source

肠道是生物体中最大、最复杂的生态系统,被认为是生物的“微生物器官”(Possemiers *et al.*, 2011; Byndloss and Bäumlner, 2018)。昆虫肠道内栖息着大量微生物,它们与宿主相互影响,协同进化,形成了复杂而动态平衡的微生物区系(Dillon and Chamley, 2002; 王四宝和曲爽, 2017)。肠道微生物及其代谢产物参与宿主的营养代谢和免疫调节等生理活动,同时能够降低宿主被病原微生物感染的机率(Dillon and Chamley, 2002; Li *et al.*, 2016)。有研究表明一些昆虫肠道中的 *Gilliamella*、乳酸杆菌 *Lactobacillus* 和双歧杆菌 *Bifidobacterium* 参与合成果胶降解酶、糖苷水解酶和多糖水解酶等,从而帮助宿主消化吸收食物中的营养成分(Engel and Moran, 2012),而肠道菌群紊乱则会引起宿主的免疫反应

失调、肠屏障破坏、对病原体的清除率降低,以及存活能力下降等病态现象(Round and Mazmanian, 2009; 徐兴伟等, 2017)。Cox-Forster 等(2007)利用高通量测序发现,感染蜂群衰竭失调病症(colony collapse disorder, CCD)与未感染 CCD 蜂群的肠道优势菌群存在差异。也有学者发现,肠道菌群与宿主抗药性相关,如肠球菌能介导小菜蛾 *Plutella xylostella* 对毒死蜱的抗性,沙门菌可以降低小菜蛾对毒死蜱的抗性(Xia *et al.*, 2018);椿象共生菌可介导宿主对杀螟松的抗性(Kikuchi *et al.*, 2012)。肠道菌群的结构和相对丰度一定程度上可反映昆虫的健康状况及其对体内外不良环境的抵抗效力,因此对杀虫剂等不利因子存在条件下肠道菌群变化的检测与分析可一定程度上揭示昆虫对这些因子的适

应机制。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是一种世界性农业害虫, 食性广, 生活周期短, 危害大。拟除虫菊酯类杀虫剂是防治此类害虫的常用杀虫剂, 根据其化学结构及作用后的症状, 可分为 I 型拟除虫菊酯和 II 型拟除虫菊酯两大类。I 型拟除虫菊酯不含  $\alpha$ -氰基, 如七氟菊酯 (tefluthrin), 主要引发 T 综合征 (tremor-syndrome), 表现为不安、麻痹、过度兴奋及身体震颤的症状; II 型拟除虫菊酯含有  $\alpha$ -氰基, 如溴氰菊酯 (deltamethrin), 主要引发 CS 综合征 (choreoathetosis-salivation-syndrome), 表现为动作失调、身体扭曲、抽搐、流涎等症状。目前, 棉铃虫已对拟除虫菊酯类杀虫剂产生了严重抗药性。基于前述昆虫肠道菌群与宿主抗药性相关的重要线索, 检测分析拟除虫菊酯类杀虫剂作用前后棉铃虫肠道微生物结构和代谢的变化, 对拟除虫菊酯类杀虫剂作用机理以及棉铃虫抗药性机理分析具有重要意义。目前尚未见相关报道。

本研究通过 16S rDNA 测序及 Biolog-Eco 分别分析饲喂普通人工饲料、含 2% 七氟菊酯 (I 型拟除虫菊酯) 粉剂饲料和含 2.5% 溴氰菊酯 (II 型拟除虫菊酯) 乳油饲料的棉铃虫幼虫肠道微生物结构以及肠道微生物对 31 种碳源代谢的变化, 探究溴氰菊酯和七氟菊酯对棉铃虫肠道菌群的结构和代谢功能的影响, 分析拟除虫菊酯杀虫剂的作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试虫的饲养

实验所用棉铃虫为拟除虫菊酯敏感品系, 购自中国农业科学院植物保护研究所。饲养条件为: 温度 25 ~ 28℃, 相对湿度 60% ~ 80%, 光周期 14L: 10D。棉铃虫普通人工饲料配方参考卓乐似等 (1981)。

### 1.2 添加杀虫剂饲料的配制和试虫分组处理

分别配制 2% 七氟菊酯 (I 型拟除虫菊酯) 粉剂和 2.5% 溴氰菊酯 (II 型拟除虫菊酯) 乳油 (有效成分 25 g/L) 的亚致死浓度 (8 mg/L), 将普通人工饲料切成边长为 1 cm 的小块分别浸泡在药液中, 5 min 后将饲料取出, 晾至半干。棉铃虫 2 和 3 龄幼虫分别饲喂普通人工饲料 (对照组, SS)、含 2% 七氟菊酯粉剂饲料 (七氟菊酯处理组, Te) 和含 2.5% 溴氰菊酯乳油饲料 (溴氰菊酯处理组, DM), 36 h 后进行后续操作。

### 1.3 棉铃虫肠道基因组 DNA 的提取

随机选取体型大小一致、生长健康的 SS, Te 和

DM 组 3 龄幼虫各 150 头, 饥饿处理后将幼虫置于 75% 的酒精中 30 秒进行体表消毒, 然后用 0.8% 的生理盐水漂洗 3 次, 无菌条件下解剖取出肠道, 放在 1 mL 玻璃匀浆器中, 加入少许 0.8% 的生理盐水, 立即进行匀浆, 使用 Magen Hipure Soil DNA Kit 提取肠道基因组 DNA 备用。每个样品 50 根肠道, 每组设置 3 个重复。

### 1.4 棉铃虫肠道细菌 16S rDNA 扩增、建库和测序

使用金唯智设计的扩增原核生物 16S rDNA V3-V4 区的引物, 正向引物: 5'-CCTACGRRBGCA SCAGKVRVGAAT-3'; 反向引物: 5'-GGACTAC NVGGGTWTCTAATCC-3'。反应体系 (25  $\mu$ L): TransStart Buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs 2  $\mu$ L, 正反向引物 (10 mmol/L) 各 1  $\mu$ L, TransStart Taq DNA 0.5  $\mu$ L, 模板 DNA 20 ng, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。PCR 反应参数: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 5 s, 57℃ 退火 90 s, 72℃ 延伸 10 s, 最终 72℃ 延伸 5 min, 24 个循环。PCR 扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验。

通过 PCR 向 16S rDNA 的 PCR 产物末端加上带有 Index 的接头, 以便进行 NGS 测序。使用 Agilent 2100 生物分析仪 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, 美国) 检测文库质量, 并通过 Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA) 检测文库浓度。DNA 文库混合后, 按 Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, 美国) 使用说明书进行 PE250/300 双端测序, 由 MiSeq 自带的 MiSeq Control Software (MCS) 读取序列信息 (苏州金唯智生物科技有限公司)。

### 1.5 qPCR 验证棉铃虫肠道细菌

利用 qPCR 验证 SS, DM 和 Te 棉铃虫肠道中变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 高通量测序结果。并用棉铃虫肠道总细菌量对这两个菌门进行相对定量。qPCR 引物设计在 16S rDNA 的保守区域内, 引物序列参照夏晓峰 (2014), 总细菌定量引物: 正向引物: 5'-CGGCAACGAGCGCAA CCC-3'; 反向引物: 5'-CCATTGTAGCACGTGTGTGTA GCC-3'。变形菌门定量引物: 正向引物: 5'-TCGTCA GCTCGTGYGTGA-3'; 反向引物: 5'-CGTAAGGG CCATGATG-3'。厚壁菌门定量引物: 正向引物: 5'-GGAGYATGTGGTTAATTCGAAGCA-3'; 反向引物: 5'-AGCTGACGACAACCATGCAC-3'。qPCR 反应体系 (25  $\mu$ L): SYBR Premix Ex Taq II (TakaRa) 12.5  $\mu$ L, 20 ng 肠道细菌总 DNA 模板, 正反向引物 (10 mmol/L) 各 1  $\mu$ L, 其余用 ddH<sub>2</sub>O 补足。三步法 qPCR 扩增程序: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 3 s, 40 次

循环; 60℃ 30 s, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。qPCR 在 Eppendorf 实时荧光定量 PCR 仪 Realplex2 上进行。qPCR 产物相对丰富度用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 (Livak and Schmittgen, 2001)。

### 1.6 Biolog-Eco 检测棉铃虫幼虫肠道菌群代谢活性

Biolog-Eco 技术可以用于分析微生物对 Eco 板上 31 种碳源的利用情况。Biolog-Eco 板的每孔平均颜色变化率 (average well color development, AWCD) 是反映环境微生物代谢活性, 即利用单一碳源能力的重要指标。Biolog-Eco 板的碳源有 31 种单一碳源和空白对照, 每种碳源和空白对照有 3 个平行。31 种碳源按照化学基团的性质分成 6 类, 即胺/氨基化合物、氨基酸类、糖类、羧酸类、双亲化合物类和聚合物 (孔滨和杨秀娟, 2011)。分别取对照组 (SS)、溴氰菊酯处理组 (DM) 和七氟菊酯处理组 (Te) 棉铃虫 2 龄和 3 龄幼虫各 35 头, 在无菌条件下解剖取出肠道, 放在 1 mL 玻璃匀浆器中, 加入少许 0.8% 的生理盐水, 立即进行匀浆, 用 0.8% 生理盐水定容至 12.5 mL。无菌条件下将肠道样品悬浮液加样到 Biolog-Eco 微孔板中, 每孔 120  $\mu$ L, 将加样后的 Biolog-Eco 板置于 30℃ 恒温箱中培养, 1 h 后用酶标仪读取吸光度值, 此次读数设为初始值, 之后每隔 24 h 读数 1 次, 连续 7~10 次。

棉铃虫肠道微生物代谢活性用每孔平均颜色变化率 (AWCD) 表示, 计算公式:  $AWCD = [\sum (A_i - A_{CK})] / n$  (李文红等, 2018)。

其中,  $A_i$  为  $i$  孔碳源 590 nm 下的吸光度值减去 750 nm 下的吸光度值,  $OD_{590}$  与  $OD_{750}$  的差值大于 0.2 的为可利用的碳源;  $A_{CK}$  为对照孔的吸光度值。  $n$  为碳源总数。

利用各样品培养 96 h 的数据, 利用下列公式计算棉铃虫 3 组样品微生物群落多样性的 Shannon 指数 ( $H$ ) (Braun *et al.*, 2006) 和 McIntosh 指数 ( $U$ ) (Xi *et al.*, 2003):

$$H = - \sum P_i \times \ln P_i;$$

$$U = \sqrt{\sum n_i^2}.$$

其中,  $P_i$  为第  $i$  孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比值;  $n_i$  是第  $i$  孔的相对吸光值。

采用 Microsoft Excel 2010 软件和 SPSS 软件进行数据处理和分析, Origin 8.0 软件和 Adobe Illustrator CS6 软件作图。

### 1.7 数据分析

对 1.4 节测序原始数据进行过滤处理, 去除嵌合体, 得到优化序列, 在 97% 的相似度下将其聚类

为物种分类的 OTU (operational taxonomic units), OTU Venn 图分析不同样品中共有及特有的 OTU 数目。运用 Mothur v. 1.30.1 软件, 采用  $\alpha$  多样性指数 (Shannon, Simpson, Coverage, Chao1, Sobs, Ace) 分析样品的丰富度、均匀度及覆盖度等; 选用  $T$  检验, 即在样本方差相等时, 分析样本的均值是否存在显著性差异, 群落组成图在不同分类水平分析物种的组成及相对丰度, 组间差异性检验分析不同组间物种是否差异显著。

## 2 结果

### 2.1 棉铃虫肠道细菌测序信息分析

SS, DM 和 Te 组 9 个棉铃虫肠道样品共得到有效序列 571 002 条, 平均每个样品 63 445 条, 有效序列平均长度为 450 bp。为了研究肠道细菌的物种组成多样性, 在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU。随着测序深度增加, 物种稀释曲线趋于平缓, 说明本实验对样品的处理已达到了一定的深度和广度, 完全满足后续实验分析。此外, 全部样本的 Coverage 指数都在 99.5% 以上 (表 1), 说明测序量能够覆盖样本中的绝大部分物种。

SS, DM 和 Te 组肠道样品共有的 OTU 数目为 209 个, SS 与 Te 共有的 OTU 数目为 230 个, SS 与 DM 共有的 OTU 数目为 219 个, DM 与 Te 共有的 OTU 数目为 220 个。SS 特有的 OTU 为 9 个, Te 特有的 OTU 数目为 22 个, DM 特有的 OTU 数目为 14 个。这些数据说明 SS, DM 和 Te 之间有相同的菌群, 但也有差异 (图 1)。

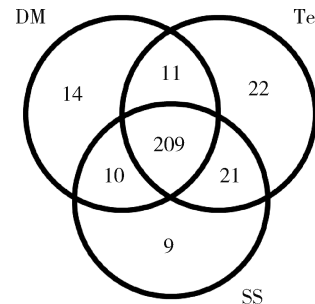


图 1 棉铃虫 3 龄幼虫肠道细菌 OTUs Venn 图  
Fig. 1 Venn diagram of gut bacteria in the 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera*

DM: 饲喂 2.5% 溴氰菊酯乳油饲料的处理组 Treatment group fed with the diet containing 2.5% deltamethrin emulsifiable concentrate; SS: 饲喂普通人工饲料的对照组 Control group fed with the normal artificial diet; Te: 饲喂 2% 七氟菊酯粉剂饲料的处理组 Treatment group fed with the diet containing 2% tefluthrin powder. 下同 The same below.

## 2.2 棉铃虫肠道细菌物种组成

对肠道菌群测序的 OUT 进行物种注释, 在门 (phylum) 水平主要有厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、蓝藻菌门 (Cyanobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus)。其中, 厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和蓝藻菌门占 90% 以上, 属于优势菌门。SS 组中第 1 优势菌门为拟杆菌门 (50.2%), 第 2 优势菌门是厚壁菌门 (38.1%),

第 3 优势菌是变形菌门 (7.3%), 蓝藻菌门占 1.6%。DM 组中第 1 优势菌门是厚壁菌门 (50.6%), 第 2 优势菌门是变形菌门 (26.1%), 第 3 优势菌门是蓝藻菌门和拟杆菌门 (分别占 10.8% 和 6.5%)。七氟菊酯组 (Te) 中第 1 优势菌门是厚壁菌门 (51.3%), 第 2 优势菌门是变形菌门 (29.1%), 第 3 优势菌门是拟杆菌门 (13.5%), 蓝细菌门占 2.9% (图 2: A)。与 SS 相比, DM 和 Te 的厚壁菌门和蓝藻菌门相对丰度升高, 拟杆菌门相对丰度下降,

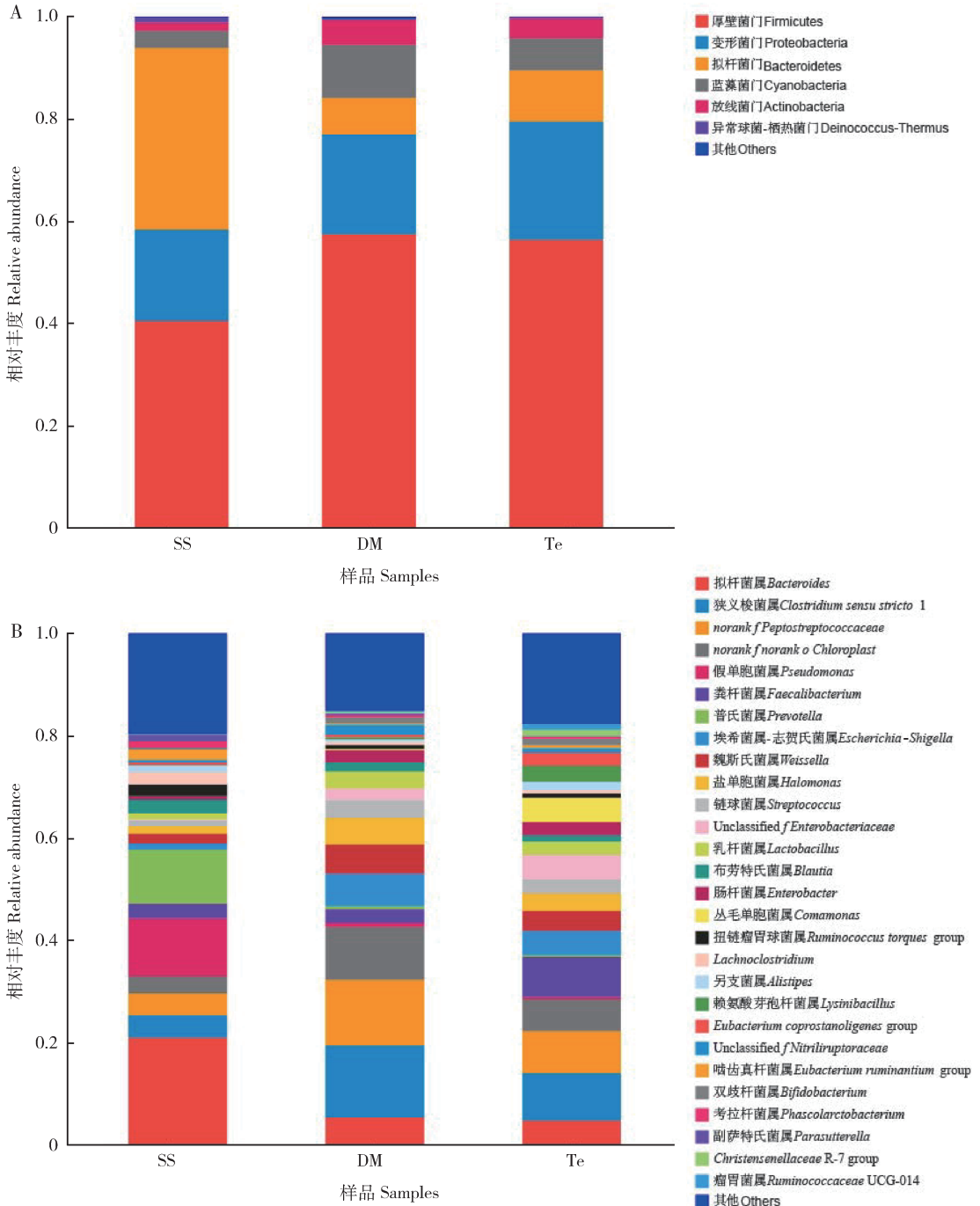


图 2 棉铃虫 3 龄幼虫肠道细菌在门 (A) 和属 (B) 水平的组成

Fig. 2 Proportional composition of gut bacteria in the 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera* at the phylum (A) and genus (B) levels

但差异不显著( $P > 0.05$ ) (图 3: A)。qPCR 检测结果如图 4 所示,溴氰菊酯处理组和七氟菊酯处理组

棉铃虫 3 龄幼虫肠道细菌中厚壁菌门占比大于对照组的,此结果与 16S rDNA 测序分析结果相似。

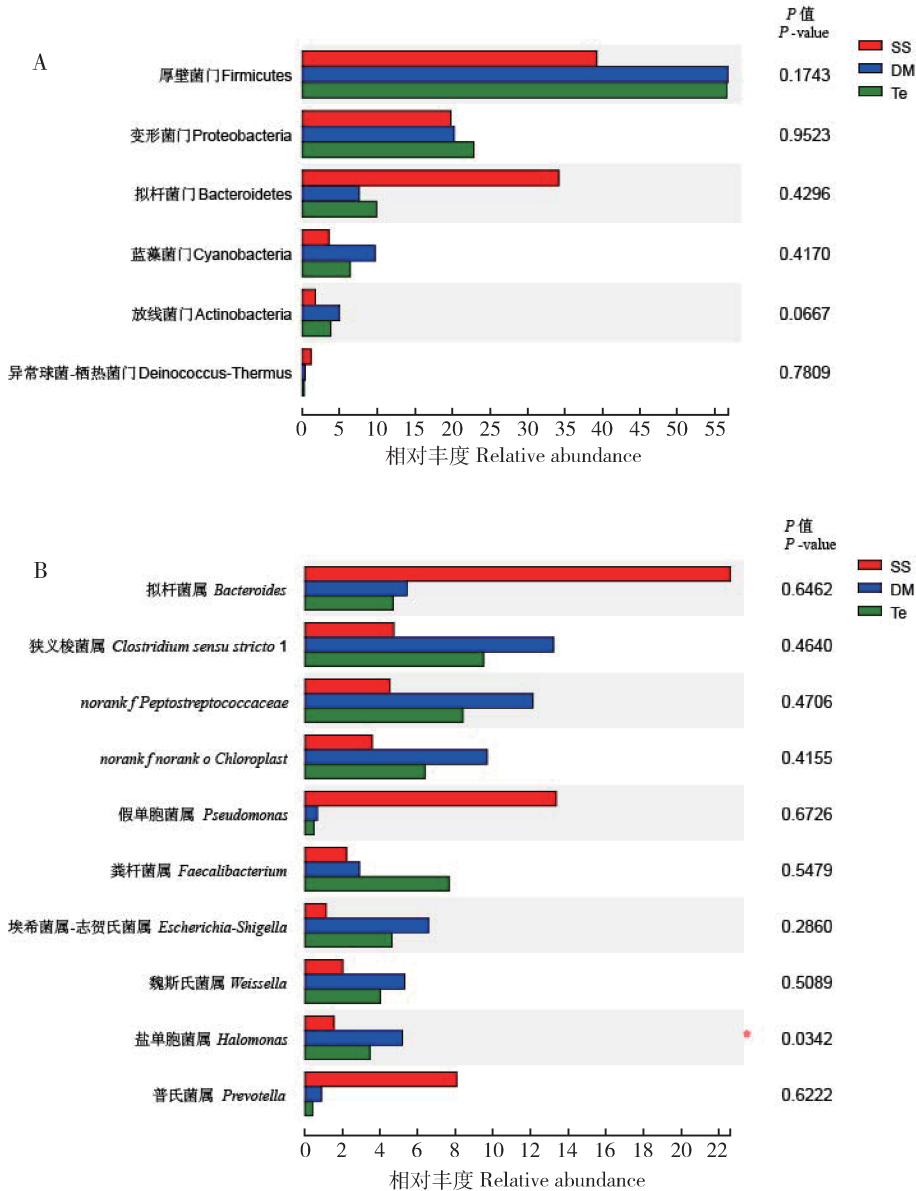


图 3 棉铃虫 3 龄幼虫肠道细菌门(A)和属(B)水平的相对丰度差异图

Fig. 3 Relative abundance differences at the phylum (A) and genus (B) levels of gut bacteria in the 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera*

图中数据为平均值  $\pm$  标准差,星号示差异显著( $P < 0.05$ , 单因素方差分析,95%置信区间)。Data in the figure are mean  $\pm$  SD, and the asterisk indicates significant difference ( $P < 0.05$ , one-way ANOVA analysis, 95% confidence interval).

在属水平(图 2: B),与 SS 相比,DM 和 Te 的拟杆菌属 *Bacteroides*、假单胞菌属 *Pseudomonas* 和普氏菌属 *Prevotella* 相对丰度下降。狭义梭菌属 *Clostridium sensu stricto 1*、norank f *Peptostreptococcaceae*、魏斯氏菌属 *Weissella*、埃希菌属-志贺氏菌属 *Escherichia-Shigella*、盐单胞菌属 *Halomonas* 的相对丰度上升。其中,盐单胞菌属 *Halomonas* 的相对丰

度显著升高( $P < 0.05$ ) (图 3: B)。

### 2.3 棉铃虫肠道细菌多样性

基于 16S rDNA 测序对 DM, SS 和 Te 3 组样品中细菌  $\alpha$  多样性进行分析,结果如表 1 所示,3 组样品的  $\alpha$  多样性指数均无显著性差异( $P > 0.05$ )。基于 Biolog-Eco 实验的细菌多样性指数分析结果如表 2 所示,2 龄幼虫期各组的 Shannon 指数和 McIntosh

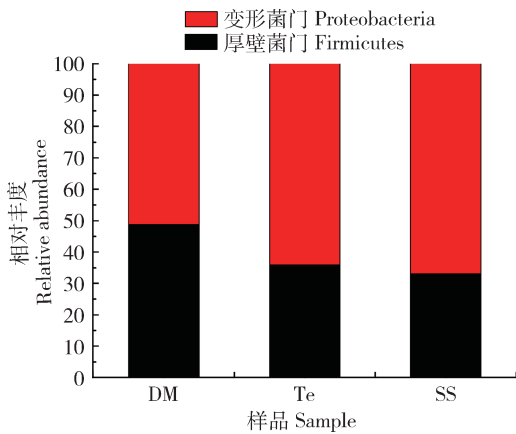


图4 qPCR 检测棉铃虫 3 龄幼虫肠道细菌门水平相对丰度  
Fig. 4 Relative abundance of gut bacteria at the phylum level in the 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera* by qPCR

表 1 基于 16S rDNA 测序的棉铃虫 3 龄幼虫肠道细菌  $\alpha$  多样性指数

Table 1 Alpha diversity indices of gut bacteria in the 3rd instar larvae of *Helicoverpa armigera* based on 16S rDNA sequencing

处理组 Treatment groups	Sobs	Shannon	Simpson	Ace	Chao1	Coverage
DM	193.33 ± 14.572	3.5202 ± 0.820	0.071456 ± 0.060	200.49 ± 15.058	206.44 ± 20.209	0.99954
SS	188.67 ± 20.108	3.2071 ± 0.514	0.125140 ± 0.070	204.27 ± 12.474	203.23 ± 13.458	0.99926
Te	199.33 ± 27.227	3.6317 ± 0.564	0.063787 ± 0.044	206.93 ± 28.535	208.30 ± 33.605	0.99953
<i>P</i> (DM vs SS)	0.7626	0.6105	0.3731	0.7554	0.8321	0.4119
<i>P</i> (SS vs Te)	0.6166	0.3901	0.2820	0.8925	0.8260	0.2093
<i>P</i> (DM vs Te)	0.7582	0.8567	0.8674	0.7522	0.9391	0.9717

表中数据为平均值 ± 标准误, 运用 *T* 检验检测每两组之间同一指数在 0.05 水平是否具有显著性差异。Data in the table are mean ± SE. Significance of difference in the same index between every two groups at the 0.05 level is compared by *T*-test.

表 2 基于 Biolog-Eco 实验的棉铃虫幼虫肠道细菌多样性指数

Table 2 Diversity indices of larval gut bacteria of *Helicoverpa armigera* based on Biolog-Eco assay

幼虫龄期 Larval instars	处理组 Treatment groups	多样性指数 Diversity indices	
		Shannon	McIntosh
2 龄 2nd instar	SS	2.5644 ± 0.0938 a	3.9727 ± 0.8447 a
	DM	2.4700 ± 0.0968 a	3.1498 ± 0.7000 a
	Te	2.6361 ± 0.0906 a	3.5747 ± 0.7468 a
3 龄 3rd instar	SS	2.1362 ± 0.1075 a	2.4858 ± 0.4757 b
	DM	2.3009 ± 0.1010 a	1.8950 ± 0.2822 c
	Te	2.5143 ± 0.0933 a	2.5338 ± 0.4895 b

表中数据为平均值 ± 标准差, 同列数据后标有不同小写字母的数据间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ , 单样本 *T* 检验)。Data in the table are mean ± SD, and those followed by different lowercase letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ , one-sample *T*-test).

为分析棉铃虫肠道细菌对不同类碳源的利用情况, 调查 1-168 h 各肠道样品在 Biolog-Eco 板上

指数没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。3 龄幼虫期 DM 组 McIntosh 指数有显著 ( $P < 0.05$ ) 降低。2 龄幼虫期各组的 Shannon 指数和 McIntosh 指数均大于 3 龄期的。

## 2.4 棉铃虫幼虫肠道菌群代谢活性

根据 AWCD 计算公式, 本研究中 SS, DM 和 Te 组棉铃虫幼虫肠道样品中细菌利用 31 种碳源的 AWCD 变化曲线如图 5 所示, 随着培养时间的延长, AWCD 值基本持续升高, 说明肠道细菌对碳源的利用力呈逐渐增加的趋势。不同组中 2 龄幼虫的 AWCD 值均大于 3 龄幼虫的 (图 5: A-C), 说明 2 龄幼虫的代谢要高于 3 龄幼虫的。2 龄幼虫肠道样品中, SS, Te 和 DM 组的 AWCD 值相似, Te 的稍高 (图 5: D); 3 龄幼虫肠道样品中, Te 的 AWCD 稍高, DM 的 AWCD 值最低 (图 5: E)。

的读数, 结果如表 3 所示, SS, Te 和 DM 组都能代谢的碳源:  $\alpha$ -环式糊精、D-纤维二糖、 $\alpha$ -D-乳糖、 $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷、D-木糖、D-甘露醇和 N-乙酰-D-葡萄糖胺 7 种, 其中  $\alpha$ -环式糊精是聚合物, 其他是糖类; 都不能利用的碳源: D-葡萄糖胺酸、D-半乳糖酸内酯、2-羟基苯甲酸、 $\gamma$ -羟基丁酸、L-苏氨酸和腐胺 6 种。

DM 组 2 龄幼虫肠道细菌对丙酮酸甲酯、4-羟基苯甲酸、衣康酸、D-苹果酸、 $\alpha$ -丁酮酸、苯乙胺、L-天门冬氨酸和 D-半乳糖醛酸的代谢能力降低; Te 组 2 龄幼虫肠道细菌对 L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸、L-谷氨酸和赤藓糖醇的代谢增强, 对 L-天门冬氨酸、D-苹果酸和 D-半乳糖醛酸的代谢能力下降。DM 组 3 龄幼虫肠道细菌对 1-磷酸葡萄糖、DL- $\alpha$ -磷酸甘油、肝糖和 L-苯丙氨酸的代谢能力下降; Te 组 3 龄幼虫肠道细菌对 DL- $\alpha$ -磷酸甘油、肝糖和 L-苯丙氨酸的代谢能力下降。

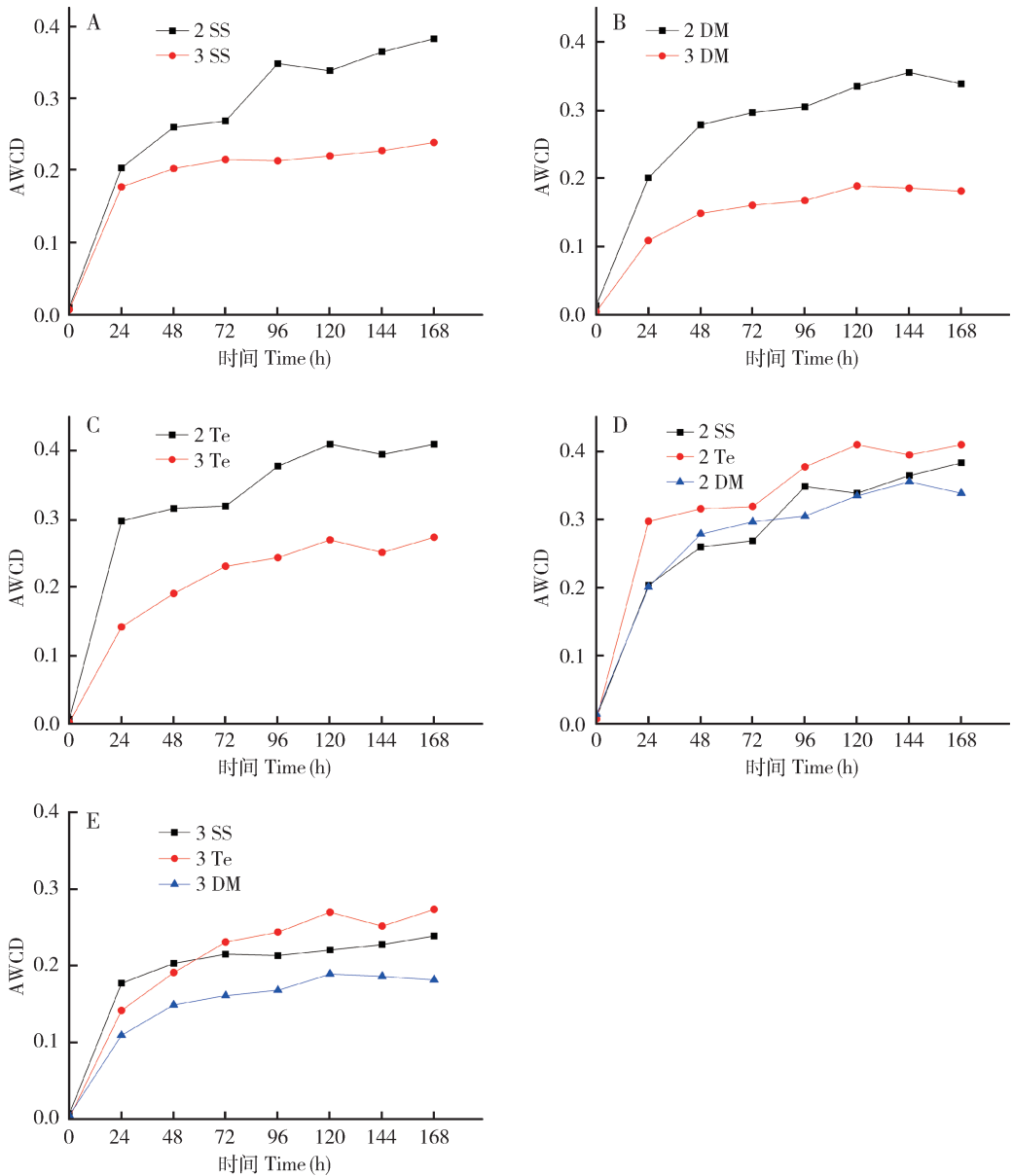


图5 Biolog-Eco 检测棉铃虫幼虫肠道细菌 AWCD 随培养时间的变化

Fig. 5 Changes in AWCD of larval gut bacteria of *Helicoverpa armigera* with culturing time detected by Biolog-Eco

A, B, C: 分别为 SS (A), DM (B) 和 Te (C) 组 2 和 3 龄幼虫在 1-168 h 内肠道细菌的 AWCD 随时间变化情况 AWCD change in the gut bacteria of the 2nd and 3rd instar larvae in SS (A), DM (B) and Te (C) groups, respectively, within 1-168 h. D, E: 分别为 SS, DM 和 Te 组 2 龄(D) 和 3 龄(E) 幼虫在 1-168 h 内肠道细菌的 AWCD 随时间变化情况 AWCD change in the gut bacteria of the 2nd instar (D) and 3rd instar (E) larvae in SS, DM and Te groups, respectively, within 1-168 h. AWCD: 平均颜色变化率, 反映环境微生物代谢活性 Average well color development, reflecting the metabolic activity of environmental microorganisms. 2 SS, 3 SS: 分别为 SS 组的 2 和 3 龄幼虫 2nd and 3rd instar larvae in SS group, respectively; 2 DM, 3 DM: 分别为 DM 组的 2 和 3 龄幼虫 2nd and 3rd instar larvae in DM group, respectively; 2 Te, 3 Te: 分别为 Te 组的 2 和 3 龄幼虫 2nd and 3rd instar larvae in Te group, respectively.

### 3 讨论

昆虫肠道菌群与昆虫的健康状况密切相关, 与昆虫的抗药性也有一定关系(李文红等, 2018; Xia et al., 2018), 因此, 研究溴氰菊酯和七氟菊酯作用

后棉铃虫肠道菌群的结构和代谢变化, 一定程度上有助于分析肠道菌群与棉铃虫抗药性的联系, 从不同角度阐明拟除虫菊酯类杀虫剂的作用机理。

16S rDNA 测序结果表明棉铃虫肠道菌群主要属于 6 个菌门, 分别是厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、蓝藻菌门、放线菌门和异常球菌-栖热菌门(图



表 3 棉铃虫幼虫肠道细菌对 Biolog-Eco 板上碳源的利用情况

Table 3 Use of carbon substrates on Biolog-Eco plate by larval gut bacteria of *Helicoverpa armigera*

碳源化学类别 Chemical groups of carbon substrates	底物 Substrates	SS		DM		Te	
		2 龄	3 龄	2 龄	3 龄	2 龄	3 龄
		2nd instar	3rd instar	2nd instar	3rd instar	2nd instar	3rd instar
双亲化合物 Miscellaneous	丙酮酸甲酯 Pyruvic acid methyl ester	+	-	-	-	+	-
	1-磷酸葡萄糖 Glucose-1-phosphate	+	+	+	-	+	+
	DL- $\alpha$ -磷酸甘油 DL- $\alpha$ -Glycerol phosphate	+	+	+	-	+	-
聚合物 Polymer	吐温 40 Tween-40	+	-	+	-	+	+
	吐温 80 Tween-80	+	-	+	-	+	-
糖类 Carbohydrates	$\alpha$ -环式糊精 $\alpha$ -D-Cyclodextrin	+	+	+	+	+	+
	肝糖 Glycogen	+	+	+	-	+	-
	D-纤维二糖 D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+
	$\alpha$ -D-乳糖 $\alpha$ -D-Lactose	+	+	+	+	+	+
	$\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷 $\beta$ -Methyl-D-glucoside	+	+	+	+	+	+
	D-木糖 D-Xylose	+	+	+	+	+	+
	赤藓糖醇 i-Erythritol	-	-	-	-	+	-
	D-甘露醇 D-Mannitol	+	+	+	+	+	+
	N-乙酰-D-葡萄糖胺 N-Acetyl-D-glucosamine	+	+	+	+	+	+
	D-葡萄糖胺酸 D-Glucosaminic acid	-	-	-	-	-	-
羧酸类 Carboxylic acids	D-半乳糖酸内酯 D-Galactonic acid lactone	-	-	-	-	-	-
	D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic acid	+	-	-	-	-	-
	2-羟基苯甲酸 2-Hydroxy benzoic acid	-	-	-	-	-	-
	4-羟基苯甲酸 4-Hydroxy benzoic acid	+	-	-	-	+	-
	$\gamma$ -羟基丁酸 $\gamma$ -Hydroxy butyric acid	-	-	-	-	-	-
	衣康酸 Itaconic acid	+	-	-	-	+	-
	$\alpha$ -丁酮酸 $\alpha$ -Keto butyric acid	+	-	-	-	+	-
D-苹果酸 D-Malic acid	+	-	-	-	-	-	
氨基酸 Amino acids	L-精氨酸 L-Arginine	+	-	+	-	+	-
	L-天门冬氨酸 L-Asparagine	+	-	-	-	-	-
	L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	-	+	-	-	+	-
	L-丝氨酸 L-Serine	-	-	-	-	+	-
	L-苏氨酸 L-Threonine	-	-	-	-	-	-
甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L-glutamic acid	-	-	-	-	+	-	
胺/氨基化合物 Amines/amides	苯乙胺 Phenylethylamine	+	-	-	-	+	-
	腐胺 Putrescine	-	-	-	-	-	-

加减号分别表示能够被利用与不能被利用的碳源。The tested carbon substrates that could be utilized and not be utilized are indicated by plus and minus symbols, respectively.

2: A)。其中厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和蓝藻菌门占 90% 以上,属于优势菌门。对照组、溴氰菊酯处理组和七氟菊酯处理组棉铃虫肠道菌群的菌门种类基本一致,比例有所不同,溴氰菊酯处理组和七氟菊酯处理组的厚壁菌门相对丰度比对照组高 12%,拟杆菌相对丰度比对照组分别低 44.7% 和 36.7%,蓝藻菌门分别是对照组的 3 和 2 倍(图 3: A)。与对照组相比,溴氰菊酯处理组和七氟菊酯处理组棉铃虫肠道菌群的拟杆菌属 *Bacteroides*、假单

胞菌属 *Pseudomonas* 和普氏菌属 *Prevotella* 的相对丰度降低。盐单胞菌属 *Halomonas*、狭义梭菌属 *Clostridium sensu stricto* 1、*norank f Peptostreptococcaceae*、魏斯氏菌属 *Weissella*、埃希菌属-志贺氏菌属 *Escherichia-Shigella*、盐单胞菌属 *Halomonas* 的相对丰度升高。其中,盐单胞菌属 *Halomonas* 的相对丰度显著( $P < 0.05$ )升高(图 3: B)。

拟杆菌属 *Bacteroides* 和普氏菌属 *Prevotella* 对于加固肠上皮、维持肠道功能具有重要意义,特别是

拟杆菌属对肠道的保护作用尤为重要(郑艺等, 2014);此外,拟杆菌属 *Bacteroides* 对糖代谢起到调节作用(Tao, 2014)。假单胞菌属 *Pseudomonas* 对昆虫病原真菌的拮抗作用(Indiragandhi *et al.*, 2008)等。饲喂含溴氰菊酯和七氟菊酯的饲料后,棉铃虫肠道中拟杆菌门(*Bacteroides*)、假单胞菌属 *Pseudomonas* 和普氏菌属 *Prevotella* 的相对丰度下降,可能会导致棉铃虫肠道保护作用下降,免疫力降低,使棉铃虫更易死亡。本研究中相对丰度升高的菌中有些是动物致病菌,如狭义梭菌属 *Clostridium sensu stricto* 1 能够引起食物中毒和坏死性肠炎等疾病(Bryant and Stevens, 2010; Kiyonobu *et al.*, 2019),破坏宿主的免疫反应(Ellemor *et al.*, 1999; Bryant *et al.*, 2000),引起肠毒素血症,破坏血脑屏障等(Linden *et al.*, 2019)。

Biolog-Eco 实验发现,随着培养时间的延长,AWCD 值基本持续升高(图 5),说明棉铃虫幼虫肠道细菌对碳源的利用呈逐渐增加的趋势,2 龄幼虫对碳源的利用高于 3 龄幼虫。溴氰菊酯处理组能够利用的碳源种类最少。溴氰菊酯处理组 2 龄幼虫肠道细菌对羧酸类碳源的代谢能力下降,七氟菊酯处理组对氨基酸类代谢能力增强,七氟菊酯处理组和溴氰菊酯处理组 3 龄幼虫肠道细菌对 DL- $\alpha$ -磷酸甘油、肝糖和 L-苯丙氨酸等碳源的利用能力下降(表 3)。但是多样性分析发现,各组肠道菌群多样性和丰富度没有形成明显差异(表 1)。棉铃虫 2 龄幼虫肠道菌群的多样性和丰富度比 3 龄幼虫的有优势(表 2)。七氟菊酯和溴氰菊酯处理的棉铃虫的幼虫肠道细菌的代谢功能不同,可能与七氟菊酯和溴氰菊酯的化学结构不同有关,七氟菊酯是 I 型拟除虫菊酯,不含有  $\alpha$ -氰基,而溴氰菊酯是 II 型拟除虫菊酯,含有  $\alpha$ -氰基。有研究表明 I 型拟除虫菊酯和 II 型拟除虫菊酯的作用机制可能有很大区别(Breckenridge *et al.*, 2009),这两种拟除虫菊酯的结构差异可能是导致棉铃虫的肠道菌群结构和功能差异的原因之一。

本研究检测了七氟菊酯和溴氰菊酯对棉铃虫肠道菌群结构和代谢的影响,结果显示拟除虫菊酯可改变棉铃虫肠道菌群的结构,主要是使益生菌的相对丰度降低,致病菌的相对丰度升高。研究结果对开展肠道微生物的功能研究有重要参考价值,为拟除虫菊酯类杀虫剂对棉铃虫作用机制分析提供了参考,也为通过肠道菌群调控治理棉铃虫的抗药性提供了新思路。

**致谢** 本实验使用了美吉生物云平台进行数据分析,在此表示感谢。

## 参考文献 (References)

- Braun B, Bückelmann U, Grohmann E, Szewzyk U, 2006. Polyphasic characterization of the bacterial community in an urban soil profile with in situ and culture-dependent methods. *Appl. Soil Ecol.*, 31 (3): 267–279.
- Breckenridge CB, Holden L, Sturgess N, Weiner M, Sheets L, Sargent D, Soderlund DM, Choi JS, Symington S, Clark JM, Burr S, Ray D, 2009. Evidence for a separate mechanism of toxicity for the type I and the type II pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology*, 30 (Suppl. 1): S17–S31.
- Bryant AE, Chen RYZ, Nagata Y, Wang Y, Lee CH, Finegold S, Guth PH, Stevens DL, 2000. Clostridial gas gangrene. II. Phospholipase C-induced activation of platelet gpIIb/IIIa mediates vascular occlusion and myonecrosis in *Clostridium perfringens* gas gangrene. *J. Infect. Dis.*, 182(3): 808–815.
- Bryant AE, Stevens DL, 2010. Clostridial myonecrosis: new insights in pathogenesis and management. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 12(5): 383–391.
- Byndloss MX, Bäumlér AJ, 2018. The germ-organ theory of non-communicable diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, 16(2): 103–110.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein A, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison S, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WL, 2007. A metagenomic survey of microbes in honeybee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848): 283–287.
- Dillon R, Charnley K, 2002. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Res. Microbiol.*, 153 (8): 503–509.
- Ellemor DM, Baird RN, Awad MM, Boyd RL, Rood JJ, Emmins JJ, 1999. Use of genetically manipulated strains of *Clostridium perfringens* reveals that both alpha-toxin and theta-toxin are required for vascular leukostasis to occur in experimental gas gangrene. *Infect. Immun.*, 67(9): 4902–4907.
- Engel P, Moran NA, 2013. Functional and evolutionary insights into the simple yet specific gut microbiota of the honey bee from metagenomic analysis. *Gut Microbes*, 4(1): 60–65.
- Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kim GH, Saravanan VS, Sa T, 2008. 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. *J. Appl. Microbiol.*, 103(6): 2664–2675.
- Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T, 2012. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(22): 8618–8622.
- Kiyonobu Y, Hiroshi A, Tokuju O, Ryo K D, Shiho S, Kaori O, Miwako H, Tohru I, Toshihiko S, 2019. Inflammasome activation

- induced by perfringolysin O of *Clostridium perfringens* and its involvement in the progression of gas gangrene. *Front. Microbiol.*, 10: 2406.
- Kong B, Yang XJ, 2011. The application principles and carbon source of Biolg-ECO. *J. Green Sci. Technol.*, (7): 231–234. [孔滨, 杨秀娟, 2011. Biolg 生态板的应用原理及碳源构成. 绿色科技, (7): 231–234]
- Li D, Wang P, Wang P, Hu X, Chen F, 2016. The gut microbiota: a treasure for human health. *Biotechnol. Adv.*, 34(7): 1210–1224.
- Li WH, Li FL, Zhou YH, Cheng Y, Jin JX, 2018. Biolg-ECO analysis of the functional diversity of the gut microbial community of deltamethrin-resistant and -sensitive diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) larvae. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 55(2): 237–242. [李文红, 李凤良, 周宇航, 程英, 金剑雪, 2018. Biolg-Eco 解析小菜蛾溴氰菊酯抗感品系肠道微生物群落功能多样性特征. 应用昆虫学报, 55(2): 237–242]
- Linden JR, Flores C, Schmidt EF, Uzal F A, Michel AO, Valenzuela M, Dobrow S, Vartanian T, 2019. *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces blood brain barrier permeability via caveolae-dependent transcytosis and requires expression of MAL. *PLoS Pathog.*, 15(11): e1008014.
- Livak K, Schmittgen T, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Possemiers S, Bolca S, Verstraete W, Heyerick A, 2011. The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia*, 82(1): 53–66.
- Round JL, Mazmanian SK, 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 9(8): 313–323.
- Tao YL, Yang DH, Zhang YT, Zhang Y, Wang ZQ, Wang YS, Cai SQ, Liu SL, 2014. Cloning, expression, and characterization of the  $\beta$ -glucosidase hydrolyzing secoisolariciresinol diglucoside to secoisolariciresinol from *Bacteroides uniformis* ZL1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(6): 2519–2531.
- Wang SB, Qu S, 2017. Insect symbionts and their potential application in pest and vector-borne disease control. *Bull. Chin. Acad. Sci.*, 32(8): 863–872. [王四宝, 曲爽, 2017. 昆虫共生菌及其在病虫害防控中的应用前景. 中国科学院院刊, 32(8): 863–872]
- Xi JY, Hu HY, Qian Y, 2003. Application of biolog system in the study of microbial community. *Acta Microbiol. Sin.*, 43(1): 138–141. [席劲瑛, 胡洪营, 钱易, 2003. Biolg 方法在环境微生物群落研究中的应用. 微生物学报, 43(1): 138–141]
- Xia X, Sun B, Gurr GM, Vasseur L, Xue M, You M, 2018. Gut microbiota mediate insecticide resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Front. Microbiol.*, 9: 25.
- Xia XF, 2014. Organizational Diversity and Functional Characterization of Microbiota in the Midgut of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.). PhD Dissertation. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. [夏晓峰, 2014. 小菜蛾中肠微生物多样性及其功能研究. 福州: 福建农林大学博士学位论文]
- Xu XW, Fan CG, Li QR, 2017. Effect of intestinal microflora on immune function and its new progress. *Parent. Ent. Nutr.*, 24(2): 118–121. [徐兴伟, 范朝刚, 李秋荣, 2017. 肠道菌群对免疫功能的影响和疾病研究的新进展. 肠外与肠内营养, 24(2): 118–121]
- Zheng Y, Zhang JC, Guo Z, Zhang HP, 2014. Research progress on high-throughput sequencing to analysis the diversity of gut microbiota and its influence factors. *J. Chin. Food Sci. Technol.*, 14(11): 162–169. [郑艺, 张家超, 郭壮, 张和平, 2014. 基于高通量测序技术分析肠道菌群及其影响因素的研究进展. 中国食品学报, 14(11): 162–169]
- Zhuo LS, Huang YL, Yang JR, 1981. Studies of the artificial diets of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Acta Entomol. Sin.*, 24(1): 108–110. [卓乐似, 黄月兰, 杨家荣, 1981. 棉铃虫人工饲料的研究. 昆虫学报, 24(1): 108–110]

(责任编辑: 马丽萍)